

Der L-Typ Aminosäuretransporter 2 als möglicher kompensierender T<sub>3</sub>-Transporter  
bei Mct8-Defizienz: Untersuchung *Slc7a8*-defizienter Mäuse

Struktur-Funktionsanalysen in MCT8 anhand des MCT8-Homologiemodells

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Dipl. Biochem. Doreen Braun**

im Jahre 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2009 bis November 2012 unter der Leitung von PD Dr. Ulrich Schweizer am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Schweizer

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2013

Für die, die mich immer bestärkt haben.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen .....	V
Begriffserklärung .....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung .....	X
Abstract.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Schilddrüse .....	2
1.1.1. Die Schilddrüsenhormone .....	2
1.1.2. Synthese und Abbau der Schilddrüsenhormone.....	4
1.1.3. Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormonwirkung .....	5
1.1.4. Der nukleäre Schilddrüsenhormonrezeptor.....	6
1.1.5. (Fehl-)Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse .....	7
1.2. Schilddrüsenhormone und ihre Wirkung .....	12
1.2.1. Schilddrüsenhormone während der Entwicklung des Gehirns .....	13
1.3. Schilddrüsenhormontransporter .....	15
1.3.1. Monocarboxylattransporter 8.....	16
1.3.1.1. Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom .....	17
1.3.1.2. Das MCT8 <i>knock-out</i> Mausmodell.....	18
1.3.2. L-Typ Aminosäuretransporter 2.....	19
1.3.3. Der Schilddrüsenhormontransport im Gehirn.....	21
1.4. Strukturmodell des Monocarboxylattransporters 8 .....	23
1.4.1. Der Struktur des Glycerol-3-Phosphattransporters als Vorlage für das MCT8- Homologiemodell .....	24
1.5. Tyrosinkinase Inhibitoren.....	26
1.6. Zielstellung.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Materialien .....	28
2.1.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und vorgefertigte Reagenziensysteme .....	28
2.1.2. Geräte, Software und Datenbanken .....	29
2.1.3. Antikörper.....	30
2.1.4. Mauslinie.....	31
2.2. Methoden.....	31
2.2.1. Genotypisierung <i>Slc7a8</i> -defizienter Mäuse .....	31

2.2.2. Rotarod .....	32
2.2.3. Probengewinnung .....	33
2.2.4. Proteinbiochemische Methoden .....	34
2.2.4.1. Western Blot .....	34
<i>Proteinextraktion aus Gewebepulver</i> .....	34
<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	35
<i>Transfer und Immundetektion</i> .....	35
2.2.4.2. Dejodase-Assay .....	36
<i>Aufreinigung des Tracers</i> .....	37
<i>Dejodase-Assay</i> .....	37
<i>Berechnung der Enzymaktivität</i> .....	38
2.2.5. Analyse von Serum- und Urinparametern .....	39
<i>Serum</i> .....	39
<i>Urin</i> .....	39
2.2.6. Molekularbiologische Methoden .....	40
2.2.6.1. <i>Real time</i> Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	40
<i>RNA-Isolation</i> .....	40
<i>cDNA-Synthese</i> .....	40
<i>RT-PCR</i> .....	40
2.2.6.2. Einführung von Mutationen in die Sequenz von MCT8 .....	41
<i>Mutagenese durch PCR</i> .....	41
<i>Hitzeschock-Transformation kompetenter DH5<math>\alpha</math> E.coli</i> .....	42
<i>Sequenzierung</i> .....	43
<i>Präparativer Verdau und Ligation</i> .....	44
<i>Zielgerichtete Mutagenese</i> .....	44
2.2.6.3. cRNA Synthese .....	45
2.2.7. Zellkultur .....	46
2.2.7.1. Primäre Astrozyten .....	46
<i>Aussaat von Astrozyten</i> .....	47
2.2.7.2. MDCK-1 .....	48
<i>Stabile Transfektion der MCT8-Mutanten in MDCK-1 Zellen</i> .....	48
<i>Zellernte und Test auf Expression</i> .....	49
<i>Konservierung stabiler Zellklone</i> .....	49
<i>Oberflächenbiotinylierung</i> .....	50
<i>Aussaat stabil exprimierender MDCK-1 Zellen</i> .....	50
2.2.7.3. <i>Xenopus</i> Oozyten .....	50
<i>Test auf Expression</i> .....	51
2.2.8. Transportstudien mithilfe radioaktiv-markierter Substrate .....	51

2.2.8.1. Berechnung der einzusetzenden Tracermenge .....	51
2.2.8.2. Messung eines Zeitverlaufs .....	52
2.2.8.3. Bestimmung des $K_m$ -Wertes .....	53
2.2.8.4. Efflux radioaktiv-markierter Jodthyronine .....	53
2.2.8.5. Einsatz von Inhibitoren.....	54
2.2.9. Immunhistochemische Analyse.....	54
2.2.9.1. Anfertigung von Gewebeschnitten.....	55
<i>Paraffinschnitte</i> .....	55
<i>Gefrierschnitte</i> .....	55
2.2.9.2. Immunhistochemische Färbungen .....	55
<i>Peroxidase-Färbung von Paraffinschnitten</i> .....	55
<i>Gegenfärbung von Paraffinschnitten mit Hämalaun</i> .....	56
<i>Nissl-Färbung von Gefrierschnitten</i> .....	56
<i>Fluoreszenz-Doppelfärbung von Zellen und Gefrierschnitten</i> .....	57
2.2.9.3. Aufnahme und Bearbeitung von immunhistochemischen Bildern.....	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1. Die Charakterisierung <i>Slc7a8</i> -defizienter Mäuse.....	58
3.1.1. Zielgerichtete Inaktivierung des <i>Slc7a8</i> -Gens in Mäusen.....	58
3.1.2. <i>Slc7a8</i> -Defizienz in Mäusen führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Aminosäuren über den Urin (Aminoazidurie) .....	60
3.1.3. Gestörter Schilddrüsenhormontransport in primären Astrozyten <i>Slc7a8</i> -defizienter Mäuse .....	60
3.1.4. <i>Slc7a8</i> -Defizienz in Mäusen hat keine Auswirkungen auf die Schilddrüsenhormonwerte und die $T_3$ -vermittelte Genaktivierung .....	62
3.1.5. Normale Gehirnentwicklung, aber leicht gestörte Bewegungskoordination <i>Slc7a8</i> -defizienter Mäuse.....	64
3.2. Struktur-Funktionsanalysen in MCT8.....	66
3.2.1. Aufnahme radioaktiv-markierter Jodthyronine in MCT8-exprimierende MDCK-1 Zellen .....	66
3.2.2. His192 und His415 .....	67
<i>His192</i> .....	68
<i>His415</i> .....	70
3.2.3. Arg301 .....	71
3.3. Die Identifizierung einer weiblichen AHDS-Patientin .....	73
3.3.1. Biochemische Eigenschaften der N193I-Mutation .....	73
3.3.2. Aufnahme von radioaktiv-markiertem $T_3$ in Fibroblasten einer AHDS-Patientin .....	73
3.4. Die Wirkung von Tyrosinkinase Inhibitoren (TKIs) auf den MCT8-vermittelten Transport von Jodthyroninen .....	75

3.4.1. Die Struktur der TKIs im Vergleich mit ATP, T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> .....	75
3.4.2. Inhibition des MCT8-vermittelten Jodthyronintransports durch TKIs der ersten Generation .....	76
3.4.3. Inhibition des MCT8-vermittelten Jodthyronintransports durch TKIs der zweiten Generation .....	76
3.4.4. Inhibition des MCT8-vermittelten Efflux durch TKIs der ersten und zweiten Generation .....	78
4. Diskussion .....	80
4.1. Der L-Typ Aminosäuretransporter 2 als möglicher Kompensator der Mct8-Defizienz in Mäusen .....	80
4.1.1. Lat2 als Aminosäuretransporter .....	81
<i>Lat2 in Niere, Dünndarm und Plazenta</i> .....	81
<i>Lat2 im Gehirn</i> .....	82
4.1.2. Lat2 als Schilddrüsenhormontransporter .....	82
<i>Lat2 im Astrozyten</i> .....	82
<i>Lat2 und die Schilddrüsenhormonachse</i> .....	84
<i>Lat2 als kompensierender Transporter</i> .....	84
4.2. Identifizierung von Aminosäuren in der MCT8-Sequenz, die am Substrattransport beteiligt sind .....	87
<i>His415</i> .....	88
<i>Arg301</i> .....	89
<i>His192</i> .....	90
4.3. Eine neue MCT8-Mutation als Ursache für AHDS in einer weiblichen Patientin .....	92
4.4. Der MCT8-vermittelte Jodthyronintransport wird durch Tyrosinkinase Inhibitoren (TKIs) nicht-kompetitiv gehemmt.....	94
Referenzen .....	XIII
Publikationen .....	XXI

## Abkürzungen

A, Ala	Alanin	GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Abb.	Abbildung	GH	Wachstumshormon
AHDS	Allan-Herndon-Dudley Syndrom	GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose	GlpT	Glycerol-3-Phosphattransporter
APS	Ammoniumpersulfat	GLUT	Glukosetransporter
ARD	Außenringdejodierung	GPx	Glutathionperoxidase
ATP	Adenosintriphosphat	H, His	Histidin
BCH	2-Amino-Bicycloheptan-2-Carbonsäure	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
BSA	Serumalbumin, Rind	HBSS	<i>HANKS' Salt Solution</i>
BSP	Bromsulphthalein	hCG	humanes Choriongonadotropin
C	Kohlenstoff	Hr	<i>Hairless</i>
C, Cys	Cystein	I	Jod
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	I, Ile	Isoleucin
cDNA	komplementäre DNA	IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
CML	Chronische Myeloide Leukämie	IGF	<i>insulin growth factor</i>
CoA	Koaktivator	IRD	Innenringdejodierung
CoR	Korepressor	K, Lys	Lysin
cpm	<i>counts per minute</i>	kb	Kilobasen
cRNA	kodierende RNA	kDa	Kilodalton
D, Asp	Aspartat	K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten Konstante
D1, Dio1	Dejodase 1	L, Leu	Leucin
D2, Dio2	Dejodase 2	LAT	L-Typ Aminosäuretransporter
D3, Dio3	Dejodase 3	LH	Luteinisierendes Hormon
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LPI	Lysinurische Proteinintoleranz
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser	M, Met	Methionin
DIT	Dijodtyrosin	MCT	Monocarboxylattransporter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	MDCK-1	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	MFS	<i>Major facilitator</i> Superfamilie
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MIT	Monojodtyrosin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	mRNA	<i>messenger</i> RNA
DTT	Dithiothreitol	N, Asn	Asparagin
DUOX	Dualoxidasen	D, Asp	Aspartat
E, Glu	Glutamat	n.d.	nicht detektiert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	n.i.	nicht injiziert
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	NIS	Natrium-Jodid-Symporter
F, Phe	Phenylalanin	OATP	<i>organic anion-transporting polypeptid</i>
FCS	fetales Kälberserum	P, Pro	Prolin
FSH	Follikel stimulierendes Hormon	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
fwd	<i>forward</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion
G, Gly	Glycin	PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>



PFA	Paraformaldehyd	T <sub>4</sub>	3,3',5,5'-Tetraiodthyronin, Thyroxin
PTU	Propylthiouracil	TAE	Tris-Acetat-EDTA
Q, Gln	Glutamin	TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
R, Arg	Arginin	TBS	<i>tris buffered saline</i>
RC3	Neurogranin	TE	Tris-EDTA
rev	<i>reverse</i>	Tg	Thyreoglobulin
RNA	Ribonukleinsäure	TH	<i>thyroid hormone</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>	TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
rRNA	ribosomale RNA	TPO	Thyreoperoxidase
rT <sub>3</sub>	reverses 3,3',5'-Trijodthyronin	TR	T <sub>3</sub> -Rezeptor
RXR	Retinsäurerezeptor	TRE	schilddrüsenhormonresponsives Element
S, Ser	Serin	TRH	Thyroliberin, <i>thyrotropin releasing hormone</i>
SD	Schilddrüse	TSH	Thyrotropin, <i>thyroid stimulating hormone</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat	UCP	<i>uncoupling protein</i>
Slc	<i>solute carrier</i>	V, Val	Valin
ssRNA	einzelsträngige RNA	VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
T, Thr	Threonin	v <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit einer Reaktion
T <sub>2</sub>	Dijodthyronin	W, Trp	Tryptophan
T <sub>3</sub>	3,3',5-Trijodthyronin	Y, Tyr	Tyrosin

Gängige physikalische Größen wurden nach dem international gültigen SI-Einheitensystem benannt.

## Begriffserklärung

Am Beispiel des Monocarboxylattransporters 8 soll die Nomenklatur von Genen und Proteinen erklärt werden.

Kursiv geschriebene Abkürzungen bezeichnen das Gen, nicht kursiv geschriebene Abkürzungen hingegen das Protein.

z.Bsp.: *Mct8* (Gen) - Mct8 (Protein)

Groß- und Kleinschreibungen von Abkürzungen beziehen sich auf die verschiedenen Spezies (groß → human; klein → Maus, Ratte etc.).

z.Bsp.: *MCT8* (Gen, human) - MCT8 (Protein, human); *Mct8* (Gen, Maus) - Mct8 (Protein, Maus).

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	(A) Schematische Darstellung eines Schilddrüsenfollikels, der kleinsten funktionellen Einheit der Schilddrüse. (B) Strukturformel der Aminosäure Tyrosin und verschiedener Jodthyronine.	Seite 3
Abbildung 1-2:	(A) Schematische Darstellung der Struktur eines nukleären Rezeptors. (B) Schematische Darstellung der Wirkungsweise des T <sub>3</sub> -Rezeptors.	Seite 9
Abbildung 1-3:	(A) Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse. (B) Schematische Darstellung der Produktion von Schilddrüsenhormonen im Vergleich zwischen Euthyreose und Hyperthyreose.	Seite 11
Abbildung 1-4:	Die Entwicklung des fetalen Gehirns unterliegt der zeitlichen Regulation durch Schilddrüsenhormone.	Seite 14
Abbildung 1-5:	Die Schilddrüsenhormone T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> sind bei physiologischem pH-Wert mehrfach geladene Moleküle.	Seite 16
Abbildung 1-6:	Die (Ko-)Expression von Schilddrüsenhormontransportern in unterschiedlichen Zellen des Gehirns.	Seite 22
Abbildung 1-7:	(A) Die Kristallstruktur des bakteriellen GlpT. (B) Pathogene Mutationen sind im Transportkanal des MCT8-Homologiemodells zu finden. (C) Die Kristallstruktur des T <sub>3</sub> -Rezeptors. (D) Potentiell an der Substratbindung beteiligte Aminosäuren. (F) His/Arg-Kombinationen.	Seite 25
Abbildung 3-1:	(A) Schematische Darstellung des murinen <i>Slc7a8</i> -Gens. (B) PCR-Genotypisierung. (C) Vergleiche von Körpergewicht und Körperlänge. (D) Expression von Lat2 in verschiedenen Geweben. (E) Expression von Lat2 entlang des Gastrointestinaltraktes. (F) Vergleichende Analyse der Lat2-Expression. (G+H) Immunhistochemische Färbungen der Leber. (I+J) Immunhistochemische Lat2-Färbungen des Dünndarms	Seite 59
Abbildung 3-2:	(A) Die immunhistochemische Färbung von Lat2 in der Niere. (B) Aminosäureanalyse im Urin. (C) Vergleichende RT-PCR. (D) Aminosäureanalyse im Serum.	Seite 61
Abbildung 3-3:	Zeitabhängige Aufnahme von (A) <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub> und (B) <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> in primäre, murine Astrozyten. (C) Auswirkungen verschiedener Inhibitoren. (D) Aufnahme von <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> in primäre, murine Astrozyten der verschiedenen Lat2-Genotypen. (E) Immunhistochemische Fluoreszenz-Doppelfärbung von primären Astrozyten.	Seite 63
Abbildung 3-4:	Die zirkulierenden Schilddrüsenhormon- und TSH-Level	Seite 64
Abbildung 3-5:	Aktivität der (A) hepatischen und der (B) renalen Dio1. (C) Genexpression von <i>Dio2</i> und <i>TSHβ</i> in der Hypophyse.	Seite 65
Abbildung 3-6:	(A) Aktivität der Dio2 im zerebralen Kortex. (B - D) Analyse der T <sub>3</sub> -responsiven Genexpression im zerebralen Kortex.	Seite 65

Abbildung 3-7:	(A - C) Analyse der T <sub>3</sub> -responsiven Genexpression im Kleinhirn. (D) Rotarod zur Analyse möglicher Bewegungsstörungen. (G + H) Immunhistochemische Doppelfärbung	Seite 66
Abbildung 3-8:	(A+B) Zeitabhängige Aufnahme von (A) <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> und (B) <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub> in MCT8-exprimierende MDCK-1 Zellen. (C) Durchführung des Experiments.	Seite 67
Abbildung 3-9:	(A) Expression verschiedener His192-Mutanten. (B) T <sub>3</sub> -abhängige Michaelis-Menten-Kinetik. (C) Eadie-Hofstee-Diagramm. (D) <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub> -Transport von H192Q in MDCK-1 Zellen und <i>Xenopus</i> Oozyten. (E) Expression von H192Q und MCT8 in <i>Xenopus</i> Oozyten. (F) <sup>14</sup> C-Trp-Transport von H192Q.	Seite 69
Abbildung 3-10:	(A+B) Expression der His415-Mutanten. (D) Eadie-Hofstee-Diagramm. (C) T <sub>3</sub> -abhängige Michaelis-Menten-Kinetik.	Seite 70
Abbildung 3-11:	(A+B) Expression von R301K. (B) T <sub>3</sub> -abhängige Michaelis-Menten-Kinetik. (C) Eadie-Hofstee-Diagramm. (D) Expression und <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> -Aufnahme der Arg301-Mutanten in <i>Xenopus</i> Oozyten.	Seite 72
Abbildung 3-12:	(A) Expression der N193I-Mutante in MDCK-1 Zellen. (B) Zeitabhängige Aufnahme von <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> . (C) Expression von N193I in <i>Xenopus</i> Oozyten. (D) Zeitabhängige Aufnahme von <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> in <i>Xenopus</i> Oozyten	Seite 74
Abbildung 3-13:	(A) Expression von MCT8 in Fibroblasten. (B) Zeitabhängige Aufnahme von <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> in Fibroblasten. (C) Berechnung der Verringerung der <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> -Aufnahme.	Seite 74
Abbildung 3-14:	Vergleich der Strukturformeln von (A) ATP, (B) verschiedener TKIs und (C) der Jodthyronine T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> .	Seite 75
Abbildung 3-15:	(A + B) Sunitinib-Inhibition. (C + D) Eadie-Hofstee-Diagramm. (E) Imatinib-Inhibition. (F) Eadie-Hofstee-Diagramm.	Seite 77
Abbildung 3-16:	(A) Dasatinib-Inhibition. (B) Eadie-Hofstee-Diagramm. (C) Bosutinib-Inhibition. (D) Eadie-Hofstee-Diagramm.	Seite 78
Abbildung 3-17:	(A) Zeitabhängiger <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub> -Efflux. (B) Durchführung des Experiments. (C) <sup>25</sup> I-T <sub>3</sub> -Efflux in Gegenwart von 100 µM Sunitinib bzw. Bosutinib.	Seite 79

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Kriterien mentaler Retardierung	Seite 15
Tabelle 1-2:	Die Verteilung von MCT8 in Geweben der Maus und des Menschen	Seite 17
Tabelle 2-1:	Vorgefertigte Reagenziensysteme	Seite 28

---

Tabelle 2-2:	Geräte	Seite 29
Tabelle 2-3:	Software	Seite 30
Tabelle 2-4:	Datenbanken	Seite 30
Tabelle 2-5:	Antikörperverdünnungen	Seite 30
Tabelle 2-6:	Genotypisierungs-PCR <i>Slc7a8</i> -defizienter Mäuse	Seite 32
Tabelle 2-7:	Pufferzusammensetzungen (1)	Seite 32
Tabelle 2-8:	Pufferzusammensetzungen (2)	Seite 33
Tabelle 2-9:	Pufferzusammensetzungen (3)	Seite 34
Tabelle 2-10:	Proteinmengen und Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels	Seite 36
Tabelle 2-11:	Dejodase-Assay - Proteinmenge, rT <sub>3</sub> -Konzentration und Inkubationszeit	Seite 37
Tabelle 2-12:	Zusammensetzung des Substratmixes	Seite 37
Tabelle 2-13:	Pufferzusammensetzungen (4)	Seite 38
Tabelle 2-14:	cDNA-Synthese - Ansatz und Temperaturprogramm	Seite 40
Tabelle 2-15:	RT-PCR - Ansatz	Seite 41
Tabelle 2-16:	RT-PCR - Primer	Seite 41
Tabelle 2-17:	Mutagenese-Primer und Enzyme	Seite 42
Tabelle 2-18:	Mutagenese-PCR	Seite 43
Tabelle 2-19:	<i>A-tailing</i> und Ligation	Seite 43
Tabelle 2-20:	Sequenzierungs-PCR	Seite 43
Tabelle 2-21:	Präparativer Verdau	Seite 44
Tabelle 2-22:	Pufferzusammensetzungen (5)	Seite 45
Tabelle 2-23:	PCR-Ansatz und PCR-Programm der zielgerichteten Mutagenese	Seite 45
Tabelle 2-24:	Präparativer Verdau	Seite 46
Tabelle 2-25:	Zellkulturmedien	Seite 47
Tabelle 2-26:	Zellzahlen	Seite 50
Tabelle 2-27:	Pufferzusammensetzungen (6)	Seite 51
Tabelle 2-28:	Tracerkonzentrationen zur Messung eines Zeitverlaufs	Seite 52
Tabelle 2-29:	Pufferzusammensetzungen (7)	Seite 54

## Zusammenfassung

Pathologische Mutationen im Monocarboxylattransporter 8 (*MCT8*, *SLC16A2*), die das Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) verursachen, sind für die Inaktivierung der Transportfunktion des Proteins verantwortlich. AHDS-Patienten leiden unter neurologischen Defekten, die möglicherweise durch eine Unterversorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen während kritischer Phasen der Entwicklung hervorgerufen werden. Interessanterweise sind *Mct8*-defiziente Mäuse neurologisch unauffällig, weshalb Ulrich Schweizer und Kollegen die Hypothese kompensierender Schilddrüsenhormontransporter vorschlugen, die den Funktionsverlust von *Mct8* in manchen Zellen ausgleichen könnten.

Ein potentieller Kandidat ist der L-Typ Aminosäuretransporter 2 (*Lat2*, *Slc7a8*), der neben Aminosäuren auch Schilddrüsenhormone transportieren kann. Er wird in verschiedenen Zelltypen des murinen embryonalen Gehirns exprimiert, konnte allerdings nicht in humanen embryonalen Neuronen wie den Pyramidenzellen des Kortex nachgewiesen werden.

Zur Aufklärung der *Lat2*-Funktion in Mäusen wurden *Slc7a8*-defiziente Mäuse generiert und in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht. Interessanterweise ist der Phänotyp *Slc7a8*-defizienter Mäuse relativ mild. Die Mäuse zeigten zwar eine Aminoazidurie, aber keine Veränderungen der Schilddrüsenhormonachse oder der Expression  $T_3$ -responsiver Gene. Lediglich leichte Störungen in der Bewegungskoordination konnten beobachtet werden, die zum einen auf einen verminderten Schilddrüsenhormontransport und/oder auf Störungen im Neurotransmittermetabolismus zurückzuführen sein könnten.

Die dreidimensionale Struktur von *MCT8* und damit die genaue Wirkungsweise des Transporters sind unbekannt. Sequenzvergleiche zwischen anderen Mitgliedern der *MCT*-Familie und *MCT8* sowie Struktur-Funktionsanalysen führten zu einem *MCT8*-Homologiemodell, das auf der Grundlage der Kristallstruktur des bakteriellen Glycerol-3-Phosphattransporters basiert. Mithilfe des Homologiemodells wurden potentiell an der Substratbindung beteiligte Aminosäuren (His192, His415 und R301) identifiziert und durch Einführung von Mutationen in die *MCT8*-Sequenz charakterisiert. Es zeigte sich, dass His415 und R301 essentiell für den *MCT8*-vermittelten  $T_3$ -Transport bzw. die  $T_3$ -Bindung sind. Außerdem offenbarte die Mutation von His192 zu Glutamin unterschiedliche Wechselwirkungen dieser Aminosäure mit den Jodthyroninen  $T_3$  und  $T_4$ .

Interessanterweise ist eine neue Mutation (N193I) die Ursache für AHDS bei einer weiblichen Patientin. AHDS betrifft als X-chromosomal rezessiv vererbte Krankheit vor allem Knaben. Nichtsdestotrotz konnten sich AHDS-typische Symptome bei einer weiblichen Patientin manifestieren, da es neben der pathologischen N193I-Mutation in MCT8 vermutlich zu einer 70%igen Inaktivierung des X-Chromosoms kam, welches nicht von der MCT8-Mutation betroffen war. Biochemische Untersuchungen der N193I-Mutation zeigten, dass der T<sub>3</sub>-Transport aber nicht die T<sub>3</sub>-Bindung gestört ist.

