

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Störungen der Schilddrüsenhormonsynthese und des
Schilddrüsenhormontransportes

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Petra Ambrugger

aus München

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich
2. Prof. Dr. med Chr. Schöfl
3. Prof. Dr. T. Schöneberg

Datum der Promotion: 26.01.07

Vorwort

Diese Doktorarbeit fasst meine Untersuchungen zu Störungen der Synthese und des Transportes von Schilddrüsenhormonen auf Grund endogener und exogener Faktoren kumulativ zusammen. Ergebnisse meiner Doktorarbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

[1] Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grüters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2001;145:19-24.

[2] Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grüters A. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *European Journal of Endocrinology* 2005;153:359-366.

[3] Schmutzler C, Hamann I, Hofmann P J, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, Ambrugger P, Grüters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004;205: 95-102.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	3
2	Abstract	4
3	Einleitung	5
4	Zielstellung	5
5	Patienten und Methoden	6
5.1	Patienten	6
5.1.1	Screening nach Mutationen im TPO-Gen	6
5.1.2	Patient mit einer Mutation im MCT8-Gen	6
5.2	Methoden	6
5.2.1	Screening nach Mutationen im TPO-Gen	6
5.2.2	Herstellung der stabilen Linien WT ^{TPO} , WT ^{MCT8} , MCT8 ^{A150V}	6
5.2.3	Etablierung des Guaiacol Assays zur Selektion einzelner Klone	7
5.2.4	Sandwich ELISA	7
5.2.5	Immunfluoreszenz-Studien	7
5.2.6	Statistik	7
6	Resultate	7
6.1	Häufigkeit von Mutationen im Schilddrüsenperoxidase-Gen bei Patienten mit angeborener Hypothyreose	8
6.2	Funktionelle Charakterisierung der Mutante MCT8 ^{A150V} im Monocarboxylat 8-Gen	9
6.3	Einfluß von endokrinen Disruptoren auf die Aktivität der rekombinanten humanen Schilddrüsenperoxidase	9
7	Diskussion	10
7.1	Mutationen im Schilddrüsenperoxidase-Gen	10
7.2	Funktionelle Untersuchungen zum Monocarboxylat-Transporter 8-Gen	11
7.3	Einfluß endokriner Disruptoren auf die Schilddrüsenperoxidase	12
7.4	Ausblick	13
8	Literaturverzeichnis	14
9	Publikationen	17

10 Anteilserklärung	40
11 Erklärung an Eides statt	42
12 Lebenslauf	43
12.1 Eigene Publikationen	45
12.2 Abstracts	45
13 Danksagung	47

1 Abkürzungen

BP2	Benzophenon 2
CH	congenitale (angeborene) Hypothyreose
dHPLC	denaturierende Hochdruck Flüssigkeits Chromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosobent assay
ED	endokrine Disruptoren
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FTC-Zellen	humane follikuläre Schilddrüsen-Karzinomzellen
MCT8	Monocarboxylat-Transporter 8
NIS	Natrium-Iodid Symporter
NP	4-Nonylphenol
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SDH	Schilddrüsenhormon
SSCP	single-strand conformation polymorphism
TG	Thyreoglobulin
TPO	Schilddrüsenperoxidase
TR	Schilddrüsenhormon-Rezeptor
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
WT	Wildtyp

Einbuchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Störungen der Schilddrüsenhormonsynthese und des Schilddrüsenhormontransportes

Autor

Petra Ambrugger

2 Abstract

Schilddrüsenhormone sind entscheidend an Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt, u.a. auch an der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Störungen in der Synthese- oder Verfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen führen zu Erkrankungen, wie der angeborenen Hypothyreose. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl genetische (Mutationen im Schilddrüsenperoxidase-Gen, Mutationen im Monocarboxylat-Transporter 8-Gen) als auch exogene Faktoren (endokrine Disruptoren) untersucht, die zu Störungen der Schilddrüsenhormonsynthese bzw. zu Störungen in der Verfügbarkeit der Schilddrüsenhormone führen. Bei 39 Patienten mit angeborener Hypothyreose und vorhandener Schilddrüse konnte eine Mutation im Gen für die Schilddrüsenperoxidase (TPO) mittels SSCP, dHPLC und Sequenzierung identifiziert werden. Zwei dieser Patienten hatten eine Mutation in Exon 14 und entwickelten im Alter von 14 Jahren Neoplasien.

Ein weiterer Defekt, der die Verfügbarkeit von Schilddrüsenhormon beeinträchtigt, konnte auf eine Mutation im schilddrüsenhormon-spezifischen Transporter MCT8 zurückgeführt werden. Der betroffene Patient mit der Mutation A150V zeigte ein gänzlich neues Krankheitsbild bei X-chromosomaler mentaler Retardierung: Seine biochemischen Schilddrüsenhormonwerte deuten weder auf eine angeborene Hypothyreose noch auf eine Schilddrüsenhormonresistenz hin. Vielmehr konnte mit In-vitro-T₃-Aufnahmestudien und Immunfluoreszenz-Studien gezeigt werden, dass der veränderte MCT8(A150V)-Transporter nicht in der Lage ist, T₃ zu transportieren.

Zusätzlich zu genetischen Defekten der TPO und des MCT8 wurde der Einfluß von exogenen Faktoren untersucht. Dabei konnte der Einfluß von endokrinen Disruptoren auf die Funktionsfähigkeit der TPO mit Hilfe von In-vitro-Assays mittels stabil rekombinanter humaner TPO exprimierenden Zelllinien, nachgewiesen werden.

3 Einleitung

Schilddrüsenhormone steuern und beeinflussen vielfältige Entwicklungsprozesse, wie z.B. das Längenwachstum, die Knochenreifung und die Entwicklung des zentralen Nervensystems. Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen bei Neugeborenen führt zur congenitalen Hypothyreose (CH), welche unbehandelt eine der häufigsten Ursachen der mentalen Retardierung ist. Mit einer Inzidenz von 1:3500 Neugeborenen stellt die CH die häufigste angeborene endokrinologische Erkrankung dar. Sie umfasst zu 75-80% Dysgenesien und zu 15-20% Biosynthesedefekte (1,2,3). Das Schlüsselenzym in der Biosynthese von Schilddrüsenhormonen ist die Schilddrüsenperoxidase (TPO). Sie ist in der apikalen Zellmembran des Schilddrüsenfollikels verankert und katalysiert sowohl die Oxidation des anorganischen Iodids als auch die Kopplungsreaktion an Thyreoglobulin. Bisher sind über 40 verschiedene Mutationen in der TPO bei Patienten mit permanenter angeborener CH und vorhandener, häufig vergrößerter Schilddrüse bekannt. In Deutschland gibt es bisher außer zwei eigenen Untersuchungen (4,5) keine Studie zur Häufigkeit von TPO Mutationen. Neben Störungen in der Schilddrüsenhormon (SDH)-Synthese kann es auch Defekte in der SDH-Wirkung geben. Bisher wurde angenommen dass T_3 und T_4 passiv, durch Diffusion in die Zielzellen gelangen. Kürzlich wurde jedoch von einer kooperierenden Arbeitsgruppe in Rotterdam (6) ein SDH-spezifischer Transporter identifiziert, der Monocarboxylat Transporter 8 (MCT8). Patienten mit Mutationen im MCT8 Gen zeigen eine extreme muskuläre Hypotonie sowie eine schwere Störung der motorischen und kognitiven Entwicklung (7). Es handelt sich dabei um ein neues Krankheitsbild, welches weder einer CH noch einer SDH-Resistenz entspricht. Durch funktionelle Untersuchungen bei Patienten vorkommender Mutationen kann ein Einblick in die Funktionsweise des Transporters gewonnen werden und ein besseres Verständnis des Phänotyps der Patienten erreicht werden. Neben genetisch bedingten Störungen in der Versorgung mit Schilddrüsenhormonen beeinflussen auch exogene Faktoren die Verfügbarkeit von T_3 und T_4 . Endokrine Disruptoren (ED) sind chemische Substanzen, die strukturelle Ähnlichkeit mit Hormonen aufweisen und die hormonelle Feinsteuerung des Organismus erheblich beeinträchtigen. So kann die Biosynthese von Schilddrüsenhormonen durch Inaktivierung der TPO durch ED entscheidend beeinträchtigt sein (8). Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zur Wirkung endokriner Disruptoren auf die Schilddrüse vor.

4 Zielstellung

Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen zur Klärung des Zusammenhangs von phänotypischer Ausprägung, Häufigkeit und Funktionsweise genetischer (TPO, MCT8) sowie exogener Faktoren (ED) beitragen, die Störungen in der Verfügbarkeit oder Wirkung von Schilddrüsenhormonen hervorrufen.

5 Patienten und Methoden

5.1 Patienten

5.1.1 Screening nach Mutationen im TPO-Gen

Die untersuchten Patienten hatten eine angeborene Hypothyreose bei vorhandener und regelrecht angelegter Schilddrüse. Die Patienten stammten aus verschiedenen Screening-Zentren in Deutschland sowie Einsendern aus anderen europäischen Ländern (Frankreich, Schweiz, Polen).

5.1.2 Patient mit einer Mutation im MCT8-Gen

Der Patient fiel im Alter von vier Monaten durch extreme Muskelhypotonie sowie schwere mentale Retardierung auf. Die Schilddrüsenhormonwerte entsprachen keinem bekannten Krankheitsbild: Trijodthyronin (T_3) war stark erhöht, bei leicht erniedrigtem Thyroxin (T_4) und normalem Schilddrüsen stimulierendem Hormon (TSH).

5.2 Methoden

5.2.1 Screening nach Mutationen im TPO-Gen

Mit Hilfe des Qia Amp Blood Kits (Qiagen, Hilden) wurde aus peripheren Leukozyten im Vollblut genomische DNA isoliert. Mittels PCR wurden daraufhin die Fragmente der kodierenden Exons (2-17) amplifiziert und auf Mutationen hin untersucht. Konnte eine Mutation auf nur einem Allel nachgewiesen werden, wurden zusätzlich 840 Basenpaare des Promoters untersucht. Die Mutationsanalyse wurde durch Screening mittels SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), dHPLC (denaturierender high pressure liquid Chromatographie), Enzymverdau und anschließender Sequenzierung durchgeführt.

5.2.2 Herstellung der stabilen Linien WT^{TPO}, WT^{MCT8}, MCT8^{A150V}

Die Kultivierung humaner follikulärer Schilddrüsenkarzinomzellen (FTC) erfolgte in basal Iscove's Medium mit 1 g Glucose pro Liter (Biochrom, Berlin), 10% fötalem Kälberserum (FKS) (PAA Laboratories, Linz), 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin) mit 5%igem CO₂ bei 37°C. Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (Biochrom, Berlin) und 2x10⁶ Zellen in eine 10cm Schale ausgesetzt. Zur Transfektion wurden die Zellen zweimal mit FKS freiem Medium gewaschen und 10µg Plasmid DNA mit Lipofektamin Plus (Invitrogen, Leek, NL), nach Herstellerangaben transfiziert. Nach drei Tagen begann die Selektion nach Zellen, die das Insert aufgenommen hatten. Dazu wurde dem Medium 700µg/ml Neomycin hinzugegeben. Die Neomycin-Resistenz des Vectors pCDNA3 (Invitrogen, Leek, NL) diente zur Auswahl derjenigen Zellen, die das gewünschte Insert stabil exprimieren. 12 Klone wurden vereinzelt und auf ihre enzymatische Aktivität mittels Guaiacol Assay getestet. Der Klon mit der größten enzymatischen Aktivität (FTC^{TPO}) wurde in den folgenden Experimenten

benutzt. Die Klone WT^{MCT8} bzw. MCT8^{A150V} wurden mittels Immunfärbung über den HA-Tag ausgewählt.