Tyrosinkinase Inhibitoren (TKIs) dienen der Behandlung verschiedener Krebsarten wie dem Nierenzellkarzinom oder dem gastrointestinalen Strumatumor. Als Nebenwirkung wird oft Hypothyreose beobachtet. Selbst athyreote Krebspatienten, die unter Levothyroxin-Substitution stehen, zeigen anormale Schilddrüsenfunktionstests. Eine mögliche Erklärung ist eine verminderte Absorption des Levothyroxins im Darm oder eine mangelnde Reabsorption von Schilddrüsenhormonen in der Niere hervorgerufen durch eine TKI-vermittelte Inhibition von MCT8. Die Wirkungen der TKIs Sunitinib, Imatinib, Dasatinib und Bosutinib auf MCT8 wurden biochemisch im Zellkulturmodell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TKIs eine nicht-kompetitive Hemmung des MCT8-vermittelten T<sub>3</sub>-Transports hervorrufen.

## Abstract

Monocarboxylate transporter 8 (MCT8, SLC16A2) is a specific thyroid hormone transporter. Mutations in *MCT8* leading to the Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS), a severe mental retardation disease, impair its thyroid hormone transport function. It is hypothesized that patients suffer from a thyroid hormone transport defect into the different brain cells during critical stages of embryonic development. Surprisingly, mice deficient in *Mct8* do not show neurological impairments prompting Ulrich Schweizer and colleagues to suggest the hypothesis that alternative transporter proteins compensate for the lack of Mct8 function in mice.

The L-type amino acid transporter 2 (Lat2, Slc7a8) facilitates the transport of amino acids as well as thyroid hormones. It is expressed in different cell types of the embryonic mouse brain, but could not be detected in human cortical pyramidal cells during early embryonic stages.

In order to investigate the physiological function of Lat2, *Slc7a8*-deficient mice were generated, that exhibited only a mild phenotype. Mice showed aminoaciduria of small neutral amino acids, while thyroid hormone metabolism was not affected. However, movement coordination was slightly impaired in *Slc7a8*-deficient mice what might be due to a diminished thyroid hormone transport and/or a dysfunction in neurotransmitter metabolism.

The 3-dimensional structure of MCT8 is unknown so far. Sequence alignments and structure-function analysis lead to a MCT8 homology model based on the structure of the bacterial glycerol-3-phosphate transporter. Analysis of the MCT8 homology model revealed two “His-Arg clamp” motifs possibly involved in substrate recognition and substrate translocation. Mutations of the conserved His and Arg residues in human MCT8 were biochemically investigated. The results demonstrated that His415 and Arg301 are critically involved in MCT8-mediated transport of T<sub>3</sub>. In addition, the mutations of His192 to glutamine displayed different interaction possibilities with the iodothyronines T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>.

AHDS is an X-linked mental retardation disease with males generally affected and females being heterozygous carriers of the mutation. Nevertheless a female AHDS patient was identified with a new Asn to Ile mutation at position 193 and a skewed inactivation of the second X-chromosome not carrying the mutation by 70%. Biochemically investigations of MCT8<sup>N193I</sup> showed that T<sub>3</sub> transport but not T<sub>3</sub> binding is disturbed.

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) are used for the treatment of various types of cancer. Case reports and clinical trials have reported abnormal thyroid function tests (TFT) as well as an increased requirement of levothyroxine in thyroidectomized patients during TKI treatment. A possible explanation could be a diminished intestinal absorption of levothyroxine or a lack of renal reabsorption of thyroid hormones due to TKI-mediated inhibition of MCT8. Therefore, sunitinib, imatinib, dasatinib and bosutinib were biochemically investigated concerning their effects on MCT8 transport activity. I showed that TKIs lead to a non-competitive inhibition of MCT8-mediated iodothyronine transport.

## 1. Einleitung

*"These chemical messengers, however, or 'hormones' (from ὁρμάω, I excite or arouse) as we might call them, have to be carried from the organ where they are produced to the organ which they affect by means of the blood stream and the continually recurring physiological needs of the organism must determine their repeated production and circulation throughout the body (Henderson, 2005)."*

Ernest Starling, 1905

Die Endokrinologie („Lehre von den Hormonen“) als Teilgebiet der Physiologie ist eine relativ junge Wissenschaft. Arnold Adolph Berthold publizierte 1849 eines der ersten endokrinologischen Experimente und beschrieb darin die Unterentwicklung von Kämmen und Kehllappen bei Hähnen als Folge einer Kastration, ein Effekt, der durch die Transplantation der Hoden zurück in die Bauchhöhle, umgekehrt werden konnte. Berthold spekulierte anhand seiner Experimente, dass die Hoden einen Stoff (1935 als Testosteron identifiziert) ins Blut abgeben, der im Körper des Hahns zur Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale führt.

Der eigentliche Hormonbegriff wurde erstmals 1905 von Ernest Starling definiert (siehe oben). Er beschrieb Hormone als anregende, chemische Botenstoffe, die über den Blutstrom transportiert werden und dessen Produktion und Zirkulation im Körper durch den Bedarf des jeweiligen Organismus bestimmt werden.

Heutzutage versteht man Hormone eher als Modulatoren. Sie wirken sowohl aktivierend als auch hemmend und werden in geringer Konzentration in das Blut oder die extrazelluläre Flüssigkeit abgegeben. Inzwischen ist klar, dass nicht nur die bekannten endokrinen Drüsen Hormone produzieren und abgeben, sondern auch Gewebe als Hormonlieferanten fungieren, die vorher nicht damit in Verbindung gebracht wurden (z.B. Magen - Ghrelin, Fettgewebe - Leptin). Die Hormonwirkung entfaltet sich an einer (meist entfernten) Zielzelle im Körper.



## 1.1. Die Schilddrüse

*“The last part of the 19th century was a period of great achievements in medicine and endocrinology. The thyroid gland evolved from being considered a rudimentary structure to an organ related to specific diseases.”*

(Lindholm and Laurberg, 2011)

Thomas Wharton orientierte sich an den Kampfschilden des antiken Griechenlands, als er 1656 der Schilddrüse ihren Namen gab.

Als schmetterlingsförmiges Organ befindet sich die Schilddrüse unterhalb des Kehlkopfes und oberhalb der Luftröhre. Sie besteht aus zwei Lappen, die beim Menschen und anderen Säugern (allerdings nicht bei der Maus) über den Isthmus miteinander verbunden sind.

Theodor Kocher, ein Schweizer Chirurg, der 1909 den Nobelpreis für Medizin erhielt, konnte zeigen, dass die Symptome von Morbus Basedow durch die Entfernung der Schilddrüse (Thyreoidektomie) verschwanden, schilddrüsenoperierte Patienten bei der Nachuntersuchung nun aber „kretinartige Veränderung“ aufwiesen.

Paul Julius Möbius, ein Leipziger Neurologe, schlussfolgerte später, dass Erkrankungen wie Kretinismus oder die Basedowsche Krankheit einer Fehlfunktion der Schilddrüse zuzuordnen sind.

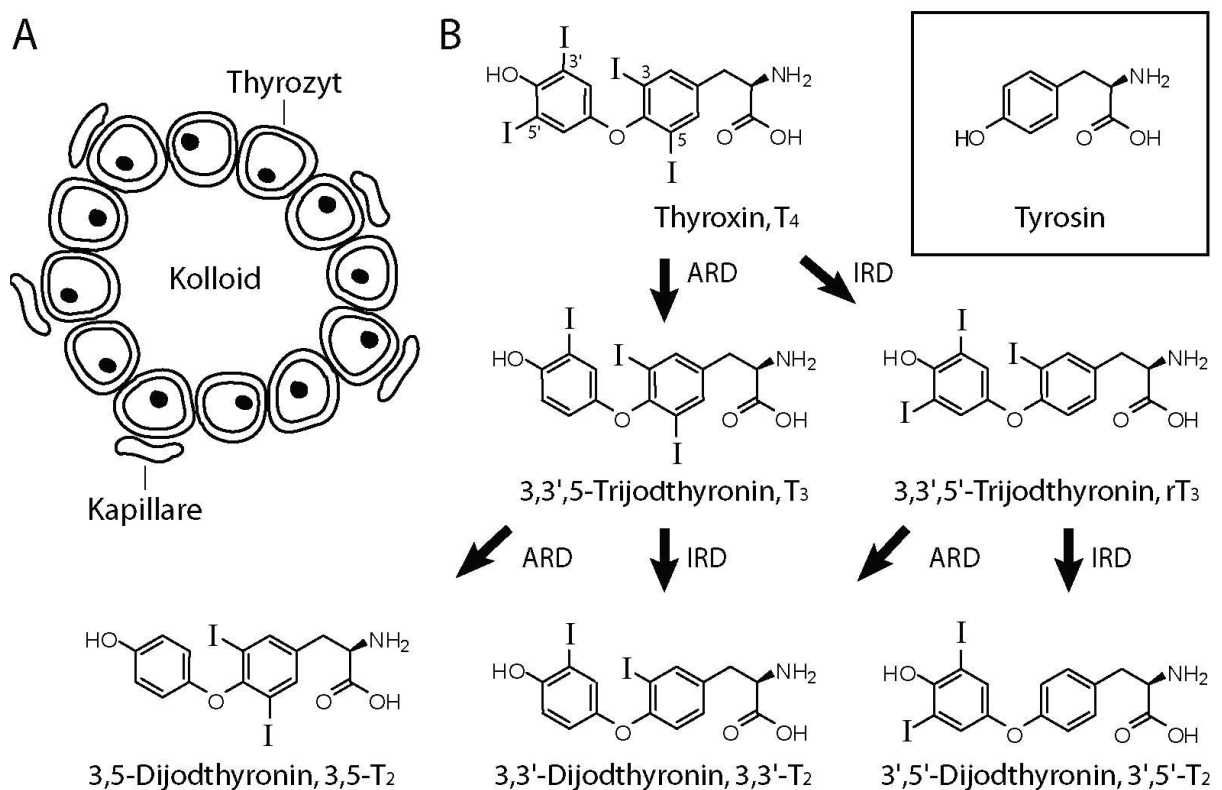
Aufgebaut ist die Schilddrüse aus Schilddrüsenfollikeln, der kleinsten funktionellen Einheit der Schilddrüse und Syntheseort der Schilddrüsenhormone (Abb.1-1). Ein Schilddrüsenfollikel besteht aus einschichtigem Follikelepithel und Kolloid. Die Zellen des Follikelepithels werden als Thyrozyten bezeichnet. Jeder Thyrozyt ist über Kapillare mit dem Blutsystem verbunden, so dass die Schilddrüse zu den Organen zählt, die sehr stark durchblutet werden.

### 1.1.1. Die Schilddrüsenhormone

Die Schilddrüse ist eine endokrine Drüse, die die Hormone Trijodthyronin ( $T_3$ ) und Tetrajodthyronin (Thyroxin,  $T_4$ ) sezerniert. Diese Hormone spielen eine wichtige Rolle

bei der Thermogenese, dem Stoffwechsel und Wachstum sowie der Entwicklung verschiedener Organe insbesondere des Nervensystems.

Im Blut zirkulieren  $T_3$  und  $T_4$  an Bindeproteine gebunden, wodurch die relativ langen Halbwertszeiten von einem ( $T_3$ ) und sieben ( $T_4$ ) Tagen zustande kommen. Zu den Bindeproteinen gehören TBG (Thyroxin-bindendes Globulin), Transthyretin und Albumin. Gemeinsam binden sie 99,9% des  $T_4$  und 99,5% des  $T_3$  im Serum und verhindern somit die Anlagerung der hydrophoben Hormone an Blutgefäße oder den Verlust der Schilddrüsenhormone durch Ausscheidung über die Niere.



**Abbildung 1-1:** (A) Schematische Darstellung eines Schilddrüsenfollikels, der kleinsten funktionellen Einheit der Schilddrüse. Die Thyrozyten umgeben als einschichtiges Follikelepithel das Kolloid. Jeder Thyrozyt ist über Blutkapillare mit dem Blutsystem verbunden. (B) Strukturformel der Aminosäure Tyrosin und verschiedener Jodthyronine (Braun et al., 2010).  $T_4$  ist ein Tyrosinderivat und kann durch Außenringdeiodierung (ARD) in seine biologisch aktive Form ( $T_3$ ) umgewandelt werden. Eine Deiodierung am Innenring (IRD) des Thyroxins führt zur Inaktivierung des  $T_4$  zu reversem  $T_3$  ( $rT_3$ ). Die gleichfalls verbreitete Nomenklatur 5- oder 5'-Deiodierung ist zwar präziser, schließt dann aber die Benennung einer folgenden 3- oder 3'-Deiodierung mit dem gleichen Terminus aus, auch wenn dasselbe Enzym beteiligt ist.

### 1.1.2. Synthese und Abbau der Schilddrüsenhormone

*“The main function of the thyroid gland is to concentrate iodide and to make it available for biosynthesis of thyroid hormones.”*

(Bizhanova and Kopp, 2009)

Die Synthese der Schilddrüsenhormone findet in den Thyrozyten und dem Kolloid der Schilddrüse statt. Wichtige Spurenelemente, die dabei eine Rolle spielen, sind Jod, Eisen und Selen.

*Jodidaufnahme:* Der an der basolateralen Membran von Thyrozyten lokalisierte Natrium-Jodid-Symporter (NIS) übernimmt bei der Schilddrüsenhormonbiosynthese die Aufgabe, Jodid aus dem Blut in die Thyrozyten zu transportieren. Der Transport eines Jodidmoleküls erfolgt zusammen mit zwei Natriumionen entlang eines Natriumgradienten, der durch die Natrium-Kalium-ATPase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) aufrechterhalten wird (Bizhanova and Kopp, 2009; Spitzweg and Morris, 2010). Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  ist ebenfalls an der basolateralen Thyrozytenmembran lokalisiert und bezieht ihre Energie aus cytosolischem ATP.

An der apikalen Membran erfolgt die Abgabe des akkumulierten Jodids in das Kolloid durch den Ionenkanal Pendrin (Bizhanova and Kopp, 2009; Spitzweg and Morris, 2010). Neben Jodid transportiert Pendrin auch noch Chlorid. Mutationen in einem der beiden Transporter führen zur Strumabildung.

*Synthese:* Im Kolloid wird Jodid mithilfe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die Thyreoperoxidase (TPO) oxidiert. Die Thyreoperoxidase ist an der apikalen Thyrozytenmembran lokalisiert. Das katalytische Zentrum des Enzyms enthält Eisenionen und befindet sich auf der extrazellulären Seite des Thyrozyten im Kolloid. Neben der Oxidation des Jodids übernimmt TPO auch die Jodierung von Tyrosin in drei und fünf Position am Schilddrüsenvorläuferprotein Thyreoglobulin (Tg), wodurch Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) entstehen. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abhängige oxidative Kopplung von MITs und DITs zu  $\text{T}_3$  und  $\text{T}_4$  innerhalb der Thyreoglobulinpolypeptidkette wird ebenfalls durch TPO katalysiert (Ruf and Carayon, 2006).  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht extrazellulär aus Sauerstoff und intrazellulärem NADPH mithilfe von NADPH-Oxidasen, die sowohl unter den Namen Thyrooxidasen als auch Dualoxidasen (DUOX) bekannt sind. Sie sind an der

apikalen Thyrozytenmembran mit TPO kolokalisiert (Ohye and Sugawara, 2010). Der Abbau von überschüssigem  $H_2O_2$  zu Wasser wird durch das Selenocysteinenzym Glutathionperoxidase 3 (GPx3) katalysiert. Lipidperoxide werden durch GPx4 abgefangen (Chiu-Ugalde et al., 2012). Glutathionperoxidasen dienen somit als antioxidatives Schutzsystem.

*Freisetzung:* Jodiertes Thyreoglobulin oder proteolytische Fragmente werden durch TSH(Thyrotropin)-vermittelte Mikropinozytose in die Thyrozyten aufgenommen und dort in Lysosomen durch Kathepsine, Dipetidylpeptidasen und Exopeptidasen weiter abgebaut. Daraufhin erfolgen die Freisetzung von  $T_3$  und  $T_4$  ins Cytosol und die Beförderung dieser über basolaterale Transportsysteme aus der Zelle heraus.

Jodtyrosinreste des Tg, die nicht zur Biosynthese von Schilddrüsenhormonen verwendet wurden, können durch die Jodtyrosindehalogenase metabolisiert werden, wodurch Jod recycelt wird und für eine weitere Hormonbiosynthese zur Verfügung steht.

*Abbau:* Der Abbau von Schilddrüsenhormonen erfolgt v.a. in der Leber. Zum einen können Schilddrüsenhormone dort durch Glucuronidasen und Sulfotransferasen inaktiviert werden, zum anderen kann die Alaninseitenkette abgebaut oder die Diphenyletherstruktur gespalten werden. Jod wird dabei aus inaktiven Hormonen freigesetzt und im Körper zurückgehalten (siehe 1.1.3.).

### 1.1.3. Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormonwirkung

*“Thyroxine ( $T_4$ ) can be activated to triiodothyronine ( $T_3$ ) in a stage- and tissue-specific manner by phenolic ring deiodination (outer ring deiodination) catalyzed by two iodothyronine deiodinases, D1 and D2, while a third deiodinase, D3, prevents  $T_4$  activation and terminates  $T_3$  action.”*

(Dentice and Salvatore, 2011)

Im euthyreoten Zustand (griechisch: normale Schilddrüsenfunktion) entstehen bis zu 80% des im Blut zirkulierenden  $T_3$  durch Dejodierung von  $T_4$ , nur circa 20% werden von der Schilddrüse selbst synthetisiert (Maia et al., 2011). Enzyme, die die Dejodierung von Jodthyroninen katalysieren, nennt man Dejodasen. Dejodasen sind

membrangebundene Selenocysteinenzyme, die gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert werden. Es werden drei Isoformen unterschieden: Die Dejodasen 1 und 2 katalysieren die Außenringdejodierung (ARD) in 5'-Position des Phenolrings und wandeln  $T_4$  in biologisch aktives  $T_3$  um. Die Dejodase 3 hingegen verhindert die  $T_4$ -Aktivierung und beendet die  $T_3$ -Wirkung, indem der Innenring an 5-Position dejodiert wird und reverses  $T_3$  ( $rT_3$ ) beziehungsweise inaktives 3,3'-Dijodthyronin ( $T_2$ ) entstehen (Abb.1-1).

Die Dejodase 1 wird in Leber, Niere, Hypophyse und Schilddrüse exprimiert. Sie kann neben der ARD an 5'-Position auch den Innenring an 5-Position dejodieren (Maia et al., 2011; Williams and Bassett, 2011). Zum einen wird dadurch die  $T_3$ -Konzentration im Blut erhöht (ARD), zum anderen das Jod von inaktivem  $rT_3$  sowie sulfatierten Jodthyroninen in der Leber und in der Niere durch 3- und 3'-Dejodierung recycelt (IRD).

Anders als die Dejodase 1, die in der Plasmamembran verankert ist, wird die Dejodase 2 nahe dem Zellkern in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums von Gehirn, Hypophyse, Schilddrüse und Muskel exprimiert (Williams and Bassett, 2011). Sie kontrolliert die intrazelluläre  $T_3$ -Konzentration und durch Lokalisation nahe dem Zellkern dessen Verfügbarkeit für den nuklearen Schilddrüsenhormonrezeptor.

Die Dejodase 3 schützt die Zelle vor einem Überschuss an  $T_3$ , indem sie  $T_4$  zu  $rT_3$  dejodiert und  $T_3$  zu 3,3'- $T_2$  inaktiviert. Diese regulatorische Wirkung ist unter anderem im Gehirn und in sich entwickelnden embryonalen Geweben von Bedeutung (Dentice and Salvatore, 2011).

#### 1.1.4. Der nukleäre Schilddrüsenhormonrezeptor

*“Thyroid hormone receptors are ligand-regulatable transcription factors that bind both TH and DNA enhancer sequences in the promoter region of target genes where they can interact with co-repressor and co-activator complexes.”*

(Yen et al., 2006)

Der  $T_3$ -Rezeptor (TR) ist ein liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der durch Bindung seines Liganden ( $T_3$ ) die Genexpression einer Zielzelle modulieren kann

(Bagamasbad and Denver, 2011). Der TR gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren des Typs II (Abb.1-2 A) und ist im Nukleus lokalisiert. Er bindet dort mithilfe seiner DNA-bindenden Domäne an Konsensussequenzen in der Promotorregion von Zielgenen, sogenannten schilddrüsenhormonresponsiven Elementen (TRE). Ohne Ligandenbindung rekrutiert der konstitutiv am TRE gebundene  $T_3$ -Rezeptor Korepressoren, wodurch die Expression eines Zielgens reprimiert wird. Nach  $T_3$ -Bindung durchläuft der Rezeptor eine Konformationsänderung, Korepressoren werden freigesetzt und Koaktivatoren binden (Abb.1-2 B). Die Inhibition der Genexpression wird aufgehoben, die Transkription des  $T_3$ -responsiven Zielgens wird stimuliert (Song et al., 2011). Eine weitere Regulationsebene der  $T_3$ -aktivierten Transkription findet sich in der Heterodimerisierung des TR mit anderen Rezeptoren. In der Regel ist der  $T_3$ -Rezeptor nach Ligandenbindung mit dem Retinsäurerezeptor RXR assoziiert, aber auch Heterodimere aus TR und Vitamin-D-Rezeptor sind beschrieben (Yen et al., 2006).

Der humane TR wird durch zwei unterschiedliche Gene (TRHA und TRHB) kodiert, aus denen durch alternatives Spleißen verschiedene Isoformen ( $TR\alpha_{1-3}$  und  $TR\beta_{1-3}$ ) entstehen können (Williams and Bassett, 2011). Die Isoformen werden gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert und unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit  $T_3$  zu binden. So konkurrieren  $TR\alpha_2$ ,  $TR\alpha_3$  und  $TR\beta_3$ , die jeweils keine funktionelle Ligandenbindungsstelle aufweisen, zusammen mit den anderen Isoformen um die Bindung am TRE. Dementsprechend wirken  $TR\alpha_2$ ,  $TR\alpha_3$  und  $TR\beta_3$  als Inhibitoren,  $TR\alpha_1$  sowie  $TR\beta_1$  und  $TR\beta_2$  als Aktivatoren der Genexpression (Song et al., 2011).

#### 1.1.5. (Fehl-)Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse

*“Circulating thyroid hormone concentrations are maintained in the euthyroid range by a classical negative feedback loop.”*

(Williams and Bassett, 2011)

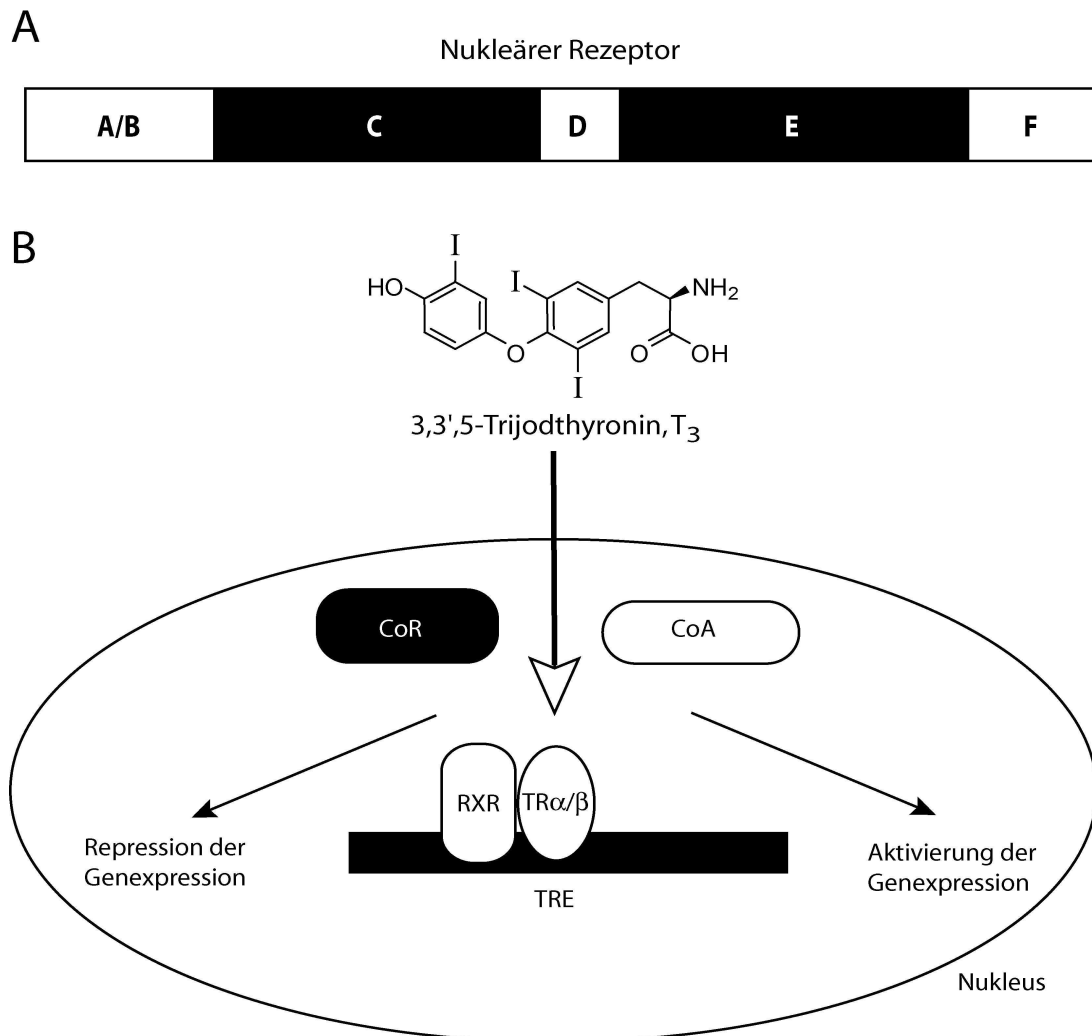
Die Aktivität der Schilddrüse wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert, der drei Regulationszentren berücksichtigt: Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse zusammengefasst zum thyreotropen Regelkreis.