5.2.3 Etablierung des Guaiacol Assays zur Selektion einzelner Klone

Für den Guaiacol Assay zur Messung der Enzymaktivität des extrahierten Proteins wurde eine Endkonzentration von 70mM Guaiacol (Sigma, Deisenhofen) in PBS pH 7,4 mit 1% Tween 20 (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 8,7. Die Endkonzentration des Startreagenz H₂O₂ (Merck, Darmstadt) betrug 0,5 mM. Die photometrische Messung der Absorptionzunahme erfolgte bei einer Wellenlänge von 470nm in der Cobas Fara (Roche, Mannheim).

5.2.4 Sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Für die Untersuchung der Protein-Protein Interaktion wurde der MCT8^{WT} und die Mutante MCT8^{A150V} jeweils mit einem N-terminalen HA (Hämagglutinin) und einem C-terminalen Flag-Epitop versehen. Mit Hilfe dieser Konstrukte wurde ein Sandwich ELISA zum Nachweis der Dimerisierung durchgeführt. Details siehe Publikation 2 S. 363

5.2.5 Immunfluoreszenzstudien

Um Informationen zum Verbleib von MCT8^{A150V} in der Zelle zu erhalten, wurden MCT8^{WT} und die Mutante MCT8^{A150V} stabil in FTC-238 Zellen exprimiert, mittels N-Terminalem HA-Antikörper markiert und mit FITC-markiertem anti-Maus-igG als zweitem Antikörper visualisiert. Details siehe Publikation 2 S. 363

5.2.6 Statistik

Die Analyse der Sandwich Elisa Daten fand mit Hilfe der Statistik-Software SPSS (Version 12.0.1) statt. Unterschiede in der Aktivität zwischen der Negativkontrolle MC4R-NHA ko-transfiziert mit MCT8-CFL und dem zu testenden Konstrukt MCT8-NHA ko-transfiziert MCT8-CFI wurden mit einer One-way Anova und anschließendem Tukey Test auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Die Ergebnisse wurden als signifikant gewertet, wenn die ermittelten p-Werte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% hatten.

6 Resultate

Defekte im Schilddrüsenperoxidase-Gen und dem Monocarboxylat-Transporter 8-Gen führten zum Fehlen oder einer Änderung in der Verfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen bei den Kindern in der wichtigen Phase der Entwicklung, insbesondere des ZNS. Darüber hinaus beeinflussten auch chemische Substanzen die Funktion der Schilddrüse, z.B. durch Verminderung der enzymatischen Aktivität der Schilddrüsenperoxidase.

6.1 Häufigkeit von Mutationen im Schilddrüsenperoxidase-Gen bei Patienten mit angeborener Hypothyreose

Bei 39 von insgesamt 77 untersuchten Patienten mit vorhandener und regelrecht angelegter Schilddrüse wurden Mutationen im TPO-Gen detektiert. In 41% der insgesamt untersuchten Allele wurde eine Mutation nachgewiesen. Davon traten 11 homozygot und 12 gemischt heterozygot auf. Bei 15 Patienten befand sich die Mutation auf nur einem Allel. Die am häufigsten identifizierte Mutation war die GGCC-Duplikation in Exon 8 des TPO-Gens. Diese Leseraster-Mutation wurde bei drei Patienten homozygot, bei 8 Patienten gemischt heterozygot und bei 11 Patienten auf nur einem Allel gefunden. Sechs Patienten mit Mutation im TPO-Gen besaßen hinsichtlich der Schilddrüsengröße ein unauffälliges Organ. Dagegen trat bei 24 Patienten eine Struma, bei drei Patienten eine vielknotige Struma und bei zwei Patienten im Alter von 14 Jahren Neoplasien auf. Für vier Patienten mit Mutation im Schilddrüsenperoxidase-Gen waren keine Daten zur Größe der Schilddrüse verfügbar. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Korrelation zwischen der Ausbildung von vielknotiger Struma und Neoplasien sowie der Lage der Mutation im TPO-Gen. Nur Mutationen in Exon 14 des TPO-Gens waren bei einem Patienten mit einem follikulärem Adenom (T2512del heterozygot) und bei einem weiteren Patienten mit einem papillärem Karzinom (E799Q gemischt heterozygot mit Q660E) assoziiert (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammenfassung der identifizierten Mutationen im TPO-Gen.

Patient	Exon / Mutation																	Schilddrüse					
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	normal	angeb. Struma	Struma	vielknotige Struma	Adenom	Karzinom	
1	Y55X																hom	X					
2							R291H										hom		X				
3							G319R										hom			X			
4							ins 25Bp										hom				X		
5							ins ggcc										hom	X					
6							ins ggcc										hom	n.d.					
7							ins ggcc										hom	n.d.					
8							N217S	ins ggcc									c het				X		
9							N217S	ins ggcc									c het				X		
10							A242L	ins ggcc									n.d.				X		
11							ins ggcc	Y453D									c het		X				
12							ins ggcc		L564P								c het		X				
13							ins ggcc		R540Q								c het		X				
14							ins ggcc			Q660E							c het		X				
15							ins ggcc						W873X				c het		X				
16							ins ggcc										het	X	X				
17							ins ggcc										het	X					
18							ins ggcc										het		X				
19							ins ggcc										het		X				
20							ins ggcc										het		X				
21							ins ggcc										het		X				
22							ins ggcc										het		X				
23							ins ggcc										het		X				
24							ins ggcc										het	n.d.					
25							ins ggcc										het	n.d.					
26							ins ggcc										het				X		
27								L458P									hom						
28	ins 20Bp							R491H									c het	X					
29								R531H									het				X		
30									L542R								hom				X		
31																	hom				X		
32													del T				hom				X		
33								Y453D					del T				c het	X			X		
34								Y453D					D834N				c het				X		
35										Q660E			D834N				c het				X		
36										Q660E			E799Q				c het					X	X
37										Q660E			E799Q				c het					X	
38													del T				het					X	
39													del T				het					X	

n.d.: Daten nicht verfügbar

ins.: Insertion

del.: Deletion

hom.: homozygot

het.: heterozygot

c het.: compound heterozygot

Bp.: Basenpaare

angeb.: angeborene

6.2 Funktionelle Charakterisierung der Mutante A150V im Monocarboxylat-Transporter 8-Gen

Patienten mit einer Mutation im MCT8-Gen zeigen ein neues Krankheitsbild. Sie sind schwer mental retardiert und haben eine extreme Muskelhypothonie. Auffällig sind vor allem die extrem erhöhten T_3 Werte bei normalem Schilddrüsen-stimulierendem Hormon (TSH). MCT8 transportiert vor allem T_3 aber auch T_4 durch die Plasmamembran. Allerdings ist über den Zusammenhang von Struktur und Funktionsweise des MCT8 bisher nur wenig bekannt. Um den Phänotyp unseres Patienten mit der Mutation A150V besser zu verstehen, wurden funktionelle Studien durchgeführt. Der Vergleich des Wildtyps (WT) MCT8 mit der Mutante A150V zeigte im transienten Überexpressionssystem des T_3 -Aufnahme-Assays einen völligen Funktionsverlust des veränderten Proteins. Um eine Erklärung für das Fehlen der Transportfunktion finden zu können, wurden Immunfluoreszenzstudien mit dem Wildtyp MCT8 oder der Mutante A150V in stabil exprimierenden FTC238 Zellen durchgeführt. Die Immunfluoreszenzstudien dokumentierten einen deutlichen Unterschied in der Verteilung des Proteins in der Zelle. Der Wildtyp MCT8 war in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert. Im Gegensatz dazu war bei der Mutante A150V nahezu kein MCT8 in der Plasmamembran sichtbar. Das mittels FITC markiertem Sekundärantikörper detektierte MCT8 Protein war über das gesamte Zytoplasma der Zelle verteilt und in Vesikeln lokalisiert. Als weiterer Ansatz zur Klärung des Funktionsverlustes wurde ein Sandwich Elisa durchgeführt. Diese Methode erlaubt es über differentiell mit Antikörpern markierte Konstrukte, Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen. Der Sandwich Elisa zeigte, dass MCT8 mit sich selbst Homodimere ausbildet. Es konnte kein Unterschied der Dimerisierung von WT-MCT8 und der Mutante A150V ermittelt werden. Der hohe Messwert der Absorption, welche die Dimerisierung von MCT8 wiedergibt, entsprach dem Wert für das doppelt getaggte Kontrollprotein. Dies könnte auf eine Multimerisierung des MCT8 hinweisen.

6.3 Einfluß von endokrinen Disruptoren (EDC) auf die Aktivität der rekombinanten humanen Schilddrüsenperoxidase

Endokrine Disruptoren sind in zahlreichen Produkten des täglichen Lebens wie Plastikmaterial, Sonnencremes oder Lacken enthalten. Mit Hilfe der Zelllinie FTC^{TPO}, wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Aktivität des Enzyms mittels Guaiacol Assay untersucht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der stabilen Zelllinie FTC^{TPO} der Aktivität von humanem Struma-Gewebe entspricht (siehe Tabelle 2). Zudem ließ sich mit dieser Zelllinie der Einfluss von chemischen Substanzen auf die Aktivität des Enzyms reproduzierbar nachweisen. Mit In-vitro-Assays mit der Zelllinie FTC^{TPO} konnte gezeigt werden, dass 4-Nonylphenol (Np), welches ein Inhaltsstoff von Plastik und Lacken ist, F21338 (einem

synthetischen Flavonoid), Bisphenol A und der UV Filter Benzophenon 2 die humane rekombinante Schilddrüsenperoxidase hemmen.

Tabelle 2: Ergebnisse des Guaiacol Assays für verschiedene Membranpräparationen.

Zellen	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$]	Probe	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$]
Extrakt 1	40,2 \pm 1,0	Struma 21	49,0 \pm 4,2
Extrakt 2	36,0 \pm 1,6	Struma 22	50,0 \pm 2,4
Extrakt 3	45,5 \pm 4,4	Struma 23	37,7 \pm 2,3

7 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Funktion der Schilddrüsenperoxidase durch endogene und exogene Einflüsse beeinträchtigt sein kann. Zudem kann der Transport von Schilddrüsenhormonen durch Mutationen im Monocarboxylat 8-Gen gestört sein. Als endogene Faktoren konnten monogen vererbte Alterationen des Schilddrüsenperoxidase-Gens sowie des Monocarboxylat-Transporters 8-Gens identifiziert werden. Im Bereich der exogenen Faktoren wurde eine Reihe von Substanzen, welche die Funktion der Schilddrüsenperoxidase hemmen, detektiert.

7.1 Mutationen im Schilddrüsenperoxidase-Gen

Mutationen im TPO-Gen wurden bei Patienten mit angeborener Hypothyreose in 41% der untersuchten Allele identifiziert. Bisher wurden insgesamt über 40 verschiedene Mutationen bei Patienten mit primärer Hypothyreose nachgewiesen (9). Fünf der identifizierten Mutationen waren bereits beschrieben, 15 Mutationen waren neu. Die häufigste Mutation unserer aus verschiedenen europäischen Ländern stammenden Patienten war die GGCC-Duplikation in Exon 8 des TPO-Gens, sie trat in 32% der untersuchten Allele auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer niederländischen Studie, die bei 46 untersuchten Familien die GGCC-Duplikation in 36% aller untersuchten Allele detektierte (10). Die GGCC-Duplikation führt zu einem frühzeitigen Stopp in Exon 9 des TPO-Gens und wurde erstmals 1992 als Funktionsverlustmutation bei einem Patienten mit Struma beschrieben (11). Insgesamt konnten bei 23 Patienten Mutationen im TPO-Gen auf beiden Allelen nachgewiesen werden. Aufgrund des autosomal rezessiven Erbgangs kann die Ursache der Erkrankung für diese Patienten als geklärt, gelten. In 15 Fällen wurde eine TPO-Gen Mutation auf nur einem Allel identifiziert, eine zweite Mutation konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise liegt die zweite Mutation in einem Bereich des Gens, der nicht untersucht wurde wie den großen Intron-Bereichen.