Der Hypothalamus exprimiert in neuroendokrinen Zellen des paraventriculären Nucleus das Tripeptid TRH (Thyroliberin, *thyrotropin releasing hormone*). TRH wird als präproTRH synthetisiert und mithilfe der Prohormonkonvertasen eins und zwei zu mehreren Kopien eines Hexapeptids (RQHPGR) prozessiert (Perello et al., 2006). Exopeptidasen entfernen die terminal gelegenen Arginine und die Enzyme Glutamylcyclase und Peptidylglycin- $\alpha$ -monooxygenase modifizieren den freigewordenen C- bzw. N-Terminus, so dass das Tripeptid aus Pyroglutamin, Histidin und Prolinamid vor Abbau durch unspezifische Peptidasen geschützt wird. TRH stimuliert in der Hypophyse über den TRH-Rezeptor, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor mit dem *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (Schomburg and Bauer, 1995), die TSH-Ausschüttung (Abb.1-3 A). TRH hat eine Halbwertszeit von ein bis zwei Minuten und wird durch die Thyroliberinase, die in den laktotropen Zellen der Hypophyse gebildet wird, zu Histidinprolinamid und einem Pyroglutamarest abgebaut (Schomburg and Bauer, 1995; Schomburg et al., 1999).

TSH (Thyrotropin, *thyroid stimulating hormone*) wird in den thyrotropen Zellen der Hypophyse gebildet und hat eine Halbwertszeit von 50 bis 70 Minuten. TSH besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die zusammen ein Dimer von 26 kDa bilden. Die  $\alpha$ -Untereinheit des TSH ist homolog zu den  $\alpha$ -Untereinheiten von FSH (Follikel stimulierendes Hormon), LH (Luteinisierendes Hormon) und hCG (humanes Choriongonadotropin) (Miyai, 2007). TSH bindet in der Schilddrüse an den TSH-Rezeptor und stimuliert die Schilddrüse zur Produktion von Schilddrüsenhormonen (Abb.1-3 A). Der TSH-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Werthmann et al., 2012), die über den *second messenger* cAMP wirken, und ist in den Thyrozyten basolateral lokalisiert. Die cAMP-induzierte Genexpression bewirkt die Synthese von NIS, TPO und Thyreoglobulin.

Nimmt die Konzentration an Schilddrüsenhormonen zu, so kommt es in Hypophyse und Hypothalamus zu einer negativen Rückkopplung (Abb.1-3 A). Infolgedessen werden die Ausschüttung von TSH und TRH gehemmt, wodurch das Signal an die Schilddrüse ausgesetzt wird, Schilddrüsenhormone zu synthetisieren (Mebis and van den Berghe, 2009; Williams and Bassett, 2011). Dieser sensible Regelkreis erhält den euthyreoten Zustand (Zustand normaler Schilddrüsenfunktion) aufrecht (Abb.1-3 B). Störungen des thyreotropen Regelkreises sind daher die Ursache für

eine Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose) oder eine Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose).



**Abbildung 1-2:** (A) Schematische Darstellung der Struktur eines nukleären Rezeptors. Ein nukleärer Rezeptor besteht aus einer regulatorischen N-terminalen Domäne (A/B), einer DNA-bindenden Domäne (C) mit Zink-Finger-Strukturen zur Bindung an HREs (hormonresponsive Elemente), einer variablen Verbindungsdomäne (D), einer liganden-bindenden Domäne (E) zur Bindung des Hormons und der C-terminalen Domäne (F). (Bagamasbad and Denver, 2011) (B) Schematische Darstellung der Wirkungsweise des  $T_3$ -Rezeptors (TR). Der TR ist im Chromatin lokalisiert und bindet dort an schilddrüsenhormonresponsive Elemente (TRE). Aufgrund der Rekrutierung von Korepressoren (CoR) ist die Genexpression inhibiert. Nach der Bindung von  $T_3$  durchläuft der Rezeptor eine Konformationsänderung, durch die Korepressoren freigesetzt und Koaktivatoren (CoA) sowie der Retinsäurerezeptor RXR rekrutiert werden. Die Transkription wird stimuliert, die Genexpression wird aktiviert. (Braun et al., 2010)



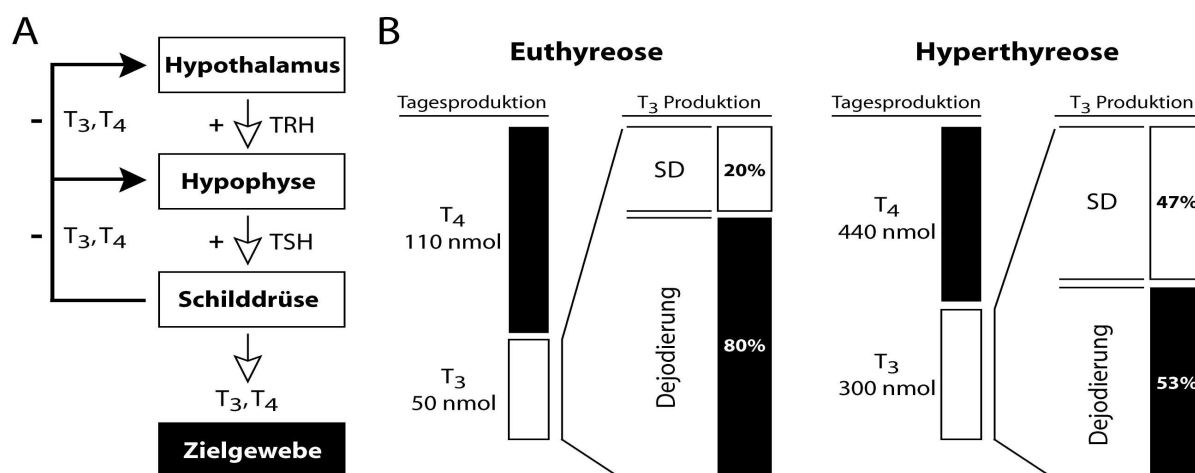
*Hyperthyreose:* Das Krankheitsbild der Hyperthyreose (Abb.1-3 B) hat mehrere Ursachen. Die Autoimmunerkrankung Morbus Basedow (*engl.: Graves' disease*) ist am weitesten verbreitet. Das Immunsystem bildet Antikörper, die den TSH-Rezeptor konstitutiv aktivieren (Ghandour and Reust, 2011). Ebenfalls bekannt sind aktivierende Mutationen des TSH-Rezeptors, die den Rezeptor unabhängig von TSH-Bindung oder Autoimmunantikörpern stimulieren (Biebermann et al., 2011). Die kontinuierliche Stimulation des TSH-Rezeptors führt zu einer stetigen Synthese und Sekretion von Schilddrüsenhormonen, so dass die Hormonproduktion nicht mehr unter der negativen Rückkopplungskontrolle des thyreotropen Regelkreises steht (Schilddrüsenautonomie). Eine weitere Ursache findet sich in einer erhöhten TSH-Synthese, hervorgerufen durch einen hypophysären, hormonproduzierenden Tumor (Ghandour and Reust, 2011). Die Schilddrüse erfährt schließlich ähnlich wie bei Morbus Basedow eine kontinuierliche Stimulation zur Hormonsynthese. Folgen der Hyperthyreose sind Symptome wie Gewichtsabnahme, Hyperaktivität, eine erhöhte Schweißabsonderung und hervortretende Augen. Auch die Bildung eines Strumas (tastbare Vergrößerung der Schilddrüse) ist nicht ungewöhnlich (Ghandour and Reust, 2011), da erhöhte TSH- und TRH-Konzentrationen einen mitogenen Proliferationsreiz darstellen, der zur Thyrozytenproliferation führt.

*Hypothyreose:* Eine Ursache der Hypothyreose ist die Autoimmunerkrankung Morbus Hashimoto, bei der das Immunsystem die Schilddrüse angreift und zerstört, sowie im Verlauf der Erkrankung Antikörper bildet, die den TSH-Rezeptor blockieren und somit die TSH-Wirkung inhibieren. Ebenfalls bekannt sind inaktivierende Mutationen des TSH-Rezeptors, welche dazu führen, dass die TSH-vermittelte Signalkaskade in der Schilddrüse ausfällt (Biebermann et al., 1997). Infolgedessen nimmt die Produktion von körpereigenen Schilddrüsenhormonen ab und muss durch eine lebenslange Gabe von Levothyroxin behandelt werden. Patienten leiden unter Symptomen wie Gewichtszunahme, Kälteintoleranz und Lethargie.

Eine weitere Ursache für Hypothyreose ist Jodmangel hervorgerufen durch eine unzureichende Jodzufuhr sowie Substanzen wie Thiocyanat, Kassava oder Perchlorat, die die Jodaufnahme durch die Schilddrüse blockieren.

*Kongenitale Hypothyreose:* Die kongenitale oder angeborene Hypothyreose tritt mit einer Häufigkeit von 1:3000 Geburten auf und wird durch perinatale Screenings diagnostiziert (Gruters et al., 1983). Unbehandelt führt kongenitale Hypothyreose

zum Krankheitsbild des Kretinismus, da es während sensiblen Phasen der Entwicklung zu einer Unterversorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen kommt. Folgen sind eine verzögerte geistige Entwicklung, Lern- und Bewegungsstörungen sowie Schwerhörigkeit. Die Ursachen der Unterversorgung reichen von Fehlentwicklungen der kindlichen Schilddrüse, über Defekte während der Schilddrüsenhormonbiosynthese, bis zu Mutationen im  $T_3$ -Rezeptor (Rastogi and LaFranchi, 2010; LaFranchi, 2011). Die Symptome einer kongenitalen Hypothyreose sind oft nicht leicht zu erkennen, da sich das Krankheitsbild bei einigen Betroffenen erst nach der Geburt manifestiert. Während der Schwangerschaft kann die Versorgung des Fötus mit Schilddrüsenhormonen durch die Mutter gewährleistet werden. Das Fehlen einer kindlichen Schilddrüse oder Defekte während der Hormonbiosynthese fallen also erst auf, wenn die Konzentration an mütterlichem Hormon durch dessen Abbau abnimmt.



**Abbildung 1-3:** (A) Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse (thyreotroper Regelkreis). Das hypothalamische TRH stimuliert die Hypophyse zur TSH-Ausschüttung. TSH aktiviert die Schilddrüse zur Synthese und Sekretion von  $T_3$  und  $T_4$ , welche ihre Wirkung im Zielgewebe entfalten. Bei Zunahme der Schilddrüsenhormonkonzentration kommt es zu einer negativen Rückkopplung, wobei die Schilddrüsenhormone die Synthese von TRH und TSH inhibieren. (B) Schematische Darstellung der Produktion von Schilddrüsenhormonen. Vergleich: Euthyreose vs. Hyperthyreose (Maia et al., 2011). Im euthyreoten Zustand entstehen 80% des  $T_3$  durch Dejodierung in der Peripherie, nur 20% werden durch die Schilddrüse (SD) freigesetzt. Beim Krankheitsbild der Hyperthyreose steigt die Tagesproduktion von  $T_4$  und  $T_3$  um das Vierfache bzw. Sechsfache an.  $T_3$  entsteht nun zu annähernd gleichen Teilen in Peripherie und Schilddrüse. Zum einen wird in der Schilddrüse Dio1 hochreguliert, zum anderen entsteht bei Jodmangel in der Schilddrüse bevorzugt  $T_3$ .

## 1.2. Schilddrüsenhormone und ihre Wirkung

*“The two main actions of thyroid hormones are increasing metabolism and energy expenditure and promoting the development and maturation of organs.”*

(Braun et al., 2010)

Die Wirkung von Schilddrüsenhormonen steht im Zusammenhang mit einer Vielzahl von biologischen Vorgängen im Körper. Unter anderem spielen sie eine Rolle beim Stoffwechsel und der Thermogenese: Stoffwechselwege wie Glukoneogenese, Glykogenolyse und Liponeogenese werden durch  $T_3$  stimuliert, ein Enzym wie die  $Na^+K^+$ -ATPase hochreguliert. Die  $Na^+K^+$ -ATPase ist für einen Großteil des Sauerstoffverbrauchs in Geweben verantwortlich und setzt bei der Spaltung von ATP Wärme frei. Ein ebenfalls an der Thermogenese beteiligtes Enzym ist das mitochondriale Entkopplungsprotein UCP1 (*uncoupling protein*), dessen Expression  $T_3$ -abhängig stimuliert wird. Des Weiteren wirken Schilddrüsenhormone auf Wachstum und Entwicklung. Sie nehmen direkten Einfluss auf die Biosynthese des Wachstumshormons (GH) sowie verschiedener Wachstumsfaktoren wie IGF1 (*insulin growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*).

Die Metamorphose von Kaulquappen zu Fröschen ist ein gutes Beispiel für schilddrüsenhormonabhängige Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge.  $T_3$  vermittelt hierbei die Rückbildung von Kiemen und Schwanz, die Reifung von Lunge und Darm und die Neuordnung des Nervensystems (Ishizuya-Oka et al., 2010). Durch Studien in *Xenopus laevis* (Afrikanischer Krallenfrosch) konnte gezeigt werden, dass nicht nur das Vorhandensein selbst, sondern auch der Zeitpunkt der  $T_3$ -Wirkung von Bedeutung ist. Auch im Menschen ist die  $T_3$ -vermittelte Entwicklung von Geweben und Organen zeitlich reguliert. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die embryonale Entwicklung des Gehirns (Abb.1-4). Tritt während der Schwangerschaft eine maternale Hypothyreose auf, so kann die Unterversorgung des Embryos mit  $T_3$  zu Hörschäden, Lern- und Gedächtnisschwächen und zu Beeinträchtigungen der Feinmotorik führen (Zoeller and Rovet, 2004).

### 1.2.1. Schilddrüsenhormone während der Entwicklung des Gehirns

*“Thyroid hormones (...) are essential for the development and maintenance of normal physiological processes, especially those of the central nervous system, where thyroid hormones assist in brain maturation throughout gestation.”*

(Patel et al., 2011)

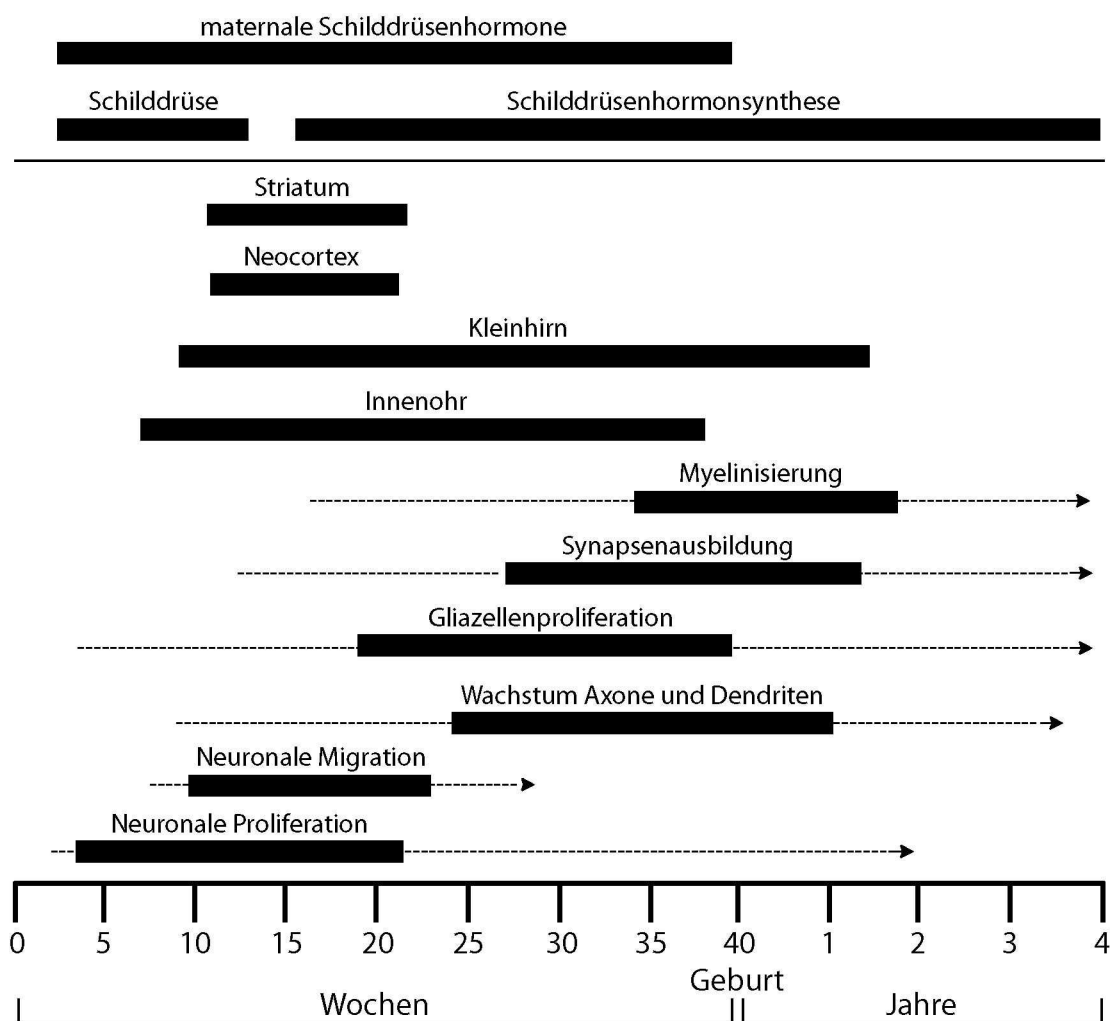
Die Reifung des Gehirns während der embryonalen Entwicklung ist abhängig von Schilddrüsenhormonen. Die Entwicklung der menschlichen Schilddrüse beginnt mit der dritten und endet mit der zwölften Schwangerschaftswoche (Obregon et al., 2007). Da die Produktion von Schilddrüsenhormonen nicht vor der sechzehnten Woche aufgenommen wird (Abb.1-4), wird die Versorgung des Embryos mit Schilddrüsenhormonen am Anfang einer Schwangerschaft durch die Mutter gewährleistet (Howdeshell, 2002; Zoeller and Rovet, 2004).

Die Entwicklung des menschlichen Gehirns beginnt mit der zweiten Schwangerschaftswoche und ist mit der Geburt noch lange nicht abgeschlossen (Abb.1-4). Schilddrüsenhormone spielen dabei eine wichtige Rolle. Sie sind verantwortlich für die neuronale Migration und Differenzierung (Auso et al., 2004), die Verzweigung von Dendriten (Heuer and Mason, 2003), die Reifung von Interneuronen (Gilbert et al., 2007) sowie die Synaptogenese und Myelinisierung. Ebenso von Bedeutung sind Schilddrüsenhormone für die Entwicklung des Innenohrs und der Netzhaut (Nunez et al., 2008). Das Fehlen von Schilddrüsenhormonen im ersten Trimester einer Schwangerschaft würde nach der Geburt zu Schwierigkeiten bei der visuellen Verarbeitung führen, im zweiten und dritten Trimester kämen Probleme bei der Fein- und Grobmotorik dazu und das Fehlen von Schilddrüsenhormonen nach der Geburt würde sich als Kretinismus manifestieren und eine geistige Retardierung nach sich ziehen. Die unterschiedlichen neurologischen Defekte sind demnach auf den Zeitpunkt der Unterversorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen zurückzuführen (Zoeller and Rovet, 2004)

Die Entwicklung des Nagerhirns setzt zusammen mit der Entwicklung der Schilddrüse ungefähr mit dem neunten Tag der Trächtigkeit ein (Patel et al., 2011).

Schilddrüsenhormone konnten allerdings schon zu einem früheren Zeitpunkt im Embryo nachgewiesen werden. Also wird auch beim Nager die Versorgung des Embryos mit Schilddrüsenhormonen durch das Muttertier gewährleistet.

Schilddrüsenhormone übernehmen bei der Ratte eine ähnliche Funktion wie beim Menschen (Howdeshell, 2002; Zoeller and Rovet, 2004). So wurde bei Ratten mit angeborener Hypothyreose beobachtet, dass die Größe der Zellkörper von Neuronen sowie das Wachstum von Dendriten und Axon minimiert sind (Patel et al., 2011).



**Abbildung 1-4:** Die Entwicklung des fetalen Gehirns unterliegt der zeitlichen Regulation durch Schilddrüsenhormone (Patel et al., 2011).

### 1.3. Schilddrüsenhormontransporter

*“Allan-Herndon-Dudley syndrome is an X-linked condition of mental retardation associated with severe mental retardation and mutations in MCT8.”*

(Schwartz and Stevenson, 2007)

1944 publizierten William Allan, Nash Herndon und Florence Dudley Beobachtungen einer vererbaren Krankheit, die sich durch Muskelschwäche, mentale Retardierung (Intelligenzquotient < 30) und Entwicklungsverzögerungen auszeichnete (Allan et al., 1944). Patienten waren unfähig, ihren Kopf zu halten, hatten Sprachdefizite, konnten teilweise weder sitzen noch laufen und hatten eine für die Krankheit typische langgezogene Gesichtsform mit großen Ohren und hängender Unterlippe (Friesema et al., 2006). Da es sich bei den Betroffenen hauptsächlich um männliche Patienten handelte, war die zweite Studie einer X-chromosomal gekoppelten Krankheit (zuvor Entdeckung des Fragilen-X-Syndroms) geboren (Schwartz et al., 1990).

Neben den genannten Symptomen weist das Allan-Herndon-Dudley Syndrom abnorme Schilddrüsenhormonwerte im Serum auf. So ist T<sub>3</sub> erhöht, T<sub>4</sub> und rT<sub>3</sub> verringert sowie TSH normal bis leicht erhöht (Patel et al., 2011). Der Grund für diese abweichenden Schilddrüsenhormonwerte war in einer Mutation des auf dem X-Chromosom lokalisierten *SLC16A2*-Gens gefunden (Friesema et al., 2003; Dumitrescu et al., 2004). *SLC16A2* kodiert für einen spezifischen Schilddrüsenhormontransporter, den Monocarboxylattransporter 8 (MCT8).

**Tabelle 1-1:** Kriterien mentaler Retardierung (Raymond, 2006)

Intelligenzquotient	mild	50-70	
	mäßig	35-49	schwerwiegend < 20
	ernst	20-34	
Symptome	mangelnde Kommunikation bzw. soziale Interaktion mangelnde Selbstversorgung (Gesundheit)		
Alter	Manifestation vor dem 18. Lebensjahr		

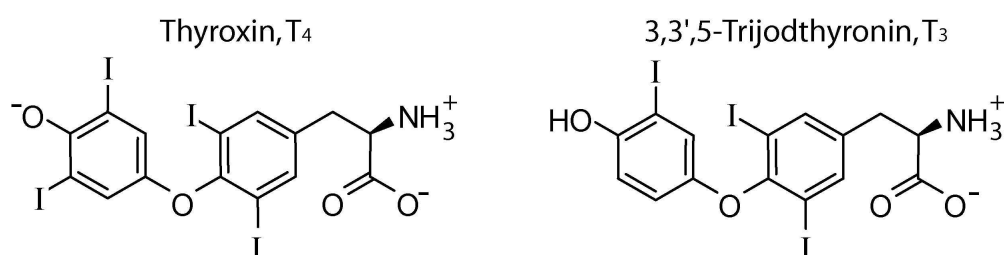
### 1.3.1. Monocarboxylattransporter 8

*“Although it was originally believed that thyroid hormones enter target cells by passive diffusion, it is now clear that cellular uptake is effected by carrier-mediated processes.”*

(Hennemann et al., 2001)

Entgegen der weitläufigen Meinung können Schilddrüsenhormone als lipophile Moleküle nicht frei über die Membran diffundieren (Hennemann et al., 2001). Schilddrüsenhormone sind bei physiologischem pH-Wert mehrfach geladen (Abb.1-5) und benötigen deshalb spezifische Transportproteine, um in die Zelle befördert zu werden. *Oatp2 (organic anion-transporting polypeptid)* war der erste Schilddrüsenhormontransporter, der kloniert werden konnte (Abe et al., 1998). Die Klonierung vieler weiterer Transportmoleküle aus unterschiedlichen Genfamilien folgte (Visser et al., 2008) bis die Arbeitsgruppe um Theo Visser eine systematische Suche nach potentiellen Schilddrüsenhormontransportern startete (Docter et al., 1997; Friesema et al., 1999), wobei schließlich der Monocarboxylattransporter 8 (MCT8) identifiziert wurde (Friesema et al., 2003).

MCT8 gehört zur *solute carrier family* und ist unter der Bezeichnung SLC16A2 bekannt. Anders als die weiteren Mitglieder der SLC16 Familie, die auch aromatische Aminosäuren (MCT10) oder Monocarboxylate wie Pyruvat oder Lactat (MCT1-4) transportieren, besitzt MCT8 eine Spezifität für Schilddrüsenhormone (Halestrap and Meredith, 2004; Jansen et al., 2005). Neben  $T_4$  und  $rT_3$  bevorzugt dieser Transporter  $T_3$ . Ein MCT8-vermittelter Transport von aromatischen Aminosäuren oder Lactat konnte nicht nachgewiesen werden (Friesema et al., 2003).



**Abbildung 1-5:** Die Schilddrüsenhormone  $T_3$  und  $T_4$  sind bei physiologischem pH-Wert mehrfach geladene Moleküle.

Die Expression von Schilddrüsenhormontransportern erfolgt gewebespezifisch. Verschiedene Transporter werden in diversen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Das Expressionsmuster von MCT8 schließt Organe wie die Niere, das Gehirn, die Leber und die Schilddrüse mit ein. In Tabelle 1-2 ist die Verteilung von MCT8 in den Geweben der Maus und des Menschen aufgeführt (Halestrap and Meredith, 2004; Jansen et al., 2005; Roberts et al., 2008; Visser et al., 2008).