Fehlerhaftes Spleißen kann nur mit Hilfe von Schilddrüsengewebe, mittels reverser Transkription und anschließender Polymerase-Kettenreaktion gezeigt werden, welches uns jedoch nicht zur Verfügung stand. Zudem kann sich eine Mutation auch dann ausprägen, wenn das mutierte Allel bevorzugt transkribiert wird. Für die TPO konnte die monoallelische Expression einer Mutation mittels Schilddrüsengewebe gezeigt werden (12). Der gleiche Mechanismus liegt vor, wenn die Transkription des intakten Allels aufgrund epigenetischer Faktoren verhindert wird. In der Literatur sind Beschreibungen von 12 Patienten mit schwerer angeborener Hypothyreose und nur einer identifizierten Mutation zu finden (13). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unbekannt.

Der Phänotyp der Patienten mit Mutationen im TPO-Gen reicht von einem partiellen bis zum totalen Funktionsverlust des Enzyms. Die Patienten haben oft eine angeborene Struma oder entwickeln trotz ausreichender Substitution mit L-Thyroxin (L-T₄) eine vergrößerte Schilddrüse. Dennoch sind maligne Veränderungen der Schilddrüse bei Kindern mit TPO-Mutation selten. In der Literatur sind lediglich zwei Patienten mit follikulärem Karzinom (14), beziehungsweise follikulärem Adenom (15) und einer C-Insertion in Exon 14 des TPO-Gens beschrieben. Auch bei den von uns untersuchten Patienten entwickelten zwei Patienten mit einer Mutation in Exon 14 des TPO-Gens, der *epidermal growth factor* (EGF)-ähnlichen Domäne (16), Neoplasien. Beide Patienten wurden im Alter von 14 Jahren operiert.

Die Ergebnisse des Mutations-Screenings im TPO-Gen haben eine direkte klinische Relevanz, da Mutationen in der TPO häufig die Ursache für einen Biosynthesedefekt sind. Bei Patienten mit orthotoper Schilddrüse, Struma, erhöhten Thyreoglobulin (TG)- und TSH Werten konnte im Großteil der Fälle die Erkrankung durch eine Mutation im TPO- Gen erklärt werden. Der für die Kinder belastende Perchloratstest sowie der Auslassversuch im zweiten Lebensjahr ist für Patienten mit einer Funktionsverlustmutation im TPO-Gen deshalb nicht mehr notwendig. Zusammenfassend läßt sich außerdem schlußfolgern, dass Patienten mit einer Mutation in Exon 14 des TPO-Gens regelmäßige Ultraschalluntersuchungen und eine gut eingestellte Substitution mit L-T₄ erhalten sollten, um adenomatöse oder maligne Veränderungen früh zu erkennen bzw. ganz zu verhindern.

7.2 Funktionelle Untersuchungen zum Monocarboxylat-Transporter 8-Gen

Das sich entwickelnde Gehirn ist besonders sensitiv für das physiologisch aktive Schilddrüsenhormon T₃ und exprimiert nukleäre T₃ Rezeptoren ab der 10. Schwangerschaftswoche (17). Bei Patienten mit Schilddrüsenhormonresistenz wurden Mutationen im Schilddrüsenhormon-Rezeptorß (TRß) beschrieben. Die biochemischen Schilddrüsenhormonwerte dieser Patienten zeigen Auffälligkeiten mit einem erhöhten freien T₄ und T₃ bei normalen oder erhöhtem Serum TSH. Der Index Patient stimmte nicht mit diesem Phänotyp überein: T₃ war im Serum stark erhöht und T₄ leicht erniedrigt, TSH lag im oberen Normbereich. Dennoch wurde mit der Sequenzierung des Schilddrüsenhormon-Rezeptorß eine Mutation in diesem Gen

ausgeschlossen. Die Klärung der genetischen Ursache der Erkrankung des Patienten gelang erst mit dem Nachweis der Funktion von MCT8. Der humane MCT8 wurde bereits 1994 kloniert (18), seine physiologische Funktion des SDH Transportes wurde jedoch erst 2003 von Friesema et al. gezeigt (4). Die funktionellen Untersuchungen in Oocyten von *Xenopus laevis* ergaben für MCT8 eine 10-fach gesteigerte Aufnahme von T_3 , rT_3 , T_4 und $3,3'$ - T_2 . MCT8 hat im Vergleich zu anderen Iodothyronin transportierenden Transportern (wie den anorganischen Anionentransportern OATP-A und NTCP und dem L-Typ Aminosäure Transporter LAT1) die höchste Aktivität und zeigt eine leichte Präferenz für T_3 als Ligand (19). Die Sequenzierung des MCT8-Gens bei unserem Patienten zeigte einen Austausch von Alanin zu Valin an Aminosäureposition 150 in der zweiten von insgesamt 12 Transmembran Domänen des Transporters (7). Seither wurden mehrere Mutationen bei Patienten mit X-chromosomaler mentaler Retardierung und erhöhten T_3 Werten publiziert (20-23). Unsere Arbeit zur Mutation A150V konnte eine funktionelle Auswirkung belegen. Aufgrund des völligen Funktionsverlustes der Transportfähigkeit stellte sich die Frage nach einem intrazellulären Positionsdefekt. Mit Hilfe der stabilen Linie FTC^{A150V} konnte gezeigt werden, dass das mutierte Protein nicht mehr an die Zelloberfläche gelangt und fast vollständig in Zellvesikeln vorliegt. Vermutlich handelt es sich dabei um Vesikel des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgi-Apparates. Ein weiterer Ansatz zur Erklärung des Funktionsverlustes sind Untersuchungen zu Protein-Protein Interaktionen. Für G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren ist das Konzept der Dimerisierung zur Ausbildung eines funktionsfähigen Rezeptors seit längerem akzeptiert (24). Ebenso häufen sich die Indizien dafür, dass eine Vielzahl von Transportern als Oligomere vorliegen (25,26). Zur Untersuchung der Dimerisierung des mutierten MCT8-Proteins wurde ein Sandwich Elisa mit differentiell markierten Konstrukten gewählt. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass MCT8 Homodimere ausbildet. Die Mutation A150V beeinflusste nicht die Ausbildung von Dimeren (27). Weitere Untersuchungen zur Notwendigkeit von Oligomerisation oder Heterodimerisierung für die Funktion des MCT8-Transporters werden zu einem besseren Verständnis der Bedeutung von MCT8 für die frühe Entwicklung des zentralen Nervensystems führen.