**Tabelle 1-2:** Die Verteilung von MCT8 in Geweben der Maus und des Menschen

Mensch		Maus	
Leber	Thymus	Leber	Schilddrüse
Herz	Plazenta	Niere	Nebenniere
Darm	Muskel	Milz	Rückenmark
Pankreas	Lunge	Lunge	
Gonaden	Prostata	Gonaden	
Milz	Schilddrüse		
Gehirn		Gehirn	
- Hypothalamus, Hippocampus, Striatum		- Plexus choroideus	
- Gefäße, Plexus choroideus		- Kortex	
		- Gefäßen	
Hypophyse		Hypophyse	
- Follikularstelar Zellen			

1.3.1.1. Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom

Wie bereits erwähnt, führen Mutationen in MCT8/SLC16A2 zum Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS). Da das *SLC16A2*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, handelt es sich bei den Betroffenen meistens um männliche Patienten. Frauen bzw. Mütter sind Überträgerinnen des Gendefekts und von den neurologischen Auswirkungen je nach Art der Mutation meistens nicht oder nicht sehr stark betroffen (Frints et al., 2008). Nichtsdestotrotz ist ein Fall einer weiblichen AHDS-Patientin beschrieben. Die Patientin weist neben einer Chromosomentranslokation, die das



*SLC16A2*-Gen zerstört, eine 100%ige Inaktivierung des zweiten, „gesunden“ X-Chromosoms auf und zeigt daher AHDS-typische Symptome (Frints et al., 2008).

Die gewebespezifische Expression von MCT8 (und alternativer Transporter) ist dafür verantwortlich, dass einige Gewebe/Organe mit einer verringerten Sensitivität gegenüber Schilddrüsenhormonen (Schilddrüsenhormonresistenz) reagieren (Bernal, 2011). Besonders betroffen ist das Gehirn während seiner Entwicklung und Reifung, da beides wie bereits unter 1.2.1. beschrieben  $T_3$ -abhängig reguliert wird. In AHDS-Patienten bleibt der Transport von Schilddrüsenhormonen in die verschiedenen Zellen des Gehirns aus, man spricht von zerebraler Hypothyreose (Bernal, 2011). Kernspintomografische Aufnahmen von AHDS-Patienten konnten nachweisen, dass dieser hypothyreote Zustand eine transiente Myelinisierungsverzögerung zur Folge hat (Sijens et al., 2008).

Andere Gewebe/Organe wie z.B. der Muskel sind nicht auf MCT8 als Schilddrüsenhormontransporter angewiesen. Sie exprimieren andere Transporter, die die Funktion von MCT8 kompensieren, wodurch diese Gewebe/Organe einer erhöhten  $T_3$ -Konzentration ausgesetzt sind. Man spricht von peripherer Hyperthyreose (Bernal, 2011). Den meisten AHDS-Patienten ist es nicht möglich zu laufen, zu sitzen oder ihren Kopf zu halten. Diese Symptome können teilweise durch den Abbau von Muskelmasse erklärt werden, hervorgerufen durch einen Überschuss an  $T_3$ .

#### 1.3.1.2. Das MCT8 *knock-out* Mausmodell

Zur Untersuchung der Pathophysiologie des Allan-Herndon-Dudley Syndroms wurde ein *Mct8 knock-out* Mausmodell entwickelt (Dumitrescu et al., 2004; Trajkovic et al., 2007; Wirth et al., 2009). *Mct8*-defiziente Mäuse weisen ähnlich wie AHDS-Patienten einen endokrinologischen Phänotyp auf (Dumitrescu et al., 2004; Trajkovic et al., 2007), besitzen aber überraschenderweise keinen offensichtlichen neurologischen Defekt (Trajkovic et al., 2007; Wirth et al., 2009).

Die endokrinologischen Veränderungen äußern sich in verringerten  $T_4$ - und  $rT_3$ -Werten, hohen  $T_3$ -Spiegeln und erhöhten TSH-Werten im Serum. Aufgrund der fehlenden Expression eines funktionsfähigen *Mct8* in der Schilddrüse werden Schilddrüsenhormone (vor allem  $T_4$ ) verringert sekretiert und akkumulieren im Schilddrüsengewebe. Außerdem ist die Expression der Dejodase 1 in Leber und

Niere positiv  $T_3$ -reguliert (Zavacki et al., 2005). Man vermutet, dass die Dejodase 1 der hyperthyreoten Leber und Niere vermehrt  $T_4$  zu  $T_3$  umsetzt und  $rT_3$  zu  $T_2$  degradiert.

Die  $T_3$ -Aufnahme im Gehirn ist gestört, der  $T_3$ - und  $T_4$ -Gehalt verringert. Das Gehirn wirkt dem hypothyreoten Zustand entgegen, indem die Dejodase 2 ( $T_4$  zu  $T_3$ ) hochreguliert wird und die Expression der Dejodase 3 ( $T_4$  zu  $rT_3$ ) abnimmt (Bernal, 2011).

Mct8 ist bereits in sehr frühen Stadien der Entwicklung in Neuronen des Maushirns nachweisbar (Heuer et al., 2005). Ebenso wird Mct8 an der Bluthirnschranke und im Plexus choroideus exprimiert, wo es für den Transport von Schilddrüsenhormonen aus dem Blut bzw. der Zerebrospinalflüssigkeit in die Zellen des Gehirns verantwortlich ist (Heuer et al., 2005; Roberts et al., 2008). Nichtsdestotrotz wiegen Mutationen im murinen *Slc16a2*-Gen weniger schwer als *MCT8*-Mutationen in AHDS-Patienten. Nach der Formulierung der Hypothese kompensierender Transporter, welche während der Embryonalentwicklung der Maus den Funktionsverlust von Mct8 ausgleichen, konnte tatsächlich gezeigt werden, dass isolierte primäre kortikale Neurone von *Slc16a2*-defizienten Mäusen eine Restaktivität an  $T_3$ -Transport aufweisen (Wirth et al., 2009). Daraufhin wurden mehrere mögliche  $T_3$ -Transporter in Neuronen identifiziert, wobei der L-Typ Aminosäuretransporter 2 die höchste Expression zeigte, ein Transporter, dessen Expression in Neuronen während der humanen embryonalen Hirnentwicklung nicht nachgewiesen werden konnte (Wirth et al., 2009).

### 1.3.2. L-Typ Aminosäuretransporter 2

*“The ubiquitous system L transport activity for large, neutral amino acids across plasma membranes is an exchanger that functions independently of  $Na^+$  or other ions”*

(Verrey, 2003)

Aminosäuren sind Zwitterionen, die Transportsysteme benötigen, um Lipidmembranen zu passieren (Christensen, 1990). Von großer Bedeutung sind diese Transportsysteme in Niere und Dünndarm, wo sie zum einen verhindern, dass

Aminosäuren über die Niere ausgeschieden werden, und zum anderen dafür verantwortlich sind, Aminosäuren aus dem Dünndarmlumen über das Darmepithel ins Blut zu transportieren (Broer, 2008).

Im Gehirn werden Aminosäuretransporter an der Bluthirnschranke exprimiert, um die Aufnahme von Neurotransmittern wie Glycin, Aspartat und Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu gewährleisten. Das metabolische Zusammenspiel zwischen Astrozyten und Neuronen ist ebenfalls von Aminosäuretransportern abhängig (Wagner et al., 2001).

Defekte in Aminosäuretransportsystemen führen mitunter zu schwerwiegenden Erkrankungen, deren Ursachen in einer intestinalen Malabsorption oder renalen Aminoazidurie zu finden sind und mit einer neurologischen Symptomatik einhergehen können (Broer, 2008). So liegen neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer Krankheit, Chorea Huntington und der Amyotrophen Lateralsklerose die Mutation des Glutamatttransporters EAAT2 zugrunde (Kim et al., 2011).

Die Einteilung der Aminosäuretransporter in Systeme ergibt sich durch die Spezifität des Aminosäuretransports. Das System L transportiert  $\text{Na}^+$ -unabhängig neutrale Aminosäuren (Ausnahme: Prolin) und wird über seine BCH-Sensitivität (2-Amino-Bicycloheptan-2-Carbonsäure) charakterisiert (Weissbach et al., 1982). Der L-Typ Aminosäuretransporter 2 (LAT2/SLC7A8) als Mitglied des System L ist ein *Exchanger* mit einer 1:1 Stöchiometrie (Pineda et al., 1999; Meier et al., 2002), der vor allem im proximalen Tubulus der Niere sowie im Jejunum und Ileum exprimiert wird (Rossier et al., 1999). In beiden Geweben ist LAT2 basolateral lokalisiert.

Der L-Typ Aminosäuretransporter 2 besitzt zwölf Transmembrandomänen und bildet zusammen mit dem Glykoprotein 4F2hc/SLC3A2 ein Heterodimer (Mastroberardino et al., 1998). LAT2 ist dabei für die katalytische Aktivität und die Spezifität des Aminosäuretransports verantwortlich (Kanai et al., 1998), 4F2hc/SLC3A2 lokalisiert den Transporter an der Plasmamembran (del Amo et al., 2008).

Bereits Anfang 1990 konnte die Beteiligung des System L an der Schilddrüsenhormonaufnahme in Astrozyten und Neuronen nachgewiesen werden (Blondeau et al., 1993; Chantoux et al., 1995). Schließlich charakterisierte Friesema et al. (2001) die murinen L-Typ Aminosäuretransporter 1 und 2 als Schilddrüsenhormontransporter, wobei für das Lat1-Froschhomolog IU12 bereits zuvor die Fähigkeit des Schilddrüsenhormontransports nachgewiesen werden konnte (Ritchie et al., 1999).

### 1.3.3. Der Schilddrüsenhormontransport im Gehirn

*“When we apply the concept of facilitated diffusion or active transport of thyroid hormones to the brain, it becomes immediately apparent that thyroid hormones must cross several membranes on their way from the plasma to their receptor, located e.g., in the neuronal nucleus.”*

(Braun et al., 2010)

Das Gehirn ist aus verschiedenen Zelltypen aufgebaut. Neben Neuronen, die für die Erregungsleitung zuständig sind, besteht ein großer Teil des Gehirns aus Gliazellen. Zu den Gliazellen zählen Astrozyten, die unter anderem Neurone ernähren, indem sie die Verbindung zwischen Neuron und Bluthirnschranke darstellen, Oligodendrozyten, deren zelluläre Fortsätze Markscheiden aus Myelin bilden, um Axone elektrisch zu isolieren und Mikroglia, die die lokalen Makrophagen des Zentralen Nervensystems darstellen.

Der Schilddrüsenhormontransport im Gehirn ist abhängig von der (Ko-)Expression verschiedener Transporter in unterschiedlichen Zelltypen (Abb.1-6). Der vollständige Ablauf des Transports ist bis heute noch nicht aufgeklärt. Die vorläufige Hypothese über die transportervermittelte Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in das Nagerhirn lautet wie folgt: Als erstes Hindernis treffen Schilddrüsenhormone auf die Bluthirnschranke. Die Bluthirnschranke exprimiert neben Mct8 (Roberts et al., 2008; Braun et al., 2011a) und Lats (Wade and Katzman, 1975; Pardridge, 1979), auch Oatp1c1 (*organic anion-transporting polypeptid*) (Sugiyama et al., 2003; Tohyama et al., 2004). Diese Transporter übernehmen den Transport von T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> aus dem Blut über die Endothelzellen der Bluthirnschranke zum Astrozyten. OATP1C1 konnte bis jetzt nur schwach exprimiert an der Bluthirnschranke von Menschen nachgewiesen werden (Roberts et al., 2008). In Affen ist dieser Transporter gar nicht nachweisbar (Ito et al., 2011). Er ist daher ein weiterer potentieller Kandidat, den Funktionsverlust des murinen Mct8 zu kompensieren. Oatp1c1 als T<sub>4</sub>-Transporter könnte somit einen Vorgang übernehmen, der bei Menschen und Affen möglicherweise ausschließlich über MCT8 vermittelt wird.

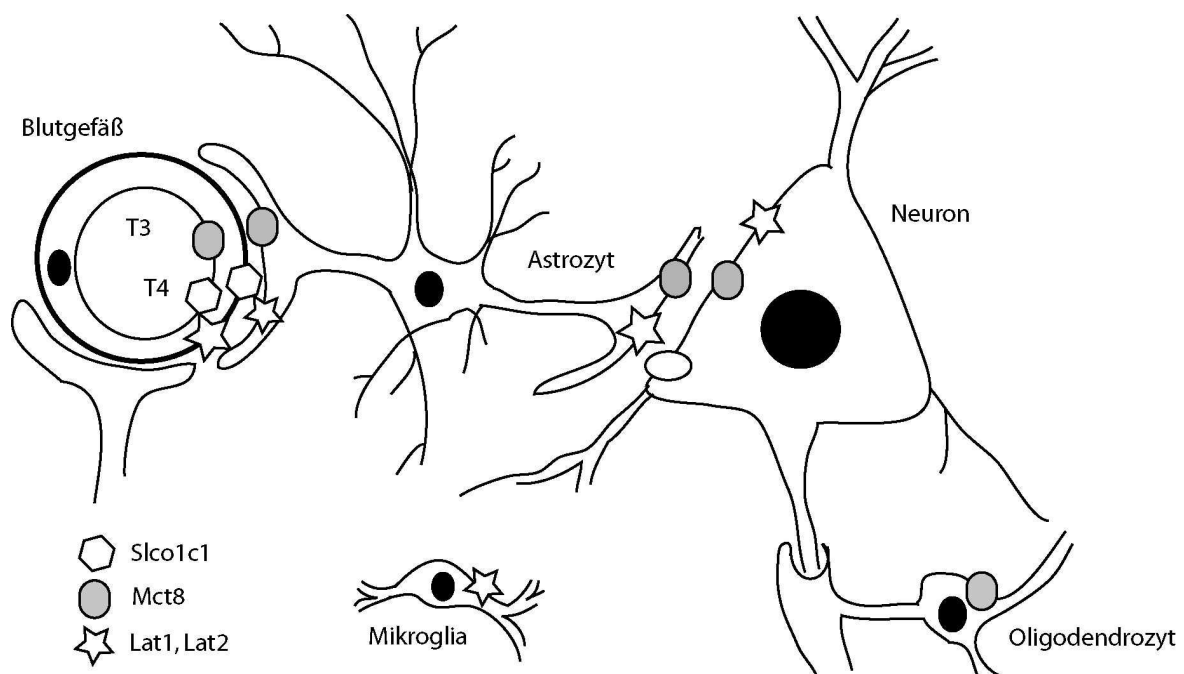
Dagegen spricht allerdings die Expression verschiedener anderer Mitglieder der OATP-Familie an der humanen Bluthirnschranke, die ebenfalls Schilddrüsen-

hormone transportieren können: OATP1A2/SLCO1A2 (Gao et al., 2000; Bronger et al., 2005; Lee et al., 2005), SLCO2B1 (Hagenbuch, 2007), OATP-E/SLCO4A1 (Fujiwara et al., 2001).

Die Aufnahme von  $T_4$  und  $T_3$  in Astrozyten ist abhängig von Mct8 und den L-Typ Aminosäuretransportern 1 und 2 (Braun et al., 2011a), Mitgliedern des Systems L.

$T_4$  wird durch die Dejodase 2 in  $T_3$  umgewandelt (Abb.1-1) und verlässt den Astrozyten, um über einen hauptsächlich Mct8-vermittelten Mechanismus in Neurone transportiert zu werden (Hagenbuch, 2007; Wirth et al., 2009). Die neuronale Expression von Lat2 und Lat1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Braun et al., 2011a). Im Neuron angekommen, kann  $T_3$  an seinen nukleären Rezeptor binden (Abb.1-2) oder durch die Dejodase 3 zu  $T_2$  (Abb.1-1) inaktiviert werden.

Oligodendrozyten und Mikroglia sind schilddrüsenhormonsensitive Zellen, deren Entwicklung und Überleben von Schilddrüsenhormonen abhängen (Barres et al., 1994; Lima et al., 2001; Jones et al., 2003). Protein und mRNA von Mct8 konnte in Oligodendrozyten, von Lat2 in Mikroglia nachgewiesen werden (Braun et al., 2011a).



**Abbildung 1-6:** Die (Ko-)Expression von Schilddrüsenhormontransportern in unterschiedlichen Zellen des Gehirns (Braun et al., 2010).

## 1.4. Strukturmodell des Monocarboxylattransporters 8

*“Structural models represent potential conformations of the target macro-molecule. Because of the well-known causal dependency between specific biological functions (...) and particular structural features, structural models are useful to guide experimental approaches or to support the interpretation of experimental data.”*

(Kleinau et al., 2011)

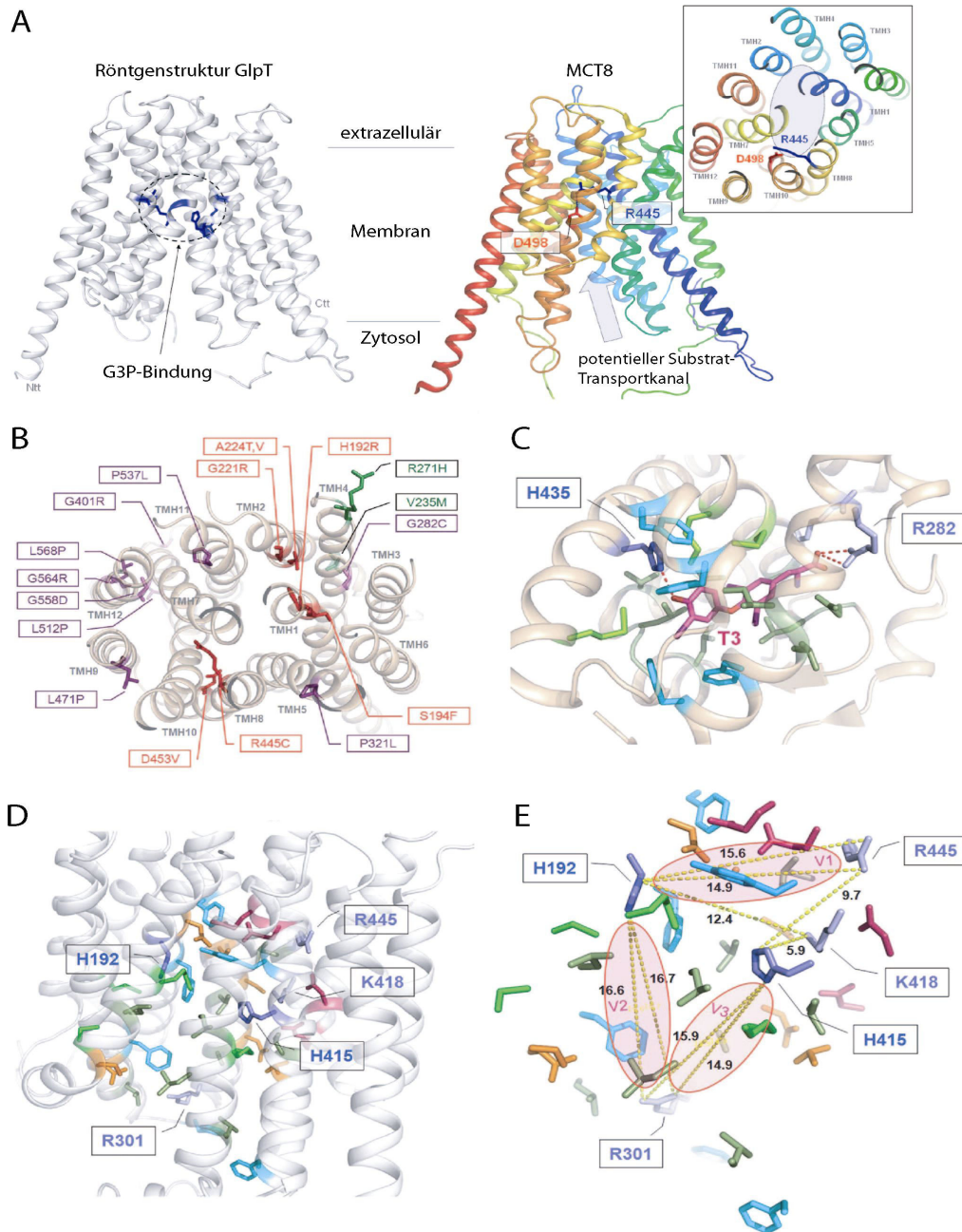
Das Transkript des *SLC16A2*-Gens umfasst 4,3 kb und besteht aus sechs Exons. Das erste Exon ist sehr groß und besitzt zwei alternative Startpunkte (Lafreniere et al., 1994), wodurch zwei mögliche Proteine exprimiert werden können. Das größere der beiden Proteine besteht aus 613 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 67 kDa, das kleinere Protein hingegen ist 74 Aminosäuren kürzer und hat ein Molekulargewicht von 59,5 kDa (Schwartz and Stevenson, 2007). Die Bedeutung der beiden Proteine ist unklar. Fakt ist, dass das kleinere Protein hoch konserviert ist, während die lange Version nur bei Primaten vorkommt.

Das murine *Slc16a2*-Gen teilt 85% Sequenzhomologie mit seinem humanen Gegenstück (Debrand et al., 1998) und führt zu einem Protein bestehend aus 545 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 60 kDa.

Alle Mitglieder der MCT-Familie sind Transporter mit zwölf Transmembrandomänen (N- und C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert), die nicht posttranslational phosphoryliert oder glykosyliert werden (Meredith and Christian, 2008). Hohe Sequenzübereinstimmungen zwischen den MCT-Mitgliedern finden sich in den Transmembranbereichen, Sequenzvariationen eher im C-Terminus und der großen intrazellulären Schleife zwischen Transmembranhelix sechs und sieben (Kinne et al., 2010). Die dreidimensionale MCT8-Struktur konnte noch nicht gelöst werden, wodurch die genaue Wirkungsweise des Transporters unklar ist und Fragen nach der Bindung des Substrats und dem Transportmechanismus offenbleiben.

#### 1.4.1. Die Struktur des Glycerol-3-Phosphattransporters als Vorlage für das MCT8-Homologiemodell

Mithilfe von Sequenzvergleichen zwischen den Mitgliedern der MCT-Familie und der Strukturvorlage des bakteriellen Glycerol-3-Phosphattransporters (GlpT) konnte ein Homologiemodell für MCT8 (Abb.1-7 A) entwickelt werden (Kinne et al., 2010). Sowohl GlpT als auch MCT8 gehören zur *Major facilitator* Superfamilie (MFS). Mitglieder dieser Familie transportieren gelöste Verbindungen und gehören den Uni-, Sym- oder Antiportern an. GlpT wurde bereits für Homologiemodelle von Mct1, Glut1 (Glukosetransporter) und Oatp1c1 (*organic anion-transporting polypeptid*) verwendet. Anhand eines Homologiemodells können bestehende experimentelle Daten überprüft und neue Überlegungen zum Wirkungsmechanismus angestellt werden. So sind pathogene *missense* Mutationen (Austausch einer Aminosäure) im Transportkanal von MCT8 zu finden (Abb.1-7 B) und Mutationen von bzw. zu Prolin oder Glycin führen sehr wahrscheinlich zu Fehlfaltungen des Proteins (Kleinau et al., 2011). Struktur-Funktionsanalysen weisen darauf hin, dass das zu transportierende Substrat bestimmte Eigenschaften erfüllen muss (Kinne et al., 2010): MCT8 transportiert nur L-Isomere bestimmter Jodthyronine, die außerdem an den 3- und 3'-Positionen jodiert sein müssen. Ebenso sind die Carboxyl- und Aminogruppen Voraussetzungen für den Transport durch MCT8. Diese Erkenntnisse führten zur Suche nach im Transportkanal gelegenen geladenen Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, indem sie mit den geladenen Seitenketten des Aminosäurerückgrats ( $\text{COO}^-$  und  $\text{NH}_3^+$ ; Abb.1-5) interagieren. Die Kristallstruktur der liganden-bindenden Domäne des  $\text{T}_3$ -Rezeptors offenbarte Arginin- und Histidinreste (Nascimento et al., 2006), die an der  $\text{T}_3$ -Bindung beteiligt sein könnten (Abb.1-7 C). Die beiden Aminosäurereste liegen im Protein 15 Ångström voneinander entfernt. Ähnliche His/Arg-Paarungen offenbart das MCT8-Homologiemodell (Kleinau et al., 2011). Arginin301 könnte sowohl mit Histidin192 als auch mit Histidin415 interagieren, um das Substrat zu binden (Abb.1-7 D). Auch hier liegt der Abstand beider Aminosäuren zueinander zwischen 15 Å und 16 Å (Abb.1-7 F).



**Abbildung 1-7:** (A) Die Kristallstruktur des bakteriellen GlpT dient als Vorlage für das Homologiemodell des humanen MCT8. (B) Pathogene Mutationen sind im Transportkanal des MCT8-Homologiemodells zu finden. (C) Die Kristallstruktur der liganden-bindenden Domäne des T<sub>3</sub>-Rezeptors offenbart an der Substratbindung beteiligte Aminosäuren (His435 und Arg282) im Abstand von 15 Å zueinander. (D) Zwei Histidinreste (His192, His415) und drei geladene Aminosäuren (Arg301, Arg445 und Lys418) sind potentiell an der Substratbindung beteiligt. (F) Auf Grundlage des MCT8-Homologiemodells konnten drei mögliche His/Arg-Kombinationen berechnet werden: His192/Arg301 (16 Å), His415/Arg301 (15 Å), His192/Arg445 (15 Å). Die His192/Arg445-Paarung ist in der vorliegenden *inside-open* Konformation des Modells unwahrscheinlich, da andere Aminosäuren die Interaktion stören würden. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass die MCT8-Mutation R445A vermindert T<sub>3</sub> transportiert. (Kinne et al., 2010; Kleinau et al., 2011)



## 1.5. Tyrosinkinase Inhibitoren

Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI) sind Medikamente, die zur Behandlung einer Vielzahl von Krebsarten angewendet werden. Das Wachstum von Krebszellen wird oft durch die Wirkung von Tyrosinkinasen gefördert. Tyrosinkinasen wie PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) sowie die RAF- und RET-Kinasen sind dabei an der Zellproliferation, der Metastasierung und der Angiogenese beteiligt (Mendel et al., 2003; Arora and Scholar, 2005). TKIs wurden entwickelt, um die ATP-Bindungstasche von Tyrosinkinasen zu blockieren und somit die oben genannten Vorgänge zu hemmen.