7.3 Einfluß endokriner Disruptoren auf die Schilddrüsenperoxidase

Der Einfluß von endokrinen Disruptoren wurde von Hertz 1958 für den Steroid-Zyklus von Rindern beschrieben (28). Seither wurden endokrine Disruptoren intensiv bezüglich ihres Einflusses auf das Reproduktionssystem von verschiedenen Tierarten und dem Menschen untersucht (29). Zum Einfluß von chemischen Substanzen auf das Hormonsystem der Schilddrüse ist bisher jedoch relativ wenig bekannt. Vor 45 Jahren wurde beobachtet, dass Neugeborene, welche mit Soyamilch ernährt wurden, eine Struma aufgrund von fehlender Jodzufuhr entwickelten (30). Später konnte gezeigt werden, dass die in der Soyamilch enthaltene Isoflavon-Komponente Genistein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die

Schilddrüsenperoxidase inhibiert (31). Genistein inhibierte in unserem in vitro Testsystem mit rekombinanter TPO aus FTC^{TPO} Zellen die Schilddrüsenperoxidase. Soya alleine oder in unterschiedlichen Kombinationen mit endokrinen Disruptoren führte in vivo zu einer Abnahme von T4, was mit einer Beeinträchtigung der Funktion der Schilddrüsenperoxidase erklärt werden kann. Neben Genistein inhibierte auch NP die Schilddrüsenperoxidase in vitro allerdings in hohen Konzentrationen, wie sie physiologisch nicht zu finden sind (32). Diese Ergebnisse zeigen, dass die stabile Zelllinie FTC^{TPO} ein sehr geeignetes Modell ist, um den Einfluß von endokrinen Disruptoren auf die Schilddrüsenperoxidase reproduzierbar zu untersuchen. Ebenso wie Mutationen im TPO-Gen könnte eine exogene Inhibierung der TPO zu einer Hypothyreose führen. In vivo-Experimente an Ratten zeigten geringe Schwankungen in einzelnen Schilddrüsenparametern (32, 33).

7.4 Ausblick

Die Untersuchungen zu Mutationen im TPO-Gen haben direkte klinische Relevanz. Die Möglichkeit aufgrund von Mutationen in Exon 14 des TPO-Gens schon während der Kindheit maligne Veränderungen zu entwickeln, macht regelmäßige Ultraschalluntersuchungen bei diesen Patienten notwendig. Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch gänzlich unbekannt. Hier sind weiterführende Studien zum Mechanismus der Ausbildung von Neoplasien im Zellexperiment notwendig. Mutationen im MCT8-Gen, die auch von anderen Arbeitsgruppen bei Patienten identifiziert wurden, liefern im in vitro Modell mittels stabiler Zelllinien die Möglichkeit mehr über Struktur-Funktionsbeziehungen des Transporters zu lernen. Zudem sind Lokalisations-Studien mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zum Nachweis des intrazellulären Transportdefektes nötig. Die Zelllinie FTC^{TPO} bietet eine gute Grundlage, um weitere exogene Einflüsse auf die SDH-Synthese in einem in vivo Modell zu testen.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Grüters A, Biebermann H, Krude H. Neonatal thyroid disorders. *Hormone Research* 2003; 59:24-29.
- 2 Grüters A, Krude H, Biebermann H. Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2004;151:U39-U44.
- 3 Park SM & Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *Journal of Medical Genetics* 2005;42:379-389.
- 4 Grüters A, Köhler B, Wolf A, et al. Screening for mutations of the human thyroid peroxidase gene in patients with congenital hypothyroidism. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 1996;104:121-123.
- 5 Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grüters A. Novel mutations of the peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2001;145:19-24.
- 6 Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, et al. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:40128-40135
- 7 Friesema EC, Grüters A, Biebermann H, et al. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 2004;364: 1435-1437.
- 8 Doerge DR & Chang HC Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002;25:269-279.
- 9 Rodrigues C, Jorge P, Soares JP, et al. Mutation screening of the thyroid peroxidase gene in a cohort of 55 Portuguese patients with congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2005;152:193-198.
- 10 Bakker B, Bikker H, Vulsma T, De Randamie JSE, Wiedijk BM, De Vijlder JJ. Two decades of Screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000;85:3708-3712.
- 11 Abramovicz MJ, Tarkovnik HM, Varla V, et al. Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter. *The Journal of Clinical Investigation* 1992;90:1200-1204.

- 12 Fugazzola L, Cerutti D, Mannavola D, et al. Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing Total Iodide Organification Defect. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003;**88**:3264-3271.
- 13 Fugazzola L, Mannavola MCV, Cirello V, Weber G, Beck-Peccoz P, Persani L. Total Iodide organification defect: clinical and molecular characterization of an Italian family. *Thyroid* 2005;15:1085-1088.
- 14 Medeiros-Neto G, Gil-Da-Costa MJ, Santos CLS, et al. Metastatic thyroid carcinoma arising from congenital goiter due to mutation in the thyroperoxidase gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998; 83:4162-4166.
- 15 Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Maesaka H, Tachibana K, Ohtaki S. A novel mutation in the human thyroid peroxidase gene resulting in a total iodide organification defect. *Journal of Endocrinology* 1999;160:267-273.
- 16 Hobby P, Gardas A, Radomski R, McGregor AM, Banga JP, Sutton BJ. Identification of an immunodominant region recognized by human autoantibodies in a three-dimensional model of thyroid peroxidase. *Endocrinology* 2000;141:2018-2026.
- 17 Bernal J & Pekonen F. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. *Endocrinology* 1984;114:677-679.
- 18 Lafreniere RG, Carrel L, Willard HJ. A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene Xq 13.2. *Human Molecular Genetics* 1994;3:1133-1139.
- 19 Friesema ECH, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Biochemical Society Transactions* 2005;33:228-232.
- 20 Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *The American Journal of Human Genetics* 2004;74:168-175.
- 21 Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, et al. Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *The American Journal of Human Genetics* 2005;77:41-53.
- 22 Kakinuma H, Itoh M, Takahashi H. A novel mutation in the monocarboxylate transporter 8 gene in a boy with putamen-lesions and low free T4 levels in cerebrospinal fluid. *The Journal of Pediatrics* 2005;147:552-554.