Sunitinib (Sutent) war einer der ersten TKIs, der zur Behandlung des Renalen Zellkarzinoms und Gastrointestinaler Stromatumore (GIST) eingesetzt worden ist (Desai et al., 2006; Rini et al., 2007). Klinische Studien und Fallberichte zeigten allerdings, dass Patienten ohne vorherige Schilddrüsenabnormalitäten durch die Behandlung mit Sunitinib Nebenwirkungen wie primäre Hypothyreose, Thyreoditis und Schilddrüsenatrophie entwickelten (Desai et al., 2006; Faris et al., 2007; Feldman et al., 2007; Mannavola et al., 2007; Rini et al., 2007; Wong et al., 2007; Wolter et al., 2008). Sunitinib führte außerdem zu einem erhöhten Bedarf an Levothyroxin in athyreoten Patienten (Wong et al., 2007), ein Effekt, der auch für einen anderen TKI namens Imatinib beobachtet werden konnte (de Groot et al., 2005). Imatinib dient bei Sunitinib-Resistenz zur Behandlung von GIST, ebenso wird es bei Chronischer Myeloider Leukämie (CML) eingesetzt (de Groot et al., 2005; Dora et al., 2008).

Potentielle molekulare Mechanismen, die für die Sunitinib-induzierte Hypothyreose verantwortlich sein könnten, wurden *in vitro* und *in vivo* untersucht. Sunitinib inhibierte dabei sowohl Peroxidasen (Wong et al., 2007) als auch das Wachstum von FRTL-5 Zellen (Schilddrüsenzelllinie der Ratte). Die Jodidaufnahme hingegen genauso wie die Genexpression des Natrium-Jodid-Symporters und des TSH-Rezeptors waren nicht negativ beeinflusst (Salem et al., 2008).

Auch die TKIs der zweiten Generation wie Dasatinib, eigentlich als Weiterentwicklung zur Verhinderung von Nebenwirkungen gedacht, führten in CML-Patienten zu anormalen Schilddrüsenfunktionstests (Kim et al., 2010).

## 1.6. Zielstellung

Aufbauend auf der Hypothese, dass alternative Schilddrüsenhormontransporter existieren, sollte die Expression und Verteilung von Schilddrüsenhormontransportern im Gehirn der Maus besser charakterisiert werden.

Da Lat2 als Kandidat für die Kompensation des Mct8-Defektes bei der Maus vorgeschlagen wurde, sollte der Phänotyp der *Slc7a8*-defizienten Maus u.a. hinsichtlich Veränderungen der Schilddrüsenhormonachse sowie des Schilddrüsenhormontransports in primären Zellen untersucht werden. Dazu wurde die Methode der Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten etabliert.

Da die Verkreuzung von *Slc16a2*- und *Slc7a8*-defizienten Mäusen aus nicht geklärten Gründen (bis auf drei Tiere) keine doppelt-defizienten Nachkommen mehr geliefert hatte, wurde die biochemische Untersuchung von MCT8 in den Vordergrund gerückt.

Ziel war es, Struktur-Funktionsbeziehungen hinsichtlich der potentiellen Ligandenbindungsstelle in MCT8 zu untersuchen. Hypothesen wurden anhand des Homologiemodells formuliert. Dazu wurde die Arbeit mit *Xenopus* Oozyten und radioaktiv-markiertem  $^{14}\text{C}$  etabliert.

Des Weiteren wurde eine neue pathogene MCT8-Mutation einer weiblichen AHDS-Patientin (gefunden am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin) molekularbiologisch nachgebaut und auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht.

Während der Arbeit wurde die Hypothese formuliert, dass TKIs die Aktivität von MCT8 beeinträchtigen und so die ungeklärten Effekte auf die Schilddrüsenhormonachse ausüben. Diese Hypothese wurde experimentell geprüft.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und vorgefertigte Reagenziensysteme

Chemikalien wurden bei folgenden Herstellern bzw. Vertrieben erworben: Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim). Detaillierte Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen werden im Methodenteil aufgeführt.

Übliche Verbrauchsmaterialien für den Laborbedarf wurden von folgenden Herstellern bzw. Vertrieben bezogen: Amersham (München), A. Hartenstein (Würzburg), Bio-Rad Laboratories (München), GE Healthcare (München), Invitrogen (Darmstadt), Merck Biosciences (Schwalbach), Eppendorf (Hamburg), peqLab Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim). Verbrauchsmaterialien und Medien für die Zellkultur wurden bei folgenden Herstellern bzw. Vertrieben erworben: Biochrom (Berlin), Life Technologies (Darmstadt) und Qiagen (Hilden).

**Tabelle 2-1:** Vorgefertigte Reagenziensysteme

Reagenziensystem	Bezugsquelle
Absolute™ QPCR SYBR® Green Fluorescein Mix	ThermoScientific, UK
Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, UK
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, München
Cell Surface Isolation Kit	ThermoScientific, UK
Dako Cytomation System	DAKO, Dänemark
FastPlasmid™ Mini Kit	Eppendorf, Hamburg
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad Laboratories, München
mMessage mMachine® T7 Kit	Life Technologies, USA
M.O.M. Kit	Vector, USA
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
Perfectprep® Gel Cleanup	Eppendorf, Hamburg
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega, Mannheim
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim

Radioaktiv-markierte Substanzen wurden ausschließlich über Perkin Elmer (MA, USA) bezogen. In Tabelle 2-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten vorgefertigten Reagenziensysteme (*Kits*) aufgeführt. Beschreibungen zu den einzelnen *Kits* finden sich in dem jeweiligen Methodenteil.

### 2.1.2. Geräte, Software und Datenbanken

**Tabelle 2-2:** Geräte

Gerät	Hersteller
Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss, Jena
Beta-Counter, Wallac 1409	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Dismembrator	B. Braun Biotech International, Melsungen
Eppendorf <i>research</i> (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer, horizontal, Blue Marine 200	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Gamma-Counter, Wallac 1470	PerkinElmer, Massachusetts, USA
iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München
Inkubator HERAccl®	Heraeus Holding, Hanau
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Leica ASP300 Entwässerung	Leica, München
Leica CM 3000 Kryostat	Leica, München
Leica EG 1160 Einbettung	Leica, München
Leica RM2125RT Mikrotom	Leica, München
Magnetrührer Modell L32A	Hartenstein, Würzburg
Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg
Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Netzgerät BluePower PLUS	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Netzgerät EPS601 Power Supply	GE Healthcare Europe, München
pH-Meter inoLab	Benchtop WTW, Weilheim
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Präparierbesteck	FST Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Röntgenfilmkassette	Kodak, Rochester, USA
Rotarod	Jones & Roberts, USA
Safe 2010 Laminair	Heto-Holten, Dänemark
Ultraschallstab	Labsonic M B. Braun Biotech, Melsungen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Transferblotapparatur Transblot SD	Bio-Rad Laboratories, München
UV-Transilluminator , V-90M	Benda, Weisloch
Vortex	A. Hartenstein, Würzburg
Waage CP 2201	Sartorius, Göttingen

**Tabelle 2-3:** Software

Name	Hersteller
Adobe Illustrator 10	Adobe Systems GmbH (München)
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH (München)
Axio Vision Rel. 4.7	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
BioEdit 7.0.1	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA/USA)
EndNote	Thomson Reuters (New York, USA)
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Prism Software (San Diego, CA/USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)

**Tabelle 2-4:** Datenbanken

Name	Internetadresse
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
NEBcutter V2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed</a>

### 2.1.3. Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper samt Verdünnungen sind Tabelle 2-5 zu entnehmen.

**Tabelle 2-5:** Antikörperverdünnungen

Antikörper	WB	IHC	Firma
primäre Antikörper:			
anti-Calbindin (rabbit)		1:1000	Swant, Schweiz
anti-GFAP (mouse)		1:400	Sigma, Deutschland
anti-Lat2 (rabbit) IG1004	1:200	1:50	ImmunoGlobe, Deutschland
anti-MCT8 (rabbit)	1:500	1:250	Atlas, Schweden
anti-Parvalbumin (mouse)		1:1000	Swant, Schweiz
anti-β-Aktin (rabbit)	1:2000		Rockland, USA
sekundäre Antikörper:			
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG		1:200	Jackson ImmunoResearch, USA
Cy2 <sup>Im</sup> goat anti-rabbit IgG		1:1000	Jackson ImmunoResearch, USA
Cy3 <sup>TM</sup> goat anti-mouse IgG		1:1000	Jackson ImmunoResearch, USA
Polyclonal goat anti-rabbit HRP	1:2000		Dako, Hamburg

WB - Western Blot, IHC - Immunhistochemie

#### 2.1.4. Mauslinie

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse der Linie *Slc7a8* (genetischer Hintergrund: C57Bl/6) wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung der Charité-Universitätsmedizin, Berlin (Virchow Klinikum) nach Vorgaben der lokalen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, #T458/09) unter pathogen-freien Bedingungen und automatisch kontrolliertem Hell-Dunkel-Zyklus (12:12) sowie Temperatur gezüchtet und gehalten. Die Gabe von Standard-Zuchtfutter für Nager (Snniff, Soest, Deutschland) und Wasser erfolgte *ad libitum*.

Die Generierung *Slc7a8*-defizienter Mäuse erfolgte durch Deltagene. Veranlasst durch das NIH, wurden die Mäuse im *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, USA) gehalten, dort aber nicht weiter untersucht. Die Einführung einer  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin-Phosphotransferase-II-Kassette mit poly-A-Signal (*geo cassette*) in das Exon 2 des *Slc7a8*-Allels führte zu einem teilweisen Austausch der für die Transmembranhelix eins und zwei kodierenden Sequenz.

Zur Vermeidung parentaler Effekte auf die Nachkommenschaft wurden nur heterozygote Tiere miteinander verpaart. Mögliche Genotypen der Nachkommen waren: *Slc7a8*<sup>+/+</sup> (Wildtyp), *Slc7a8*<sup>+/-</sup> (heterozygot) und *Slc7a8*<sup>-/-</sup> (*knock out*).

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Genotypisierung *Slc7a8*-defizienter Mäuse

Zur Genotypisierung der Nachzucht *Slc7a8*-defizienter Mäuse wurde genomische DNA aus Ohrloch- bzw. Schwanzbiopsien gewonnen. Je nach Größe der Biopsien wurden die Proben mit 50 - 150  $\mu$ l alkalischem Lysepuffer (Chomczynski and Rymaszewski, 2006) versetzt, gemischt und circa 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. PCR-Ansatz, PCR-Programm und Primersequenzen zur Genotypisierung sind Tabelle 2-6 zu entnehmen. 15  $\mu$ l des PCR-Ansatzes wurden nach erfolgter PCR-Reaktion mit 3  $\mu$ l DNA-Probenpuffer (6x) versetzt und gelelektrophoretisch in einem 1,5%igen, mit Ethidiumbromid-versetzten Agarosegel in 1x SB-Puffer für 20 min bei 260 V unter Mitführung eines Größenstandards (Gene Ruler<sup>TM</sup> 1 kb DNA ladder plus,

Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mittels Photographie des Agarosegels unter UV-Illumination.

**Tabelle 2-6:** Genotypisierungs-PCR *Slc7a8*-defizienter Mäuse

PCR-Ansatz	PCR-Programm
1 µl genomische DNA	
3 µl 10x SupraTherm™ Puffer (Gene Craft)	94°C - 3 min
3 µl 10mM dNTP-Mix (Eppendorf)	94°C - 30 s
je 1 µl 10 µM Primer	61°C - 40 s 35 Zyklen
0,1 µl SupraTherm™ Taq (Gene Craft)	72°C - 60 s
ad 30 µl dH <sub>2</sub> O	72°C - 3 min
Primersequenzen	
5'- CAAATGCCAGCTGTCCTGACCTCAC - 3'	
5'- AGACTTAGGGATGGTGACGCCTAG - 3'	
5'- GGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCT - 3'	

Die für die Gelelektrophorese notwendigen Pufferzusammensetzungen sind Tabelle 2-7 zu entnehmen.

**Tabelle 2-7:** Pufferzusammensetzungen (1)

Puffer	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	0,1 % (w/v) DEPC in dH <sub>2</sub> O, 24 h offen unter dem Abzug inkubieren, danach autoklavieren
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (w/v) Glycerin in dH <sub>2</sub> O
SB-Puffer (20x)	8 g NaOH, 45 g Borsäure ad 1 l dH <sub>2</sub> O
SB-Puffer (1x)	Verdünnung des 20x SB-Puffers in dH <sub>2</sub> O

### 2.2.2. Rotarod

Rotarod-Analysen wurden zum Nachweis von Koordinationsstörungen bei Mäusen herangezogen. Es wurde die Verweildauer des einzelnen Tieres auf der Drehstapparat während sechs nacheinander folgenden Läufen mit jeweils einer maximalen Dauer von 5 min gemessen. Nach jedem Lauf wurde eine Erholungsphase von 5 min eingehalten. Die Mäuse waren während der Läufe einer ansteigenden Drehzahl ausgesetzt und lösten beim Verlassen der Apparatur einen Kontakt aus, durch den es möglich war, die genaue Verweildauer zu bestimmen.

### 2.2.3. Probengewinnung

Die Tötung von Versuchstieren erfolgte nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Versuchstiere ab dem 20. Lebensstag wurden durch Kohlenstoffdioxidinhalation betäubt und anschließend dekapitiert. Bei jüngeren Tieren erfolgte eine direkte Dekapitation. Nach der Tötung entnommene Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Gewinnung von Gewebepulver wurden die entnommenen Organe mithilfe eines Dismembrators zermahlen. Das Gewebepulver diente der Aufarbeitung von Proteinen und RNA zur weiteren Analyse. Alle benötigten Hilfsmittel wurden in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis vorgekühlt, das jeweilige Organ zusammen mit einer gekühlten Wolframkarbid-Zertrümmerungskugel in ein gekühltes Teflongefäß gegeben und im Dismembrator bei einer Frequenz von 2000 rpm für 60 s pulverisiert. Kleine Organe wie Schilddrüse, Hypophyse, Hypothalamus und Kleinhirn wurden nicht zermahlen sondern im vorgekühlten Mörser zerrieben. Das Gewebepulver wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Entnommene Organe, die für immunhistochemische Untersuchungen vorgesehen waren, wurden in 4 % Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  fixiert. Fixierte Gewebe wurden entweder entwässert, in Paraffin eingebettet und bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt oder in 30%iger Zuckerlösung kryoprotectiert, auf Trockeneis eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Absinken der in Zuckerlösung eingelegten Gewebe auf den Boden des Reaktionsgefäßes zeigte die Vollendung der Kryoprotektion an. Die Zusammensetzung der verschiedenen Puffer ist Tabelle 2-8 zu entnehmen.

**Tabelle 2-8:** Pufferzusammensetzungen (2)

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O
Phosphatpuffer (0,2 M)	80 % (v/v) 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung 20 % (v/v) 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung, pH 7,4
Paraformaldehyd (4 %)	40 g PFA (w/v) in 500 ml dH <sub>2</sub> O und einem NaOH-Plätzchen lösen, filtrieren, Zugabe von 400 ml 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung einstellen
Zuckerlösung (30 %)	30 % (w/v) Saccharose in 0,2 M Phosphatpuffer



## 2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

Die in diesem Abschnitt verwendeten Arbeitslösungen und Puffer wurden wie in Tabelle 2-9 beschrieben hergestellt.

**Tabelle 2-9:** Pufferzusammensetzungen (3)

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,3 % (w/v) Tween20 in 1x PBS
Homogenisationspuffer	250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O, pH 7,4
Gellösung (20 %)	162,3 ml Acrylamid, 65 ml Bisacrylamid, ad 250 ml dH <sub>2</sub> O
Laemmli-Probenpuffer (4x)	200 mM Tris pH 6,8, 40 % Glycerol, 16 % SDS, 20 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau in dH <sub>2</sub> O
Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
Laufpuffer (1x)	Verdünnung des 10x Laufpuffers in dH <sub>2</sub> O
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 2,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l dH <sub>2</sub> O, pH 7,4
PBS (1x)	Verdünnung 10x PBS in dH <sub>2</sub> O
Ponceau-Rot	0,1 % Ponceau-Rot in 5 % Essigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
TBS (20x)	33 g Tris, 74 g NaCl, 30 g Tween in dH <sub>2</sub> O, pH 8,0
TBS (1x)	Verdünnung 10x TBS in dH <sub>2</sub> O
Transferpuffer (10x)	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris in dH <sub>2</sub> O
Transferpuffer (1x)	100 ml 10x Transferpuffer, 100 ml Methanol, ad 1 l dH <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
Waschpuffer	0,03 % Tween20 in 1x PBS

### 2.2.4.1. Western Blot

#### *Proteinextraktion aus Gewebepulver*

Eine Spatelspitze Gewebepulver wurde in ein auf Trockeneis vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 250  $\mu$ l Homogenisationspuffer plus 1 mM DTT (80  $\mu$ l plus 1 mM DTT für Schilddrüse, Hypophyse und Hypothalamus) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (Amplitude: 100, Zyklus: 0,6). Zur Anreicherung der Membranproteine wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 13.000 xg zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt

und das Pellet, das die Membranfraktion enthielt, in 200 µl Homogenisationspuffer plus 1 mM DTT mittels Ultraschall (wie oben) gelöst.

Um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) angewendet. Bei der Verbindung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit Proteinen verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm. Diese Verschiebung ist photometrisch messbar und wurde dazu genutzt, den Proteingehalt einer Probe zu ermitteln. 1000 µl Bio-Rad Protein Assay (1:5 Verdünnung) wurden in einer Einwegküvette (Sarstedt) vorgelegt, mit 1 µl Probe versetzt, gut durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Messung der Probe in einem Biophotometer konnte der Proteingehalt anhand einer Standardgeraden errechnet werden, die parallel zu den Proben mit Rinderserumalbumin (0 - 36 µg/µl) erstellt wurde.

#### *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Natriumdodecylsulfat lagert sich an Proteine an, überdeckt deren Eigenladung und verleiht ihnen eine einheitlich negative Ladung aufgrund derer Proteine nach ihrem Molekulargewicht während einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden können (Laemmli, 1970). Proteinmenge und Gelzusammensetzung sind Tabelle 2-10 zu entnehmen. Das zu untersuchende Proteinhomogenat wurde mit dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 15 µl aufgefüllt, anschließend mit 5 µl denaturierendem Laemmli-Probenpuffer (4x) versetzt und bei 95°C für 10 min inkubiert. Der Gellauf erfolgte in einem Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell System bei 60 V im Sammelgel bzw. 120 V im Trenngel in Laufpuffer bis die untere Markerbande (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) das Gel verlassen hatte.

#### *Transfer und Immundetektion*

Nach dem Gellauf (Laemmli, 1970) erfolgte die Immobilisierung von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman<sup>®</sup>) nach dem semi-dry Verfahren in einem Trans-Blot System bei 25 V und 250 mA für 40 min. Um zu kontrollieren, ob der Transfer erfolgreich war, wurde die Membran für 30 s in Ponceau-Rot geschwenkt und anschließend mit dH<sub>2</sub>O gespült bis Banden sichtbar wurden.

Nach Inkubation der Membran in Blockierungspuffer (60 min, RT) erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper (verdünnt in Blockierungspuffer) bei

4°C über Nacht. Nachdem die Membran am nächsten Tag weitere 30 min bei Raumtemperatur im Erstantikörper geschwenkt wurde, folgten drei Waschschrirte à 10 min in Waschpuffer mit anschließender Inkubation der Membran im Zweitantikörper (verdünnt in Blockierungspuffer, 45 min, RT). Weitere Waschschrirte (s.o.) folgten, bevor das gesuchte Protein mittels ECL-Reagenz auf einem Chemilumineszenz-Films detektiert werden konnte. Die Filme wurden eingescannt und am Computer mithilfe von Adobe Photoshop 7.0 und Adobe Illustrator 10 bearbeitet.

**Tabelle 2-10:** Proteinmengen und Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels

	Proteinmenge	
adulte Mausgewebe	80 µg Membranprotein	
Zellysat	100 µg Gesamtprotein; 15 µl Lysat (Oberflächenbiotinylierung)	
<i>Xenopus</i> Oozyten	4 Oozyten in 50 µl Homogenisationspuffer plus 1 mM DTT; 10 µl eingesetzt	
	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (5 %)
dH <sub>2</sub> O	1,25 ml	2 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	
Sammelgelpuffer		1 ml
Gellösung (20 %)	6,25 ml	1 ml
Temed	10 µl	4 µl
APS (10 %)	100 µl	40 µl

#### 2.2.4.2. Dejodase-Assay

Der radioaktive Dejodase-Assay dient der Bestimmung der enzymatischen Aktivität von 5'-Dejodasen. Gemessen wird die Freisetzung eines radioaktiv-markiertem Jodidmoleküls (<sup>125</sup>I), das an der 5'-Position (Abb.1-1) des Phenolrings eines radioaktiv-markierten rT<sub>3</sub>-Moleküls (<sup>125</sup>I-rT<sub>3</sub>) abgespalten wurde. Die Unterscheidung der 5'-Aktivitäten von Dejodase 1 und Dejodase 2 resultierte aus dem Einsatz von Propylthiouracil (PTU), einem spezifischen Dejodase-1-Inhibitor. Die Aktivität beider Dejodasen kann somit in einem parallelen Ansatz durch Differenzmessung bestimmt werden.

Die Aufarbeitung der Proteinhomogenate erfolgte wie unter 2.2.4.1. beschrieben. Die pro Reaktionsansatz eingesetzte Proteinmengen (in 40 µl Homogenisationspuffer plus 1 mM DTT) und die optimierte, gewebeabhängige rT<sub>3</sub>-Konzentration ist Tabelle 2-11 zu entnehmen. Es wurde ein 10facher Ansatz des Proteinlysats angefertigt (z.B. 100 µg Leberprotein in 400 µl Homogenisationspuffer/DTT).

**Tabelle 2-11:** Dejodase-Assay - Proteinmenge,  $rT_3$ -Konzentration und Inkubationszeit

Gewebe	Proteinmenge	c( $rT_3$ ) in nM	Inkubationszeit
Leber	10 $\mu$ g	1000	60 min
Niere	15 $\mu$ g	1000	60 min
Kortex	100 $\mu$ g	1	120 min

*Aufreinigung des Tracers*

Zur Herstellung einer Chromatografie-Säule wurden 600  $\mu$ l Sephadex LH-20 in eine mit einem Filter (Porengröße: 10  $\mu$ M, MoBiTec, Göttingen) abgedichtete Sarpette gegeben und mit 3 ml 0,1 N HCl equilibriert. Nach Zugabe des Tracers (pro Reaktion 0,35 - 0,45  $\mu$ l  $^{125}$ I- $rT_3$ , spezifische Aktivität 750 - 1250  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) wurde zunächst mit 3 ml 0,1 N HCl und anschließend mit 3 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor mit 1 ml Ethanol:NH<sub>3</sub> (Verhältnis 49:1) eluiert wurde. Das Eluat wurde mittels Stickstoff im Wasserbad (80°C) eingedampft und anschließend in Substratmix (Tabelle 2-12) resuspendiert. Die Aktivität des Substratmix/Tracergemisches sollte zwischen 30.000 - 80.000 cpm pro 50  $\mu$ l liegen.

**Tabelle 2-12:** Zusammensetzung des Substratmixes

Bestandteil	Volumen
KPO <sub>4</sub> -Puffer (pH 6,8)	10 $\mu$ l
1 M DTT	2 $\mu$ l
40 mM NaOH	0,41 $\mu$ l
1 mM $rT_3$	Berechnung nach Tabelle 2-11
dH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

*Dejodase-Assay*

Die Bestimmung der 5'-Dejodaseaktivität erfolgte mit und ohne PTU in Triplikaten. 6x 40  $\mu$ l Proteinhomogenat bekannter Proteinkonzentration (Tabelle 2-11) wurden mit 3x 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O bzw. 3x 10  $\mu$ l PTU (10 mM) versetzt. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l Substratmix/Tracergemisch erfolgte die Inkubation des Ansatzes (Inkubationszeit: Tabelle 2-11) bei 37°C im Wasserbad. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ l BSA-Stopplösung auf Eis beendet und die Proteine mit 400  $\mu$ l eiskalter Trichloressigsäure (10 %) gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 xg, 5 min) wurden 480  $\mu$ l des Überstandes auf Dowex-50W-X2-Säulen überführt und freigesetztes  $^{125}$ I mit 10%iger Essigsäure eluiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im

Gammacounter. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurden Kontrollen mitgeführt, die lediglich 10 µl dH<sub>2</sub>O im Triplikat enthielten und denen erst nach Zugabe der BSA-Stopplösung 40 µl des Proteinhomogenats zugesetzt wurden. Nach Beendigung des Versuchs schloss sich eine weitere Proteinbestimmung nach Bradford an, um den genauen Proteingehalt des im Versuch eingesetzten Protein-homogenats zu ermitteln. Alle verwendeten Puffer sind Tabelle 2-13 zu entnehmen.

**Tabelle 2-13:** Pufferzusammensetzungen (4)

Puffer	Zusammensetzung
BSA-Stopplösung	10 % (w/v) BSA, 10 mM PTU-Stammlösung, ad 10 ml dH <sub>2</sub> O
Dowex-50W-X2	60 % (w/v) Dowex wurde in 10%iger (v/v) CH <sub>3</sub> COOH gelöst und in Sarpettenspitzen gefüllt, die mit Filtern abgedichtet wurden.
Elutionslösung	98 % (v/v) Ethanol, 2 % (v/v) NH <sub>4</sub> OH
KPO <sub>4</sub> -Puffer	1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 mM EDTA, pH 9,4 mit NaOH (Puffer A) 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM EDTA, pH 4,4 mit HCl (Puffer B) Puffer A vorlegen, dann durch Zugabe des Puffers B bis zum Erreichen von pH 6,8 titrieren.
PTU-Stammlösung	50 mM PTU in 40 mM NaOH suspendieren und durch Zugabe von 0,1 M NaOH lösen, pH ≤ 9,0. Verdünnungen der PTU-Stammlösung wurden in 40 mM NaOH angefertigt
rT <sub>3</sub> -Stammlösung	10 mM rT <sub>3</sub> in 40 mM NaOH. 1 mM Gebrauchslösung wurde in 40 mM NaOH hergestellt.
Sephadex LH-20	20 % (w/v) Sephadex LH-20 in 100 ml 0,1 N HCl

*Berechnung der Enzymaktivität in pmol x mg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>*

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{2 \times n (\text{rT}_3 \text{ in nmol}) \times [\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Hintergrund)}] \times 1000}{\text{cpm (100\%)} \times m (\text{Protein in mg}) \times t (\text{in min}) \times 480/550}$$

(Gleichung 2-1)

*cpm* - counts pro Minute

*cpm (100%)* - theoretisch mögliche 100%ige Dejodierung von <sup>125</sup>I-rT<sub>3</sub>

*cpm (Hintergrund)* - <sup>125</sup>I<sup>-</sup> Freisetzung durch nicht-enzymatische Dejodierung

*cpm (Probe)* - <sup>125</sup>I<sup>-</sup> Freisetzung durch Dejodierung

*m (Protein)* - Menge an Protein in mg

*n (rT<sub>3</sub>)* - Stoffmenge an unmarkiertem rT<sub>3</sub> in nmol

*t* - Reaktionszeit in min

*Quotient 480/550* - Menge des Überstands durch Gesamtvolumen

*Faktor 2* - durch 5'-Markierung des  $^{125}\text{I}$ -rT<sub>3</sub> und freie Drehbarkeit des phenolischen Rings um die Diphenyletherbindung kommt es statistisch gesehen zur Abspaltung eines radioaktiven und eines nicht radioaktiven Jodids

Die Gesamtaktivität der 5'-Dejodasen berechnete sich aus den Triplikaten, die mit dH<sub>2</sub>O versetzt wurden. PTU-Triplikate bezogen sich hingegen nur auf die Aktivität der Dejodase 2. Die Aktivität der Dejodase 1 berechnete sich demnach aus der Differenz von Gesamtaktivität und Dejodase-2-Aktivität.

### 2.2.5. Analyse von Serum- und Urinparametern

#### *Serum*

Zur Gewinnung von Serum aus Vollblut *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollen wurden nach Tötung der Versuchstiere der Thorax und die Aorta bzw. das Herz punktiert. Das aus dem Thorax gesammelte Blut wurde bis zur Gerinnung auf Eis gelagert und das Serum durch Zentrifugation (10 min, 10.000 xg, 4°C) vom Vollblut separiert. Die Lagerung des Serums erfolgte bei - 20°C.

TSH-, T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Werte *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollen wurden mittels Radioimmunassay (Streckfuss et al., 2005) in Kooperation mit dem Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles par les Isotopes, Hopitaux Universitaires de Strasbourg, Frankreich gemessen.

Aminosäureanalysen aus dem Serum *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollen wurden im Interdisziplinären Endokrinologischen Speziallabor der Charité-Universitätsmedizin, Berlin mittels routinemäßiger Hochdruckflüssigchromatografie bestimmt. Norleucin diente als interner Standard.

#### *Urin*

Der Urin *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollen wurde mithilfe metabolischer Käfige über einen Zeitraum von 24 h gesammelt.

Aminosäureanalysen aus dem Urin *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtyp-Kontrollen wurden im Interdisziplinären Endokrinologischen Speziallabor der Charité-Universitätsmedizin, Berlin mittels routinemäßiger Hochdruckflüssigchromatografie bestimmt. Norleucin diente als interner Standard.

## 2.2.6. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.6.1. *Real time* Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

#### *RNA-Isolation*

Die Isolation von RNA aus Geweben der Maus erfolgte mittels TRIzol<sup>®</sup> Reagenz gemäß den Angaben des Herstellers zur Isolierung von RNA, DNA und Proteinen. Nach Homogenisation einer Spatelspitze Gewebepulver in TRIzol<sup>®</sup> Reagenz erfolgte die Zugabe von Chloroform mit anschließender Zentrifugation, wodurch RNA, DNA und Proteine in unterschiedlichen Phasen aufgetrennt wurden. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde mit Glykogen und Isopropanol versetzt, um die RNA zu fällen. Nach Waschen des Pellets wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser (Tabelle 2-7) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (NanoDrop<sup>®</sup>) bei einer Wellenlänge von 260 nm nach Gleichung 2-2. 40 ng/µl ssRNA entsprachen hierbei einer Absorptionseinheit A260.

$$\text{RNA-Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{Absorption (260)} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

(Gleichung 2-2)

#### *cDNA-Synthese*

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte mit dem iScript cDNA Synthese Kit nach Angaben des Herstellers und dem in Tabelle 2-14 beschriebenen Syntheseansatz und Temperaturprogramm.

**Tabelle 2-14:** cDNA-Synthese - Ansatz und Temperaturprogramm

Ansatz	Temperatur
850 ng RNA	25°C - 5 min
4 µl 5x cDNA-Synthese Puffer	42°C - 30 min
1 µl Reverse Transkriptase	85°C - 5 min
ad 20 µl dH <sub>2</sub> O	

#### *RT-PCR*

Die *real time* PCR wurde als Doppelbestimmung nach folgendem Ansatz und Temperaturprogramm (Tabelle 2-15) durchgeführt. Die Primersequenzen sind Tabelle 2-16 zu entnehmen.

Tabelle 2-15: RT-PCR-Ansatz

PCR-Ansatz	PCR-Programm
5 µl DNA (1:5 verdünnte cDNA)	95°C - 15 min
0,25 µl 10 µM Primer fwd	95°C - 1 min
0,25 µl 10 µM Primer rev	95°C - 70 s
12,5 µl SYBR® Green Fluorescin Mix	62°C - 45 s 42 Zyklen
7 µl DEPC-H <sub>2</sub> O	72°C - 30 s
	72°C - 3 min

Tabelle 2-16: RT-PCR-Primer

Primer	Nukleotidsequenz (5' zu 3')	Primer	Nukleotidsequenz (5' zu 3')
<i>Slc16a10</i>	fwd GCCCCATCGTGAGTGTCTTC rev GACCAGTGACGGCTGGTAGG	<i>Dio2</i>	fwd CTCCAAGTGCCTCTTCCTGG rev GACGTGCACCACACTGGAAT
<i>Slc16a2</i>	fwd CCTCGCTATGGGCATGATCT rev TGTTGAAAGGCGAATGAGC	<i>Dio3</i>	fwd CTACATCGAGGAAGCCACC rev TGACGTAGAGGCGCTCAAAA
<i>Slc7a8</i>	fwd GCCACCCGGGTTCAAGATA rev ATAGGCAAAGGAGCCCTGGA	<i>Hr</i>	fwd GCTAGCAGGGTGCAGAACCT rev CAGGTGTCCACGGTGTGAGT
<i>Slc7a5</i>	fwd GGCCATCATCATCTCCTTGC rev ACCCATTGACAGAGCCGAAG	<i>mRC3</i>	fwd AGAGAGGCTGGTTCTGCAAG rev AATATCGTCGTCTGGCTTGG
<i>Slc43a1</i>	fwd CGCTGTGGTGGAGAACCCTCT rev AGGAAGGAGCCAATGGTGAA	<i>mTSHβ</i>	fwd CCTTGACAGAGCTCCCCTTG rev ATTGCATAGGCCCTGGAATG
<i>Slco1c1</i>	fwd AGTGTGGCCGGACTGACTGT rev ACTCCGGCTGGAGGATTGAC	<i>m18S rRNA</i>	fwd TTGACGGAAGGGCACCACCAG rev GCACCACCACCCACGGAATCG

### 2.2.6.2. Einführung von Mutationen in die Sequenz von MCT8

Die kodierende Sequenz des humanen MCT8 wurde wie bereits beschrieben mithilfe der Enzyme HindIII (N-Terminus) und XbaI (C-Terminus) in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert (Kinne et al., 2009). Die Enzyme wurden von *New England Biolabs* (NEB), USA bezogen.

#### *Mutagenese durch PCR*

Zur Einführung der H192x- und N193I-Mutationen in die Sequenz des Wildtyp-MCT8 wurde eine BamHI-Schnittstelle in der Nähe der zu mutierenden Basen zur Hilfe genommen. Es wurden reverse Primer (Tabelle 2-17) designt, die in der Mitte ihrer Sequenz die Mutation und am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle aufwiesen. Die Klonierung der H192x- und N193I-Fragmente erfolgte nach dem unter Tabelle 2-18 beschriebenen PCR-Ansatz und PCR-Programm. Das erhaltene PCR-Fragment



wurde gelelektrophoretisch (100 V, 2 h) in einem 1,5%igen, mit Ethidiumbromid-versetztem TAE-Gel aufgereinigt und mithilfe des Perfectprep® Gel Cleanup Kits gemäß den Angaben des Herstellers aus dem Gelmaterial eluiert. Das gereinigte PCR-Fragment erhielt nun A-Überhänge (*A-tailing*) und wurde in den pGEM-T Easy Vektor (pGEM®-T Easy Vector Systems) zwischenkloniert (Tabelle 2-19).

**Tabelle 2-17:** Mutagenese-Primer und Enzyme

Primer		Nukleotidsequenz (5' zu 3')
HA-MCT8	fwd	AAGCTTGACATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTATGGGGAGAGGAGGAG
H192A	rev	GGATCCCGACAGAGTTAGCGATGCCGAAGATG
H192F	rev	GGATCCCGACAGAGTTAAAGATGCCGAAGATG
H192Q	rev	GGATCCCGACAGAGTTCTGGATGCCGAAGATG
N193I	rev	GGATCCCGACAGAGATATGGATGCCGAAGATG
H415A	fwd	GGCTACTTTGTTCCCTATGTAGCCCTGATGAAGTATGTGGA
	rev	TCCACATACTTCATCAGGGCTACATAGGGAACAAAGTAGCC
H415F	fwd	TGGCTACTTTGTTCCCTATGTATTCTGATGAAGTATGTGGAG
	rev	CTCCACATACTTCATCAGGAATACATAGGGAACAAAGTAGCCA
H415Q	fwd	CTTTGTTCCCTATGTACAGCTGATGAAGTATGTGGAG
	rev	CTCCACATACTTCATCAGCTGTACATAGGGAACAAAG
R301A	fwd	GGGCCACTACTTTCAACGCGCCCTGGGTCTGGCC
	rev	GGCCAGACCCAGGGCGCGTTGAAAGTAGTGGCCC
R301K	fwd	GGGCCACTACTTTCAACGCAAAGTGGGTCTGGCC
	rev	GGCCAGACCCAGTTTGCGTTGAAAGTAGTGGCCC

### *Hitzeschock-Transformation kompetenter DH5α E.coli*

5 µl des Ligationsansatzes wurden in 50 µl kompetente *E.coli* Bakterien des Stammes DH5α transformiert. Dazu wurde das Gemisch aus Bakterien und Ligationsansatz für 20 min auf Eis inkubiert, dann für 45 s auf 42°C erhitzt, um anschließend weitere 3 min auf Eis abzukühlen. Es folgte die Zugabe von 500 µl LB-Medium und die Inkubation des Ansatzes bei 37°C und 600 rpm für 1 h. Der Ansatz wurde auf LB-Agar-Platten ausplattiert, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte das Animpfen von Über-Nacht-Kulturen mit Einzelklonen (3 ml LB-Medium plus 100 µg/ml Ampicillin, 37°C). Die Plasmid-DNA wurde mithilfe des FastPlasmid™ Mini-Kits nach Angaben des Herstellers aus den Über-Nacht-Kulturen isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch (NanoDrop®) bei 260 nm (Gleichung 2-3).

$$\text{DNA (ng/}\mu\text{l)} = \text{Absorption (260)} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

(Gleichung 2-3)

**Tabelle 2-18:** Mutagenese-PCR

PCR-Ansatz	PCR-Programm
50 ng MCT8-pcDNA3	96°C - 4 min
8 $\mu$ l 10x SupraTherm™ Puffer	
1 $\mu$ l 10 $\mu$ M HA-MCT8 fwd	96°C - 30 s
1 $\mu$ l 10 $\mu$ M Primer rev (Tab. 2-17)	58°C - 45 s 35 Zyklen
1,5 $\mu$ l 10 mM dNTP	72°C - 40 s
0,2 $\mu$ l SupraTherm™ Taq	72°C - 4 min
ad 80 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O	4°C - $\infty$

**Tabelle 2-19:** *A-tailing* und Ligation

<i>A-tailing</i>	Ligation
22 $\mu$ l PCR-Produkt aus Gelelution	50 ng pGEM-T Easy Vektor
3 $\mu$ l 10x SupraTherm™ Puffer	15 ng <i>A-tailing</i> Insert (300 bp)
3 $\mu$ l dATPs (NEB)	5 $\mu$ l 2x T4-Ligase Puffer
0,5 $\mu$ l SupraTherm™ Taq	1 $\mu$ l T4-Ligase
1,5 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O → 30 min, 72°C	→ über Nacht, 4°C

### Sequenzierung

Zur Überprüfung der erfolgten Mutagenese wurde eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin.

**Tabelle 2-20:** Sequenzierungs-PCR

PCR-Ansatz	PCR-Programm
250 - 300 ng DNA	95°C - 1 min
1 $\mu$ l Sequenzierungspuffer	95°C - 30 s
1 $\mu$ l T7 bzw. Sp6 Primer (5 $\mu$ M)	55°C - 15 s 30 Zyklen
1,5 $\mu$ l BigDye® Terminator v3.1	60°C - 4 min
ad 10 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O	4°C - $\infty$

Zur Vervielfältigung positiv getesteter H192x- bzw. N193I-pGEM-T-Easy Plasmid-DNA wurde eine 50 ml Über-Nacht-Kultur in LB-Medium plus Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) angeimpft und die Plasmid-DNA mithilfe des PureYield™ Plasmid Midiprep System

gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Auch hier erfolgte die Konzentrationsbestimmung der DNA photometrisch bei 260 nm (Gleichung 2-3).

#### *Präparativer Verdau und Ligation*

Sowohl Wildtyp-MCT8 in pcDNA3 (Insert plus Vektor: 7 kb) als auch H192x bzw. N193I in pGEM-T Easy (Insert plus Vektor: 3,6 kb) wurden präparativ mit den Enzymen HindIII und BamHI für 1 h bei 37°C verdaut (Tabelle 2-21).

**Tabelle 2-21:** Präparativer Verdau und Ligation

Präparativer Verdau		Ligation
1,5 µg MCT8-pcDNA3	1,5 µg Mutante-pGEM-T Easy	100 ng Vektor (6,4 kb MCT8)
5 µl Puffer2 (NEB)	5 µl Puffer2 (NEB)	14 ng Insert (600 bp-Fragment)
5 µl 10x BSA (NEB)	5 µl 10x BSA (NEB)	2 µl 2x T4-Ligase-Puffer (NEB)
1,25 µl HindIII (20.000 U/ml)	1,25 µl HindIII (20.000 U/ml)	1 µl T4-Ligase (NEB)
2,5 µl BamHI (10.000 U/ml)	2,5 µl BamHI (10.000 U/ml)	
ad 50 µl dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl dH <sub>2</sub> O	

Die Fragmente wurden in einem 1,5%igen, mit Ethidiumbromid-versetztem TAE-Gel bei 100 V für 2 h aufgetrennt. Das 6,4 kb große Fragment des MCT8-Verdau und das 600 bp Fragment des pGEM-T-Easy-Verdau wurden aus dem Gel mittels Perfectprep® Gel Cleanup Kits nach Angaben des Herstellers isoliert und wie Tabelle 2-21 zu entnehmen miteinander ligiert. Die Ligation des H192x- bzw. N193I-Fragments in den verkürzten MCT8-pcDNA3-Vektor erfolgte über Nacht bei 4°C. Es folgten die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente DH5α *E.coli* Bakterien, Plasmid-Mini-Präparation und Sequenzierung der Plasmid-DNA (s.o.) zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese sowie eine Plasmid-Midi-Präparation zur Vervielfältigung positiver Plasmid-DNA. Die in diesem Abschnitt verwendeten Pufferzusammensetzungen sind Tabelle 2-22 zu entnehmen.

#### *Zielgerichtete Mutagenese*

Die Einführung der H415x-Mutationen in die kodierende Sequenz des humanen MCT8 erfolgte mithilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit und der in Tabelle 2-17 aufgeführten Primer nach Angaben des Herstellers. PCR-Ansatz und PCR-Programm sind in Tabelle 2-23 beschrieben. Die Berechnung der Primerstoffmenge (in pmol) ist Gleichung 2-4 zu entnehmen. Zum Verdau der

Template-DNA (Wildtyp-MCT8) wurde der Ansatz mit 1 µl DpnI (1 h, 37°C) versetzt. Transformation und Sequenzierung erfolgten wie oben beschrieben.

$$\text{pmol} = \frac{125\text{ng} \times 1000}{330 \times \text{Anzahl der Basen}}$$

(Gleichung 2-4)

**Tabelle 2-22:** Pufferzusammensetzungen (5)

Puffer	Zusammensetzung
Ampicillin (100 mg/ml)	1 g (w/v) Ampicillin in 10 ml dH <sub>2</sub> O
LB-Agar	35 g in 1 l dH <sub>2</sub> O
LB-Medium	20 g in 1 l dH <sub>2</sub> O
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA in dH <sub>2</sub> O, pH 8,3
1x TAE- Puffer	Verdünnung 50x TAE-Puffer in dH <sub>2</sub> O
1x TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O, pH 8 mit HCl einstellen

**Tabelle 2-23:** PCR-Ansatz und PCR-Programm der zielgerichtete Mutagenese

PCR-Ansatz	PCR-Programm
50 ng DNA	<hr/> 95°C - 30 s <hr/> 95°C - 30 s 55°C - 60 s 18 Zyklen <hr/> 68°C - 8 min <hr/> 4°C - ∞
1 µl 10x Puffer	
125 ng Primer fwd (Tabelle 2-17)	
125 ng Primer rev (Tabelle 2-17)	
1 µl dNTPs	
ad 50 µl dH <sub>2</sub> O	
1 µl Pfu UltraHF DNA Polymerase	

### 2.2.6.3. cRNA Synthese

Die cRNA-Synthese zur Injektion in *Xenopus* Oozyten erfolgte mittels *mMessage mMachin<sup>®</sup> T7 Kit* gemäß den Angaben des Herstellers. Zur Linearisierung der Template-DNA wurden 5 µg DNA mit Smal (NEB) verdaut (Tabelle 2-24).

Zur Aufreinigung und Fällung der linearisierten DNA wurde der Ansatz mit 1/20 Volumen 0,5 M EDTA (pH 8), 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen 100 % Ethanol versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei - 20°C wurde der Ansatz für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das

Pellet getrocknet und in 1x TE-Puffer (Tabelle 2-22) gelöst. Die darauffolgende cRNA-Synthese erfolgte wie in Tabelle 2-24 beschrieben. Aufreinigung und Fällung der cRNA erfolgte mittels Lithiumchlorid-Methode (Bestandteil des *mMessage mMachine<sup>®</sup> T7 Kits*). 20 µl cRNA wurden mit je 30 µl Nuklease-freiem Wasser und Lithiumchlorid versetzt. Nach Inkubation für 1 h bei -20°C wurde die cRNA für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 %igen Ethanol (in DEPC-H<sub>2</sub>O) gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert und anschließend an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 25 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt (Gleichung 2-2).

**Tabelle 2-24:** Präparativer Verdau

Verdau	cRNA-Synthese
5 µg DNA	3 - 4 µg DNA (linearisiert)
5 µl Puffer 4 (NEB)	10 µl 2x NTPs/CAP
3 µl Smal (20.000 U/ml)	2 µl 10x Puffer
ad 50 µl dH <sub>2</sub> O	2 µl EnzymMix
→ 4 h, 25°C	ad 20 µl H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei)
→ 20 min, 65°C (Hitzeinaktivierung)	→ 2 h, 37°C

### 2.2.7. Zellkultur

Die Kultur der verschiedenen Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Zur Vermeidung etwaiger Kontaminationen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet (Safe 2010 Laminair). Medienzusammensetzungen, die in der Zellkultur verwendet wurden, sind in Tabelle 2-25 zusammengefasst.

#### 2.2.7.1. Primäre Astrozyten

Zur Präparation primärer Astrozyten wurden 1 - 3 d alte Jungtiere aus der Nachzucht *Slc7a8*-defizienter Mäuse dekapitiert und das Großhirn freipräpariert. Zur Genotypisierung der Nachkommen wurden Schwanzbiopsien genutzt und wie in Abschnitt 2.2.1. beschrieben aufgearbeitet. In eiskaltem HBSS-Puffer (*HANKS' Salt Solution* ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) erfolgten die Zerteilung des Großhirns und die Entfernung der Meningen. Gehirnhälften gleicher Genotypen wurden in 2 ml HBSS-Puffer vereint

und durch Zugabe von 1 ml 10x Trypsin/EDTA (0,5 % Trypsin in 1x PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) für 10 min bei 37°C verdaut. Nach Zugabe von 5 ml Astrozytenmedium (Tabelle 2-25) wurden die Hirne mit einer serologischen Pipette trituriert. Grobe Gewebeteile wurden abzentrifugiert (300 rpm, 1 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 5 min) mit anschließender Resuspension des Pellets in 5 ml Astrozytenmedium und Filtration durch ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm). Die Einzelzellsuspension der primären Astrozyten wurde auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen (2 Hirne pro 75 cm<sup>2</sup> in 15 ml Astrozytenmedium) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte der Austausch des Mediums, in dem die Astrozyten die nächsten drei Wochen (ohne weiteren Mediumwechsel) wuchsen. In dieser Zeit starben Neurone und Mikroglia kugelten sich ab. Nach zwei Wochen wurden die Astrozyten zweimal im Abstand von drei Tagen für 2 h bei 37°C geschüttelt, um Mikroglia aus der Kultur zu entfernen. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Mikroglia abzentrifugiert (1000 xg, 10 min) und das Medium der Astrozytenkultur wiedergegeben.

Tabelle 2-25: Zellkulturmedien

Art des Mediums	Zusammensetzung
Astrozytenmedium	DMEM [mit L-Glutamin, 4500 mg/l D-Glukose, 110 mg/l Natriumpyruvat] + 1 % Penicillin (10 U/µl)/Streptomycin (10 µg/µl) + 10 % FCS + 0,1 % 50 mM β-Mercaptoethanol
Konservierungsmedium	DMEM/F-12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 1 % Penicillin (10 U/µl)/Streptomycin (10 µg/µl) + 10 % FCS + 10 % DMSO
Kulturmedium für stabile MCT8-Mutanten (in MDCK-1)	DMEM/F12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 1 % Penicillin(10 U/µl)/Streptomycin(10 µg/µl) + 10 % FCS
MDCK-1-Medium	DMEM/F12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 10 % FCS
Selektionsmedium	DMEM/F12 (Ham) [mit L-Glutamin, 15 mM Hepes] + 10 % FCS + 0,5 % G418

### *Aussaat von Astrozyten*

Astrozyten einer T75-Flasche wurden zweimal mit 1x PBS (Tabelle 2-9) gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml 1x Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin in 1x PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) und Inkubation der Zellen für 5 min bei 37°C wurden die Zellen mit 8 ml Astrozytenmedium versetzt, resuspendiert und gezählt.

Für radioaktive T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Aufnahmeexperimente wurden 200.000 Zellen pro *well* einer 12*well*-Platte ausgesät und bis zur Konfluenz in Astrozytenmedium kultiviert.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden 5.000 Zellen auf mit Ethanol abgeflamnten und Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen (Durchmesser: 12 mm) in einer 24*well*-Platte ausgesät. 3 Tage später wurden die Zellen mithilfe von 4 % PFA (Tabelle 2-8) fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung in 1x PBS bei 4°C gelagert.