- 23 Maranduba CM, Friesema EC, Kok F, et al. Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Journal of Medical Genetics* 2006;43:457-460.
- 24 Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Reviews Neuroscience* 2001;2:274-286.
- 25 Yernool D, Boudker O, Jin Y, Gouaux E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* 2004;431:811-818.
- 26 Hong M, Xu W, Yoshida T, Tanaka K, et al. Human organic anion transporter hOAT1 forms homooligomers. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280:32285-32290.
- 27 Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grüters A. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *European Journal of Endocrinology* 2005;153:359-66.
- 28 Gassner FX, Reifenstein EC, Algeo JW, Mattox WE. Effects of hormones on growth, fattening, and meat production potential of livestock. *Recent Progress in Hormone Research* 1958;14:183-217.
- 29 Mc Lachlan J. Environmental Signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Reviews* 2001;22:319-341.
- 30 Van Wyk JJ, Arnold MB, Wynn J, Pepper F. The effects of a soybean product on thyroid function in humans. *Pediatrics* 1959;24:752-760.
- 31 Doerge DR & Chang HC. Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography B* 2002;777:269-279.
- 32 Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, et al. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004; 205:95-102.
- 33 Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE, Main KM. Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology* 2006;154:599-611.

9 Publikationen

Die Seiten 18-39 umfassen folgende Originalartikel:

[1] Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grüters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2001;145:19-24.

[2] Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grüters A. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *European Journal of Endocrinology* 2005;153:359-366.

[3] Schmutzler C, Hamann I, Hofmann P J, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, Ambrugger P, Grüters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004;205: 95-102.

10 Anteilserklärung

Frau Petra Ambrugger hat ihre experimentelle kumulative Doktorarbeit mit dem Thema „Störungen der Schilddrüsenhormonsynthese und des Schilddrüsenhormontransportes“ angefertigt. Grundlage für die kumulative Promotion sind folgende drei Publikationen:

[1] **Ambrugger P**, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grütters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2001;145:10-24.

Diese Arbeit beschreibt das Screening nach Mutationen im Schilddrüsenperoxidase-Gen, der häufigen Ursache eines Biosynthesedefektes. Frau Ambrugger hat die Bedingungen für die PCR und die SSCP etabliert. Zudem hat sie die Sequenzierung mit den Sequenziergeräten ABI 377, ABI 3100 und die Analysen mittels Restriktionsanalysen durchgeführt. Darüber hinaus hat sie in der fortlaufenden Studie das Screening mittels dHPLC etabliert und durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass Mutationen im TPO-Gen häufig die Ursache für die angeborene Hypothyreose bei vorhandener Schilddrüse sind. Die untersuchten Patienten waren nicht durch einen Perchloratstest vorselektioniert und stellen daher im Vergleich zu anderen Arbeiten eine weniger definierte Patientengruppe dar. Der Anteil von Frau Ambrugger an dieser Arbeit ist mit mindestens 90% einzustufen.

[2] Biebermann H, **Ambrugger P**, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grütters A. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *European Journal of Endocrinology* 2005;153:359-66.

In dieser Publikation mit Frau PD Dr. Biebermann als Erstautorin wurde der Phänotyp des Patienten mit der Mutation A150V im Monocarboxylat-Transporter 8-Gen detailliert beschrieben. Die Untersuchungen zur funktionellen Auswirkung der Mutation zeigen, dass durch den Austausch der Aminosäure Alanin zu Valin an Nukleotidposition 150 der Transport von Schilddrüsenhormon mittels MCT8 nicht mehr gegeben ist. Frau Ambrugger hat die differentiell getaggtten Epitope hergestellt und die Sandwich-Elisa Daten erhoben. Durch diese Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass MCT8 Homodimere ausbildet. Zudem konnte durch Immunfluoreszenzstudien der Verbleib des mutierten Proteins MCT8^{A150V} nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu MCT8^{WT} war das mutierte Protein hauptsächlich innerhalb der Zelle in Vesikeln lokalisiert und kaum in der Plasmamembran zu finden. Der Anteil von Frau Ambrugger an dieser Arbeit beträgt etwa 40%.

[3] Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, **Ambrugger P**, Grütters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. Toxicology 2004;205:95-102.

Diese von Frau PD Dr. Schmutzler als Erstautorin veröffentlichte Arbeit beschreibt den Einfluß von endokrinen Disruptoren auf die stabil, rekombinante humane TPO exprimierende Zelllinie FTC^{TPO}. Die Zelllinie wurde von Frau Ambrugger hergestellt und der Guaiacol Assay zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität etabliert. Der Anteil von Frau Ambrugger an dieser Arbeit ist bei 10% anzusetzen.

Darüber hinaus ist eine vierte Publikation zu weiteren endokrinen Disruptoren bereits eingereicht, der Anteil von Frau Ambrugger liegt in dieser Arbeit ebenfalls bei 10%.

Prof. Dr. Annette Grütters

Petra Ambrugger

Erklärung

„Ich, Petra Ambrugger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Störungen der Schilddrüsenhormonsynthese und des Schilddrüsenhormontransportes“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 27.09.06

Petra Ambrugger

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

12.1 Eigene Publikationen

Elsner A, Tarnow P, Schaefer M, **Ambrugger P**, Krude H, Grüters A, Biebermann H. MC4R oligomerizes independently of extracellular cysteine residues. *Peptides* 2006;27:372-9.

Biebermann H, **Ambrugger P**, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grüters A. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *European Journal of Endocrinology* 2005;153:359-66.

Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, **Ambrugger P**, Grüters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004;205:95-102.

Varon R, Gooding R, Steglich C, Marns L, Tang H, Angelicheva D, Yong KK, **Ambrugger P**, Reinhold A, Morar B, Baas F, Kwa M, Tournev I, Guerguelcheva V, Kremensky I, Lochmüller H, Mullner-Eidenbock A, Merlini L, Neumann L, Burger J, Walter M, Swoboda K, Thomas PK, von Moers A, Risch N, Kalaydjieva L. Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nature Genetics* 2003;35:185-189.

Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Torresani T, Leitner C, Grüters A. Novel mutations of the thyroid peroxidase gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2001; 145:10-24.

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, **Ambrugger P**, Grüters A. Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism. *Hormone Research* 2000; 53:suppl 1:12-18.

12.2 Abstracts

Tarnow P, Brumm H, **Ambrugger P**, Rettenbach E, Widhalm K, Hinney A, Hebebrand J, Biebermann H, Grüters A. A heterozygous MC4R mutation in the third transmembrane domain causes a dominant-negative effect. 50th annual meeting of the German Society of Endocrinology (DGE) & 23rd meeting of the Dutch Endocrine Society Essen. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2006;114 suppl 1: 14.

Schmutzler C, Bacinki A, **Ambrugger P**, Huhne K, Grüters A, Köhrle J. Thyroid hormone biosynthesis is a sensitive target for the action of endocrine disrupting chemicals (EDC). 50th annual meeting of the German Society of Endocrinology (DGE) & 23rd meeting of the Dutch Endocrine Society Essen. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2006;114 suppl 1: 14.

Schmutzler C, Bacinski A, **Ambrugger P**, Huhne K, Grüters A and Köhrle J. Thyroid hormone biosynthesis is a sensitive target for the action of endocrine disrupting chemicals (EDC). *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2006;114 suppl. 1:14

Schmutzler C, Hamann I, Bacinski A, **Ambrugger P**, Klammer H, Schlecht C, Wuttke W, Jarry H, Grüters A and Köhrle J. The UV filter benzophenone 2 interferes with thyroid hormone biosynthesis in vitro and disturbs thyroid hormone homeostasis in rats. 8th European Congress of Endocrinology, 1 - 5 April 2006, Glasgow, UK.

Schmutzler C, Bacinski A, **Ambrugger P**, Huhne K, Grütters A and Köhrle J. Endocrine disrupting compounds may interfere with thyroid hormone biosynthesis via inhibition of iodide uptake and organification. 7th European Congress of Endocrinology, 3 – 7 September 2005, Gothenburg, Sweden.

Schmutzler C, Bacinski A, **Ambrugger P**, Huhne K, Grütters A and Köhrle J. In vitro assay systems for the screening of compounds showing endocrine disrupting activities versus the thyroid gland. CREDO Workshop on Endocrine Disrupters, 10 – 12 May 2005, Prague, Czechoslovakia.

Schmutzler C, **Ambrugger P**, Huhne K, Grütters A and Köhrle J 2004 Endocrine disrupters inhibit human thyroid peroxidase. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2004;112 suppl. 1:54

Ambrugger P, Biebermann H, Krude H, Bonnet R, Ris-Stalpers C, de Vijlder JJ, Grütters A: TPO mutations in patients with congenital hypothyroidism: functional characterization in two cell systems. 29th annual meeting of the European Thyroid Association 2003 Edinburgh.

Niedziela M, **Ambrugger P**, Biebermann H, Krude H, Schnabel D, Korman E, Grütters A. TPO gene as a candidate gene in the pathogenesis of thyroid neoplasia of patients with congenital hypothyroidism. 27th annual meeting of the European Thyroid Association 2001 Warsaw.

Ambrugger P, Biebermann H, Krude H, Leitner C, Torresani T, Grütters A. Screening for mutations in the thyroid peroxidase gene in patients with congenital hypothyroidism. *Endocrine Journal* 2000;47 suppl 255.

Ambrugger P, Stoeva I, Biebermann H, Leitner C, Torresani T, Grütters A. Novel mutations of the TPO gene in patients with permanent congenital hypothyroidism. *Hormone Research* 2000; 53 suppl 2:10.

Stoeva I, **Ambrugger P**, Biebermann H, Sefanova E, Mladenova G, Nachev L, Grigorova R, Vassileva B, Peneva L, Grütters A. First results of the mutational screening in the hTPO gene in Bulgarian children with congenital hypothyroidism. *Hormone Research* 2000; 53 Suppl 2: 107.

Brumm H, Hultsch H, **Ambrugger P**, Todt D. Song amplitude varies with song quality during the vocal development of nightingales. In: Adams, N.J. & Slotow, R. H. (eds.) *Proc. 22 Int. Ornithol. Congr. Durban. Ostrich* 1998;69:243-244.

13 Danksagung

Während meiner Arbeit an der Dissertation durfte ich vielfältige fachliche, aber auch persönliche Unterstützung in verschiedenen Bereichen des Lebens erfahren. Hierfür möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Annette Grütters, die mich in meiner Arbeit immer unterstützte und förderte. Durch sie konnte ich schon früh an Kongressen teilnehmen, Kontakte zu anderen Arbeitsgruppen herstellen und viele Aspekte der Schilddrüsenforschung kennenlernen.

PD Dr. Heike Biebermann danke ich für ihr stets vorhandenes Interesse, ihre kompetente Hilfe bei jedem auftretenden Problem und der nie verschlossenen Türe ihres Büros.

PD Dr. Heiko Krude danke ich für erfrischende Diskussionen und klare Gedanken.

Danke allen „neuen“ und „alten“ Mitgliedern der Arbeitsgruppe Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie für die gute Arbeitsatmosphäre, ich habe euch alle als versierte und hilfsbereite Kollegen erlebt.

Prof. Dr. Jan de Vijlder danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung des Guaiacol-Assays.

Vielen Dank allen Eltern, Patienten und Ärzten für das Einsenden des Untersuchungsmaterials.

Prof. Dr. Josef Köhrle und PD Dr. Cornelia Schmutzler danke ich für die Auswahl der Zelllinie FTC^{TPO} als in vitro Modell und die dadurch entstandene Kooperation.

Ich bedanke mich bei der Sonnenfeld-Stiftung für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Bitra Djarrahbachi-Razavi danke ich für viele lange Gespräche am Telefon, bei denen sie mir den Kopf zurechtrückte.

Zuletzt gilt mein Dank Henrik Brumm für die Begleitung durch alle Höhen und Tiefen der letzten Jahre.