#### 2.2.7.2. MDCK-1

MDCK-1 Zellen (*Madin-Darby canine kidney*) verfügen über eine geringe T<sub>3</sub>-Aufnahmeaktivität und weisen keine endogene Mct8-Expression auf. Daher dienten diese Zellen als Modell, um die verschiedenen humanen MCT8-Mutanten stabil zu exprimieren. MDCK-1 Zellen wurden in T25-Flaschen kultiviert (Tabelle 2-25) und bei einer Konfluenz von 90 % im Verhältnis 1:10 alle sieben Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS (Tabelle 2-9) gewaschen, mit 1 ml 1x Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin in 1x PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) versetzt und bei 37°C für 5 min inkubiert. Durch Zugabe von MDCK-1-Medium wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellen wurden danach vereinzelt und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

##### *Stabile Transfektion der MCT8-Mutanten in MDCK-1 Zellen*

MDCK-1 Zellen einer T25-Flasche wurden wie oben beschrieben trypsiniert und 100.000 Zellen in einer 6 cm Schale in MDCK-1-Medium ausgesät. Die Zellen wuchsen bis zu einer Konfluenz von 50-60 % bevor die stabile Transfektion durchgeführt wurde. Dazu wurden 3 µg DNA mit serumfreiem Medium (DMEM/F12) auf 150 µl aufgefüllt, mit 30 µl Polyfectamin versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde mit 1 ml MDCK-1-Medium versetzt und tropfenweise zu den Zellen gegeben, die zuvor 3 ml frisches MDCK-1-Medium erhielten. Nach 48 Stunden erfolgte der Wechsel zum Selektionsmedium (Tabelle 2-25).

Dreimal in der Woche wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Selektionsmedium versetzt bis nur noch einzelne, runde Zellkolonien auf der Oberfläche der 6 cm Schale sichtbar waren. Die Zellklone wurden in einer 24*well*-Platte vereinzelt, indem zuerst das Medium abgesaugt und die Zellklone dann mit einer gelben Pipettenspitze von der Oberfläche der 6 cm Schale abgekratzt und

aufgesaugt wurden. Bei einer Konfluenz von circa 60 % der vereinzelt Zellklone wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 250 µl 1x Trypsin/EDTA bei 37°C für 10 min trypsinisiert. Es folgte die Zugabe von 500 µl Selektionsmedium, das Vereinzeln der Zellen durch Auf- und Abpipettieren und die Aufteilung der Zellsuspension zu gleichen Teilen auf eine 6 cm Schale zur Gewinnung von Gesamtprotein für den Test auf Expression und einer T25-Flasche zur weiteren Kultivierung der MCT8-Mutanten.

#### *Zellernte und Test auf Expression*

Bei 90 %iger Konfluenz wurden die Zellen einer 6 cm Schale geerntet. Die Zellen wurden zunächst mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend in 500 µl kaltem 1x PBS mit einer blauen, umgedrehten Pipettenspitze von der Oberfläche abgekratzt, um dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt zu werden. Die 6 cm Schale wurde ein weiteres Mal mit 500 µl 1x PBS gespült, welches ebenfalls in dasselbe Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgte die Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 1000 xg und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 80 µl Homogenisationspuffer (ohne DTT; Tabelle 2-9) versetzt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Proteinmenge des erhaltenen Gesamtproteins wurde mithilfe der Bradford-Methode bestimmt, der Test auf Expression erfolgte mittels Western Blot (siehe 2.2.4.1.). Als Positivkontrolle diente MCT8-pcDNA3 in MDCK-1, als Negativkontrolle diente pcDNA3-Leervektor in MDCK-1.

#### *Konservierung stabiler Zellklone*

Stabil-exprimierende Zellklone wurden in flüssigem Stickstoff konserviert. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert, die Zellsuspension für 5 min bei 1000 xg zentrifugiert und das Zellpellet mit Konservierungsmedium (Tabelle 2-25) versetzt (2 ml für Zellen einer T25-Flasche, 8 ml für Zellen einer T75-Flasche). Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie im Stickstofftank (ARPEGE 140, Air Liquide) eingelagert wurden.

Das Auftauen der Zellen zur Rekultivierung erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Durch Zentrifugation der Zellsuspension in 5 ml Kulturmedium (Tabelle 2-25) für 5 min bei 1000 xg erfolgte die Entfernung des DMSO. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in eine mit 15 ml Kulturmedium befüllte T75-Flasche überführt.



### *Oberflächenbiotinylierung*

Die Oberflächenbiotinylierung diente dem Nachweis der Expression der MCT8-Mutanten an der Zelloberfläche. MCT8-pcDNA3 in MDCK-1 wurde als Positivkontrolle bzw. pcDNA3-Leervektor in MDCK-1 als Negativkontrolle genutzt. Zellen wurden in T75-Flaschen ausgesät und in Kulturmedium bis zu einer Konfluenz von 90-95 % kultiviert. Die Oberflächenbiotinylierung erfolgte nach dem *Cell Surface Protein Isolation Kit* gemäß den Angaben des Herstellers.

Intakte Zellen wurden mit einem biotinylierten Reagenz (bindet an Lysinreste von Proteinen) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von Stopplösung wurden die Zellen abgekratzt, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels Zentrifugation (1500 xg, 5 min, 4°C) mit eiskaltem 1x TBS (Tabelle 2-9) zweimal gewaschen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und die biotinylierten Oberflächenproteine über eine NeutrAvidin-Säule aus dem Lysat aufgereinigt. Durch Inkubation des Säulenmaterials mit Elutionspuffer wurden die Oberflächenproteine von der Säule gelöst. Jeweils 15 µl der Elutionsfraktion wurden für Western Blot-Analysen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.4.1.).

### *Aussaat stabil exprimierender MDCK-1 Zellen*

Für radioaktive T<sub>3</sub>-Aufnahmeexperimente wurden stabil exprimierende MDCK-1 Zellen in Triplikaten in 12well Platten ausgesät und für drei Tage bis zur 100%igen Konfluenz in Kulturmedium gehalten. Zellzahlen sind Tabelle 2-26 zu entnehmen.

**Tabelle 2-26:** Zellzahlen

Zellklon	Zellzahl	Zellklon	Zellzahl
MCT8 (+)	35.000	N193I	100.000
pcDNA3 (-)	120.000	H415A	120.000
H192A	25.000	H415F	50.000
H192F	25.000	H415Q	100.000
H192Q	140.000	R301K	120.000

### *2.2.7.3. Xenopus Oozyten*

Die Injektion von cRNA in *Xenopus* Oozyten übernahm die Firma Ecocyte Bioscience (Dr. Lohmann Diaclean GmbH, Am Förderturm 9, D-44575 Castrop-Rauxel,

Germany). Nach Injektion wurden die Oozyten drei Tage in Barth's Puffer (Tabelle 2-27) inkubiert, bevor sie für Experimente zur Verfügung standen.

### *Test auf Expression*

Vier Oozyten eines jeweiligen MCT8-Konstrukts bzw. vier nicht-injizierte Oozyten wurden in 50 µl Homogenisationspuffer mit 1 mM DTT (Tabelle 2-9) mithilfe von Ultraschall aufgeschlossen. 10 µl des Homogenats wurden für Western Blot-Analysen (siehe Abschnitt 2.2.4.1.) eingesetzt.

## 2.2.8. Transportstudien mithilfe radioaktiv-markierter Substrate

Tabelle 2-27 sind die Zusammensetzungen der in diesem Kapitel verwendeten Puffer zu entnehmen.

**Tabelle 2-27:** Pufferzusammensetzungen (6)

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Aufnahmepuffer	125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl <sub>2</sub> , 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> , 25 mM Hepes, 5,6 mM Glukose in dH <sub>2</sub> O, pH 7,4
Barth's Puffer	88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0,82 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 0,66 mM NaCO <sub>3</sub> , 0,75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 50 mM Hepes in dH <sub>2</sub> O, pH 7,4 + 10 mg/l Gentamycin
NaOH	40 mM NaOH in dH <sub>2</sub> O bzw. 100 mM NaOH in dH <sub>2</sub> O

### 2.2.8.1. Berechnung der einzusetzenden Tracermenge

Die Molarität des Tracers berechnete sich aus der Konzentration [mCi/ml] geteilt durch die spezifische Aktivität [mCi/mmol]. Tabelle 2-28 sind die einzusetzenden Tracerkonzentrationen pro Reaktionsansatz und die Konzentration an unmarkiertem Substrat zu entnehmen. Die Aufreinigung des Tracers ist in Abschnitt 2.2.4.2. aufgeführt. Die Lösung des Tracers erfolgte beim Arbeiten mit radioaktiv-markierten Schilddrüsenhormonen in den jeweiligen serumfreien Medien der einzelnen Zelllinien (MDCK-1 - DMEM/F12, Astrozyten - DMEM), beim Arbeiten mit radioaktiv-markierten Aminosäuren erfolgte die Lösung in Aufnahmepuffer. Experimente in Oozyten wurden in Barth's Puffer durchgeführt.

**Tabelle 2-28:** Tracerkonzentration zur Messung eines Zeitverlaufs

<sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	<sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	<sup>14</sup> C-Leu	<sup>14</sup> C-Trp
10 nM	1 nM + 10 nM kaltes T <sub>4</sub>	200 nM + 1 µM kaltes Leucin	1 µM + 2 mM kaltes Tryptophan

### 2.2.8.2. Messung eines Zeitverlaufs

Die Messung eines Zeitverlaufs erfolgte bei konstanter Tracerkonzentration und variierender Zeit. Die gemessenen Zeitpunkte lagen zwischen 1 - 30 min.

*Zellen:* Zur Durchführung des Experiments wurden die jeweiligen MCT8-Mutanten plus Negativ- (pcDNA3-Leervektor in MDCK-1) und Positivkontrolle (MCT8-pcDNA3 in MDCK-1) als Triplikate in 12 *well* Platten ausgesät (siehe 2.2.7.2.) und bis zur 100 %igen Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden anschließend mit 400 µl (pro *well*) des gelösten Tracers bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen auf Eis gehalten, das Tracer/Lösungsmittel-Gemisch abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS (Tabelle 2-9) gewaschen. Zur Zellyse wurden die Zellen mit 1 ml 40 mM NaOH versetzt, geschüttelt und in ein Zählröhrchen überführt. Die Bestimmung der Aktivität des von den Zellen aufgenommenen radioaktiv-markiertem <sup>125</sup>I-Substrat erfolgte mithilfe eines Gammacounter. Zur Messung des radioaktiven Kohlenstoffs in einem Betacounter, musste das Lysat zunächst eingedampft werden, bevor es mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Perkin Elmer) versetzt, geschüttelt und über Nacht inkubiert wurde.

*Oozyten:* Vier Oozyten einer jeweiligen Mutante wurden in ein Reagenzglas überführt, mit 1 ml Tracer/Barth's-Puffer-Gemisch versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Oozyten auf Eis in ein 100 µm Zellsieb überführt und mit eiskaltem 1x PBS zweimal gewaschen. Die Oozyten wurden auf vier Zählröhrchen aufgeteilt und jeweils in 1 ml 40 mM NaOH lysiert. Die Messung der Aktivität erfolgte wie oben beschrieben.

*Grafische Darstellung:* Die grafische Darstellung erfolgte in einem X-Y-Diagramm mit der Inkubationszeit auf der X-Achse und den cpm-Werten auf der Y-Achse. Die Werte des Leervektors wurden als Hintergrund abgezogen.

### 2.2.8.3. Bestimmung des $K_m$ -Wertes

Die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes erfolgte mittels variierender Tracerkonzentration bei einer konstanten Inkubationszeit. Die Inkubationszeit wurde anhand des Zeitverlaufs bestimmt und lag im linearen Bereich der Messung, meist zwischen 2 - 5 min. Die Tracerkonzentration variierte zwischen 0,5 - 15  $\mu\text{M}$  und setzte sich wie folgt zusammen: es wurden 42  $\mu\text{l}$  Tracer aufgereinigt und in 277,5  $\mu\text{l}$  Lösungsmittel gelöst. Nach Zugabe von 277,5  $\mu\text{l}$  2 mM nicht markierter Substanz ergab sich eine Endkonzentration von 1 mM, welche genutzt wurde, um die verschiedenen Tracerkonzentrationen in jeweils 10 ml Lösungsmittel anzusetzen. Die Inkubation und Lyse der Zellen, sowie die Messung der zellassoziierten Radioaktivität erfolgte wie unter 2.2.8.2. beschrieben.

Die grafische Darstellung der Kinetik erfolgte in einem X-Y-Diagramm mit der Substratkonzentration auf der X-Achse und den cpm-Werten auf der Y-Achse, wobei die cpm-Werte mit der Geschwindigkeit der Reaktion gleichzusetzen waren. Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wurden die Daten der erhaltenen Michaelis-Menten-Kinetik in einen Eadie-Hofstee-Plot mit folgenden Achsenbezeichnungen transformiert: Geschwindigkeit auf der Y-Achse und Geschwindigkeit geteilt durch Substratkonzentration auf der X-Achse. Die Steigung der erhaltenen Geraden bestimmte den  $K_m$ -Wert des Transporters für ein bestimmtes Substrat. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse beschrieb die maximale Geschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  einer Reaktion.

### 2.2.8.4. Efflux radioaktiv-markierter Jodthyronine

Die Aussaat von MDCK-1 Zellen, die mit MCT8-pcDNA3 und pcDNA3-Leervektor stabil transfiziert waren, erfolgte als Triplikat in 12 *well* Platten wie unter 2.2.6.2. beschrieben. Die Zellen wurden mit 10 nM  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> (Tabelle 2-28) für 30 min bei 37°C vorinkubiert und danach zweimal mit eiskaltem 1x PBS (Tabelle 2-9) gewaschen. Es folgte die Zugabe von serumfreiem Medium ohne Tracer und eine Inkubation zwischen 1 - 20 min bei 37°C. Von der Zelle ins Medium transportiertes radioaktiv-markiertes  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> wurde wie unter 2.2.8.2. beschrieben in einem Gammacounter vermessen. Die grafische Darstellung erfolgte als X-Y-Diagramm mit der Zeit auf der X-Achse und den cpm-Werten auf der Y-Achse.

### 2.2.8.5. Einsatz von Inhibitoren

Probenecid wurde in 0,1 M NaOH gelöst und auf pH 7,4 eingestellt. 2-Aminobicyclo-(2.2.1)-Heptan-2-Carbonsäure (BCH) und Bromsulphthalein (BSP) wurden direkt im Tracer/Lösungsmittel-Gemisch gelöst. Alle drei Inhibitoren wurden auf eine Endkonzentration von 1 mM eingestellt.

Tyrosinkinase Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Für Aufnahmeexperimente wurden folgende Endkonzentrationen verwendet: 7  $\mu$ M Sunitinib, 21  $\mu$ M Imatinib, 19  $\mu$ M Dasatinib, 13  $\mu$ M Bosutinib. Für Efflux-Experimente wurden jeweils 100  $\mu$ M Sunitinib und Bosutinib eingesetzt.

Die Zellen wurden jeweils gleichzeitig mit Tracer und Inhibitor für 3 min inkubiert. Die grafische Darstellung erfolgte als Säulendiagramm jeweils im Vergleich zu einer nicht inhibierten Probe.

### 2.2.9. Immunhistochemische Analyse

Die Zusammensetzung der in diesem Kapitel verwendeten Puffer ist Tabelle 2-29 zu entnehmen.

**Tabelle 2-29:** Pufferzusammensetzungen (7)

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Acetatpuffer	60 ml Natriumacetatlösung (2,7 %), 240 ml Essigsäure (1,2 %), pH 3,8
Citratpuffer	0,1 M Zitronensäure, 0,1 M Natriumcitrat in dH <sub>2</sub> O, pH 6,0
Einfriermedium	30 % (w/v) Glycerol, 30 % (v/v) Ethylenglykol in 1x PBS
Essigsäure (1,2 %)	12 ml Essigsäure in 1 l dH <sub>2</sub> O
Färbelösung (0,5 %)	1,5 g Kresylviolett-Acetat in 300 ml Acetatpuffer
Hämalaunlösung	1:5 Verdünnung von Mayers Hämalaun in dH <sub>2</sub> O
Natriumacetatlösung (2,7 %)	27 g Natriumacetat in 1 l dH <sub>2</sub> O
PBS/Glycin	0,1 M Glycin in 1x PBS
PBS/HS	10 % Pferdeserum in 1x PBS
PBS/NaCl	0,25 M NaCl in 1x PBS
PBST	0,5 % (w/v) Tween20 in 1x PBS

### 2.2.9.1. Anfertigung von Gewebeschnitten

#### *Paraffinschnitte*

Die Herstellung von Paraffinschnitten aus in Paraffin eingebetteten Organen erfolgte am Microtom bei Raumtemperatur. Die Paraffinblöcke wurden zuvor eine halbe Stunde auf Eis gelagert. Es wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und in ein Wasserbad überführt, um die Schnitte auf Objektträger aufziehen zu können. Das Streckbad (42°C) diente dazu, dass sich die Schnitte auf dem Objektträger entfalteten.

#### *Gefrierschnitte*

Die Herstellung von Gefrierschnitten erfolgte am Kryostaten bei einer Kammertemperatur von -22°C und einer Objekttemperatur von -21°C. Alle benötigten Geräte sowie das zu schneidende Organ wurden zuvor in die Kryostatenkammer überführt und dort für mehrere Stunden aufbewahrt. Die Geräte wurden somit auf ca. -20°C vorgekühlt und die Temperatur des Organs konnte langsam von -80°C auf -20°C steigen. Die Organe wurden mittels *Tissue Freezing Medium*<sup>®</sup> (Jung) auf einem vorgekühlten Objektisch eingebettet und in die entsprechende Vorrichtung eingespannt. Nach der Justierung konnten dann 30 µm dicke Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte wurden entweder bis zur weiteren Verarbeitung in 1x PBS gelagert oder in Einfriermedium bei -20°C eingefroren. Als Färbe- und Aufbewahrungsgefäß eigneten sich hierfür *24well*-Platten.

### 2.2.9.2. Immunhistochemische Färbungen

#### *Peroxidase-Färbung von Paraffinschnitten*

Die immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten nach der Biotin-Streptavidin-Peroxidase Methode erfolgte mithilfe des Dako Cytomation Systems gemäß den Angaben des Herstellers.

Zunächst erfolgte die Entfernung des Paraffins mittels Xylol und die Bewässerung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe: 2x 5 min Xylol, 2x 2 min 100 % Ethanol, 2x 2 min 96 % Ethanol, 1x 2 min 70 % Ethanol, 1x 2 min 40 % Ethanol, 2x 5 min dH<sub>2</sub>O. Danach folgte die hitzeinduzierte Antigendemaskierung zum Entfernen von

Aldehydvernetzungen, die die Epitop-Antikörper-Erkennung behindern würden, durch Kochen der Schnitte in vorgewärmten Citratpuffer für 2x 5 min.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Paraffinschnitte für 10 min in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, danach 2x 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mithilfe des Blockierungsserums für 30 min bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer gelagert und mit Folie abgedeckt, um ein Austrocknen der einzelnen Schnitte zu vermeiden. Die Verdünnung des primären Antikörpers (Tabelle 2-5) erfolgte im Blockierungsserum. Die Inkubation verlief über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. Die Schnitte wurden anschließend dreimal für 5 min mit PBST gewaschen und mit dem biotinylierten sekundären Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein weiterer Waschschrift (wie oben) folgte, bevor die Paraffinschnitte mit dem Streptavidin-HRP-Komplex für 30 - 60 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen (wie oben) wurde das Signal mithilfe von DAB-Chromogen sichtbar gemacht. Das DAB-Chromogen wurde kurz vor Gebrauch 1:50 in DAB-Puffer verdünnt und die Schnitte mit dem verdünnten DAB-Chromogen bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop verfolgt und durch Überführen der Schnitte in 1x PBS gestoppt. Die Gewebeschnitte wurden dann für 2x 5 min in 1x PBS gewaschen.

#### *Gegenfärbung von Paraffinschnitten mit Hämalan*

Die Färbung erfolgte nach der Peroxidase-Färbung durch Inkubation der Gewebeschnitte in Hämalanlösung für 2 min bei Raumtemperatur. Es folgte das Bläuen der Schnitte für 5 min unter fließendem lauwarmem Leitungswasser mit anschließendem Waschen für 2x 5 min in dH<sub>2</sub>O.

Nach dem Entwässern der gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (umgekehrte Reihenfolge wie oben beschrieben) wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

#### *Nissl-Färbung von Gefrierschnitten*

Gefrierschnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet und vor der eigentlichen Nissl-Färbung kurz in dH<sub>2</sub>O getaucht.

Die Färbung erfolgte durch Inkubation der Gewebeschnitte in Färbelösung. Gestoppt wurde die Färbung durch fünfmaliges Spülen der Gewebeschnitte in Acetatpuffer.

Die Schnitte wurden dann über die aufsteigende Alkoholreihe (siehe oben) entwässert und mit Entellan eingedeckt.

#### *Fluoreszenz-Doppelfärbung von Zellen und Gefrierschnitten*

Primäre Astrozyten wurden wie unter 2.2.7.1. beschrieben ausgesät und fixiert. Zuvor eingefrorene Gefrierschnitte wurden vor der weiteren Behandlung 3x 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Fluoreszenz-Doppelfärbung erfolgte mithilfe des M.O.M Kits gemäß den Angaben des Herstellers. Die fixierten Zellen bzw. Gefrierschnitte wurden zunächst für 15 min in PBST inkubiert, bevor sie 2x 5 min in PBS gewaschen und für eine Stunde in 3,75 % M.O.M. Reagenz in PBS/HS blockiert wurden. Es folgte ein weiterer fünfminütiger Blockierungsschritt mit 4,5 % M.O.M Proteinkonzentrat in PBS/HS mit anschließender Inkubation in den Primär-Antikörpern für 48 h bei 4°C (Tabelle 2-5). Die Primär-Antikörper wurden im zweiten Blockierungsreagenz verdünnt. Nach dem Waschen der Zellen bzw. Gefrierschnitte (3x 5 min in PBS/Glycin) folgte die Inkubation in 1,5 % Ziegen Serum in PBS/HS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Sekundär-Antikörper wurden in PBS/NaCl verdünnt und die Präparate mit dem Antikörper für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellen bzw. Gefrierschnitte wurden 3x 5 min mit PBS/Glycin gewaschen (dunkel) und dann für 1 min mit dem Zellkernmarker DAPI (1:30.000 in 1x PBS) versetzt. Nach einem weiteren Waschschrift in 1x PBS (3x 5 min) wurden die Gefrierschnitte auf Objektträger aufgezogen und sowohl Gefrierschnitte als auch Glasplättchen mit angefärbten Zellen mittels ImmuMount eingedeckt.

#### 2.2.9.3. Aufnahme und Bearbeitung von immunhistochemischen Bildern

Die Aufnahme der immunhistochemischen Bilder erfolgte am Axioskop 2 mot plus mithilfe des Programms AxioVision Rel 4.6. Konfokale Bilder wurden in Kooperation mit dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité-Universitätsmedizin, Berlin aufgenommen. Die weitere Verarbeitung erfolgte mittels Adobe Photoshop und Adobe Illustrator.



## 3. Ergebnisse

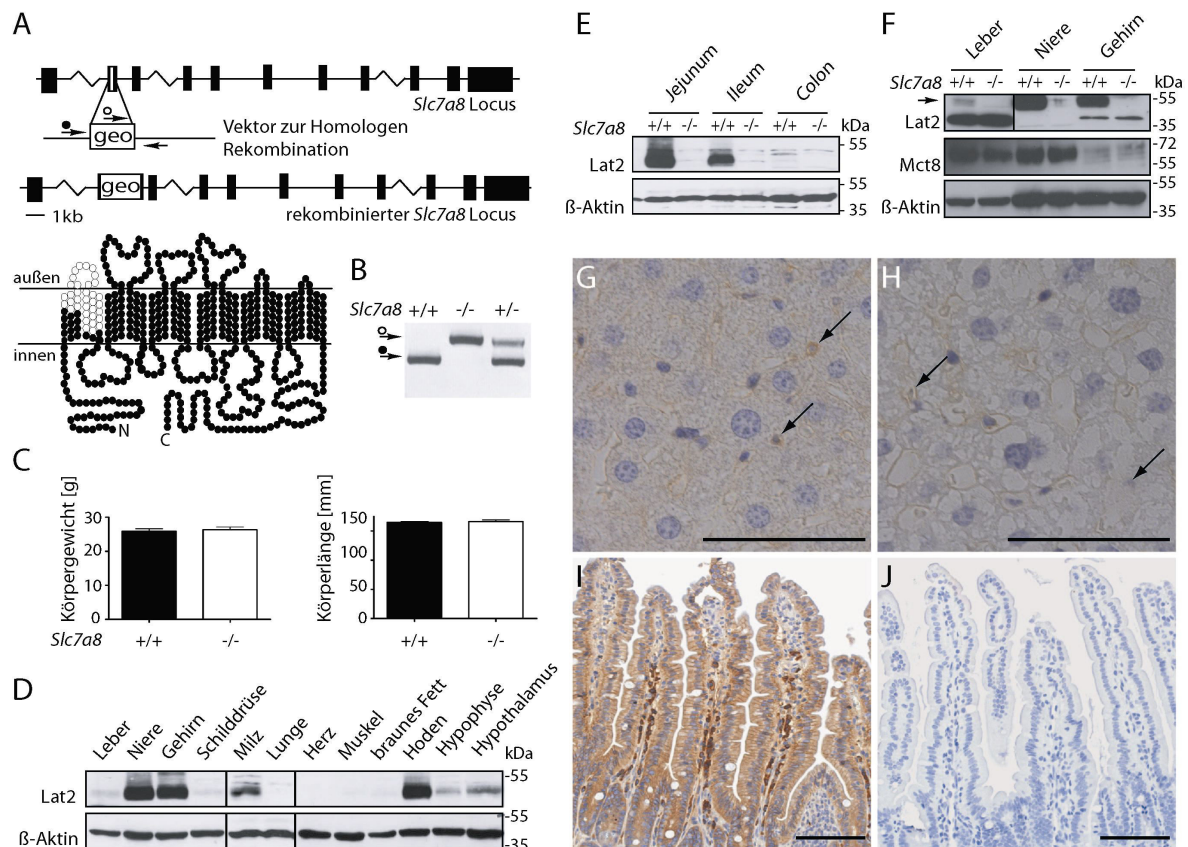
### 3.1. Die Charakterisierung *Slc7a8*-defizienter Mäuse

#### 3.1.1. Zielgerichtete Inaktivierung des *Slc7a8*-Gens in Mäusen

Die Funktion des neutralen Aminosäuretransporters Lat2/Slc7a8 in Niere und Darm der Maus wurde bereits charakterisiert (Broer, 2008). Nicht bekannt sind jedoch die physiologischen Auswirkungen einer kompletten Lat2-Inaktivierung.

Die zielgerichtete Inaktivierung des *Slc7a8*-Gens in Mäusen wurde durch die Einführung einer Geo-Kassette (siehe Abschnitt 2.1.4.) in das Exon 2 des besagten Gens herbeigeführt (Abb.3-1 A), wodurch die Expression eines funktionsfähigen Proteins (Lat2) verhindert wurde. Die Inaktivierung des *Slc7a8*-Gens hatte keine negativen Auswirkungen auf die Zucht der Tiere. Homozygote *Slc7a8*-defiziente Mäuse (*Slc7a8*<sup>-/-</sup>) wurden wie erwartet nach Mendel verteilt geboren und mittels PCR-Genotypisierung identifiziert (Abb.3-1 B). Für die weiteren biochemischen und physiologischen Untersuchungen wurden nur männliche Nachkommen der *Slc7a8*-Zucht genutzt.

Die Tiere (*Slc7a8*<sup>+/+</sup> versus *Slc7a8*<sup>-/-</sup>) zeigten keine Unterschiede hinsichtlich Körpergewicht und Körperlänge (Abb.3-1 C). Die Lat2-Proteinexpression konnte in Niere, Gehirn, Hypophyse, Hoden, Milz und Dünndarm nachgewiesen werden. In Lunge, Herz, Muskel, braunem Fett und Dickdarm hingegen war kein Lat2-Signal feststellbar (Abb.3-1 D+E). Wie erwartet, fehlte das Lat2-Signal im Gewebe *Slc7a8*-defizienter Tiere (Abb.3-1 E+F). Der Lat2-Antikörper erkannte in Leber und Gehirn ein zusätzliches Protein von circa 38 kDa, das allerdings als unspezifisch identifiziert werden konnte, da es sowohl in Geweben von *Slc7a8*<sup>+/+</sup>-Mäusen als auch in Geweben von *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen vorzufinden war. Das schwache Lat2-Signal in der Leber (Abb.3-1 F) ist auf die Expression des Transporters in den hepatischen Kupfferzellen zurückzuführen (Abb.3-1 G+H). In Darm und Niere (Abb.3-1 I+J; Abb.3-2 A) ist Lat2 basolateral lokalisiert (Rossier et al., 1999).



**Abbildung 3-1:** (A) Schematische Darstellung des murinen *Slc7a8*-Gens (Vierecke kennzeichnen Exons). Für die Transmembranhelix 1 und 2 (weiße Kreise) kodierende Regionen des Exons 2 wurden durch eine Geo-Kassette ersetzt, was zu einem funktionalen Nullallel führte. (B) PCR-Genotypisierung von Mäusen der *Slc7a8*-Zucht. Die verwendeten Primer sind durch schwarze und weiße Kreise für das Wildtyp- bzw. das *knock out*-Allel gekennzeichnet (siehe A). (C) Vergleiche von Körpergewicht und Körperlänge von *Slc7a8*<sup>+/+</sup>- versus *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Tieren zeigten keine signifikanten Unterschiede. Tierzahl: 8-12, Alter: 60-250 d. (D) Expression von Lat2 in verschiedenen Geweben der Wildtyp-Maus. Pro Gewebe wurden 80 µg Protein der Membranfraktion geladen und mittels Western Blot analysiert. β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Markerbanden befinden sich auf der rechten Seite. (E) Expression von Lat2 entlang des Gastrointestinaltraktes von Wildtyp- versus *Slc7a8*-defizienten Mäusen. (F) Vergleichende Analyse der Lat2-Expression in Leber, Niere und Gehirn mittels Western Blot. β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Die spezifische Lat2-Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Mct8-Expression diente dem Vergleich. (G+H) Immunhistochemische Färbungen der Leber von (G) *Slc7a8*<sup>+/+</sup>- versus (H) *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Tieren wiesen die Expression von Lat2 in den hepatischen Kupffer-Zellen nach. Gegenfärbung mit Hämalaun. (I+J) Immunhistochemische Lat2-Färbungen des Dünndarms von (I) *Slc7a8*<sup>+/+</sup>- versus (J) *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Tieren. Gegenfärbung mit Hämalaun. Maßstabsbalken: 50 µm. (Braun et al., 2011b)

### 3.1.2. *Slc7a8*-Defizienz in Mäusen führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Aminosäuren über den Urin (Aminoazidurie)

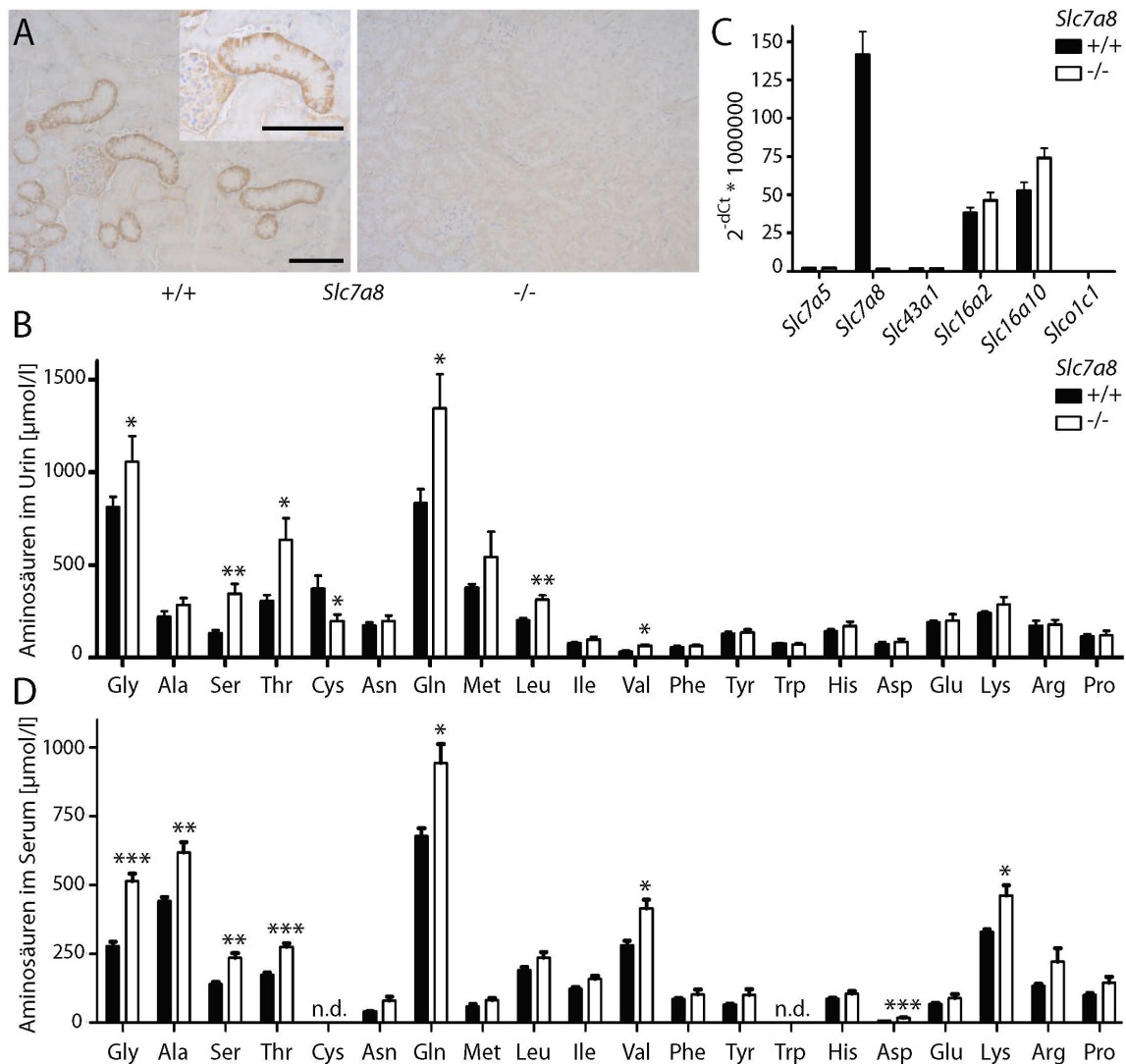
Die Lysinurische Proteinintoleranz (LPI) hat ihre Ursachen in einer Mutation des *SLC7A7*-Gens (Torrents et al., 1999) und führt in LPI-Patienten zu einer vermehrten Ausscheidung von Lysin, Arginin und Ornithin über den Urin. *Slc7a7*-defiziente Mäuse zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die oben beschriebenen Patienten (Sperandeo et al., 2007).

Daher wurde die Auswirkung einer *Slc7a8*-Inaktivierung auf die renale Aminosäureexkretion untersucht. 24 h-Urin *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen wurde mithilfe metabolischer Käfige gesammelt. Die Analyse des Urins offenbarte eine Aminoazidurie mit einer vermehrten Ausscheidung einzelner Aminosäuren wie Glycin, Serin, Threonin, Glutamin, Leucin und Valin (Abb.3-2 B). Interessanterweise waren einige klassische Substrate der L-Typ Aminosäuretransporter wie Isoleucin oder die aromatischen Aminosäuren in *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht betroffen. Der Lat2-Funktionsverlust wurde möglicherweise durch andere Aminosäuretransporter kompensiert, was zu der Untersuchung der Regulation potentieller kompensierender Transporter mittels RT-PCR führte (Abb.3-2 C). Wie erwartet, war die mRNA von *Slc7a8* in *Slc7a8*-defizienten Mäusen kaum detektierbar, die mRNA des aromatischen Aminosäuretransporters *Slc16a10* hingegen leicht erhöht. Das Aminosäureprofil im Serum von *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen war ebenfalls verändert, spiegelte allerdings nur teilweise die Veränderungen des Aminosäureprofils im Urin wieder (Abb.3-2 D). Als Ausnahme sei an dieser Stelle die signifikante Erhöhung von Lysin im Serum von *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen aufgeführt.

### 3.1.3. Gestörter Schilddrüsenhormontransport in primären Astrozyten *Slc7a8*-defizienter Mäuse

Studien mit primären Astrozyten der Ratte zeigten, dass L-Typ Aminosäuretransporter am T<sub>3</sub>-Transport beteiligt sind (Blondeau et al., 1993). Demzufolge wurden primäre Astrozyten der Maus als Modell zur Untersuchung des

Schilddrüsenhormontransports in *Slc7a8*-defizienten Mäusen ausgewählt. Ebenso wie die primären Astrozyten der Ratte transportieren auch murine Astrozyten  $T_4$  und  $T_3$  (Abb.3-3 A+B). Die Aufnahme beider Substrate war für die ersten drei Minuten linear, die  $K_m$ -Werte lagen bei  $3,7 \mu\text{M}$  ( $T_4$ ) und  $4,2 \mu\text{M}$  ( $T_3$ ).



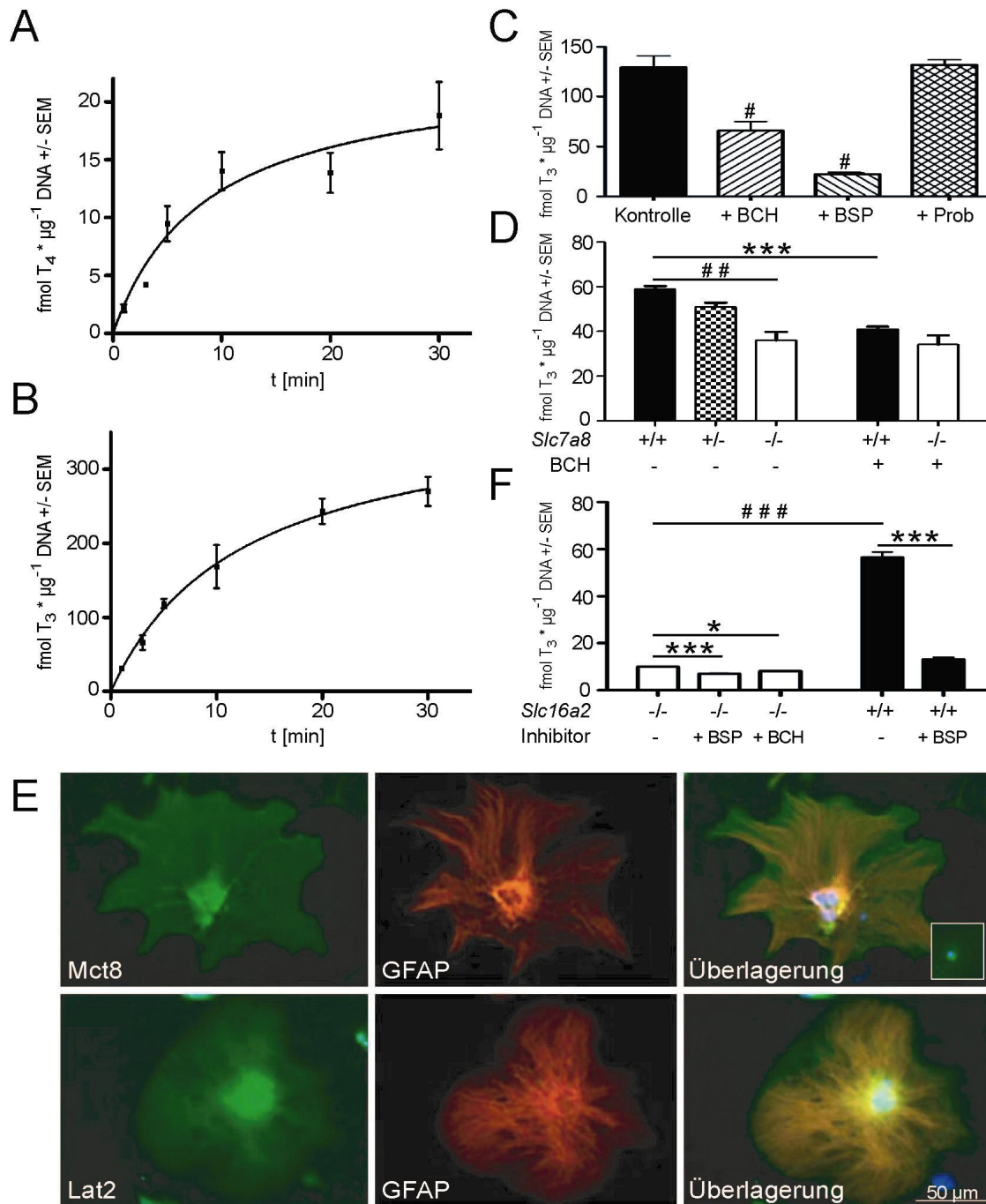
**Abbildung 3-2:** (A) Die immunhistochemische Färbung von Lat2 in der Niere zeigte dessen Lokalisation an der basolateralen Membran des proximalen Tubulus. Gegenfärbung mit Hämalaun. Maßstabsbalken:  $100 \mu\text{m}$ . Im Gewebe von *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist ein Lat2-Signal nicht nachweisbar. (B) Die Aminosäureanalyse des Urins *Slc7a8*-defizienter Mäuse offenbarte eine Aminoazidurie, die die neutralen Aminosäuren betraf. Tierzahl: 5-6. (C) Vergleichende RT-PCR-Analyse von Aminosäure- und Schilddrüsenhormontransportern in der Niere von Wildtyp- und *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Tierzahl: 3-4. (D) Aminosäureanalyse im Serum. Tierzahl: 4-7. Statistische Unterschiede wurden mittels ANOVA berechnet. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  und \*\*\* $P < 0,001$ . n.d., nicht detektiert. (Braun et al., 2011b)

Die Sensitivität des T<sub>3</sub>-Transports wurde mithilfe verschiedener pharmakologischer Inhibitoren untersucht (Abb.3-3 C). BCH (2-Amino-Bicycloheptan-2-Carbonsäure) als Lat2-spezifischer Inhibitor senkte die T<sub>3</sub>-Aufnahme um 40 %. BSP (Bromosulphthalein) als unspezifischer Inhibitor, der verschiedene Transporter (darunter auch Mct8) hemmt, führte zu einer drastischen Hemmung des T<sub>3</sub>-Transports um circa 80 %. Probenecid als spezifischer Inhibitor für Oatp1c1 (T<sub>4</sub>-Transporter) hatte keinen Effekt auf den T<sub>3</sub>-Transport.

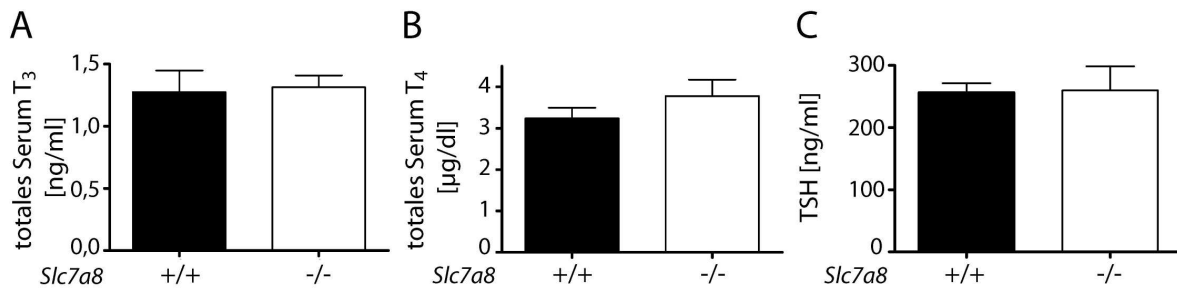
Die Daten legen nahe, dass primäre, murine Astrozyten neben Lat ein BCH-unabhängiges T<sub>3</sub>-Transport-System besitzen. Untersuchungen von Astrozyten der verschiedenen *Slc7a8*-Genotypen (*Slc7a8*<sup>+/+</sup>, *Slc7a8*<sup>+/-</sup>, *Slc7a8*<sup>-/-</sup>) belegten diese Vermutung und zeigten eine Abnahme des T<sub>3</sub>-Transports in Abhängigkeit von der Gendosis (Abb.3-3 D). Eine komplette Hemmung der T<sub>3</sub>-Aufnahme blieb jedoch aus. *Slc7a8*<sup>+/+</sup>-Astrozyten, die gleichzeitig mit T<sub>3</sub> und BCH inkubiert wurden, zeigten eine Abnahme des T<sub>3</sub>-Transports auf das Niveau der *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Astrozyten. Die Inhibition durch BCH offenbarte somit die Rolle von Lat2 als T<sub>3</sub>-Transporter an der Plasmamembran von Astrozyten. Fluoreszenz-Doppelfärbungen wiesen neben Lat2 auch Mct8 in primären Astrozyten nach (Abb.3-3 E). Mct8 als T<sub>3</sub>-Transporter könnte demnach neben anderen Transportern für den BCH-insensitiven T<sub>3</sub>-Transport verantwortlich sein. Pharmakologische Untersuchungen von *Slc16a2*<sup>+/+</sup>- und *Slc16a2*<sup>-/-</sup>-Astrozyten zeigten, dass BSP die T<sub>3</sub>-Aufnahme in Wildtyp-Astrozyten auf das Niveau von *Slc16a2*<sup>-/-</sup>-Astrozyten senkte. In *Slc16a2*<sup>-/-</sup>-Astrozyten führten sowohl BCH als auch BSP zu einer signifikanten Reduktion aber nicht zu einer vollständigen Hemmung der T<sub>3</sub>-Aufnahme.

#### 3.1.4. *Slc7a8*-Defizienz in Mäusen hat keine Auswirkungen auf die Schilddrüsenhormonwerte und die T<sub>3</sub>-vermittelte Genaktivierung

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass Lat2 in der Lage ist, Schilddrüsenhormone *in vivo* zu transportieren (Abb.3-3). Zur Untersuchung etwaiger Auswirkungen der *Slc7a8*-Inaktivierung auf die zirkulierenden Schilddrüsenhormonspiegel wurden die Konzentrationen von T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und TSH im Serum *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen bestimmt. Keines der besagten Hormone war im Serum von *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen verändert (Abb.3-4).



**Abbildung 3-3:** Zeitabhängige Aufnahme von (A)  $^{125}\text{I}$ -T<sub>4</sub> und (B)  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> in primäre, murine Astrozyten. Die Messung erfolgte in Triplikaten. (C) Auswirkungen verschiedener Inhibitoren (1 mM) auf die Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>. Messzeit: 3 min. (D) Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> in primäre, murine Astrozyten der verschiedenen Lat2-Genotypen (*Slc7a8*<sup>+/+</sup>, *Slc7a8*<sup>+/-</sup>, *Slc7a8*<sup>-/-</sup>) mit und ohne 1 mM BCH. Messzeit: 2 min. (E) Immunhistochemische Fluoreszenz-Doppelfärbung von primären Astrozyten mit Lat2 bzw. Mct8 und GFAP (Marker für Astrozyten). Kästchen: Ungefärbte Negativ-Kontrolle. Maßstabsbalken: 50 μm. Statistische Unterschiede wurden mittels ANOVA (Dunett's Post-Hoc-Test) für #P < 0,05, ##P < 0,01 und ###P < 0,001 bzw. mittels t-Test (ungepaart) für \*P < 0,05 und \*\*\*P < 0,001 berechnet. (Braun et al., 2011a)



**Abbildung 3-4:** Die zirkulierenden Schilddrüsenhormon- und TSH-Level *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen wiesen keine Unterschiede auf. (A) Totales T<sub>3</sub> des Serums. (B) Totales T<sub>4</sub> des Serums. (C) TSH des Serums. Tierzahl: 8-12. Statistische Analyse: t-Test (ungepaart). (Braun et al., 2011b)

Die *Lat2*-Inaktivierung führte zwar zu keinen signifikanten Unterschieden hinsichtlich zirkulierender Schilddrüsenhormonwerte, dennoch waren Auswirkungen auf die T<sub>3</sub>-vermittelte Genexpression in *Lat2*-exprimierenden Geweben (Abb.3-1) nicht auszuschließen. Untersuchungen der T<sub>3</sub>-responsiven Dejodase 1 in Leber und Niere von *Slc7a8*-defizienten Mäusen und ihrer Wildtypkontrollen offenbarten allerdings keine Unterschiede in der Aktivität des Enzyms (Abb.3-5 A+B).

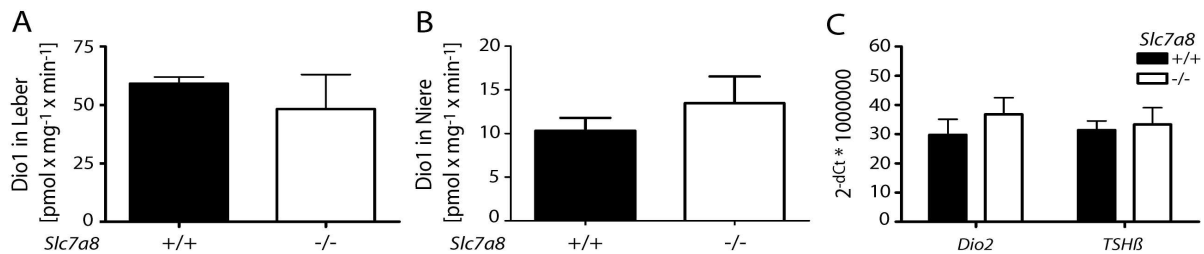
Des Weiteren ist in der Literatur nachzulesen, dass sich eine beeinträchtigte Schilddrüsenhormonachse oft durch Veränderungen in der Expression der hypophysären *Dio2*- und *TSHβ*-Gene auszeichnet. RT-PCR Analysen ergaben allerdings keine Abweichungen in der Expression beider Gene (Abb.3-5 C), so dass von einer normalen Funktionsfähigkeit der Schilddrüsenhormonachse ausgegangen werden kann.

### 3.1.5. Normale Gehirnentwicklung, aber leicht gestörte Bewegungskoordination *Slc7a8*-defizienter Mäuse

AHDS-Patienten weisen einen verminderten Schilddrüsenhormongehalt im zerebralen Kortex und dem Kleinhirn auf. Die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in primäre kortikale Neurone *Slc16a2*-defizienter Mäuse ist ebenfalls verringert (Wirth et al., 2009).

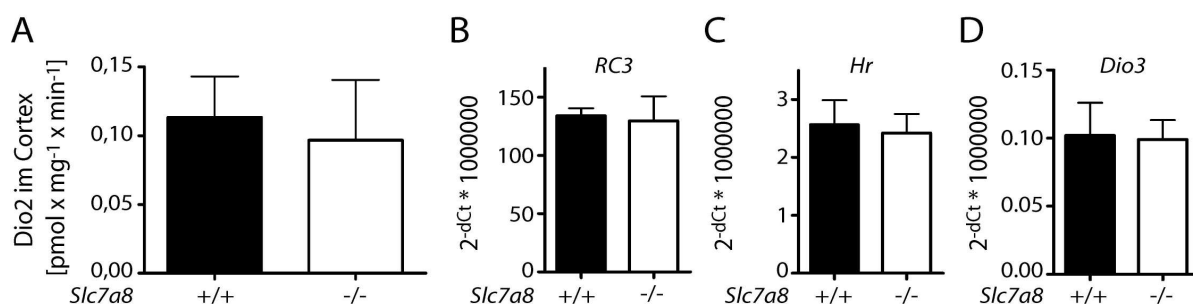
Der Nachweis einer geringeren T<sub>3</sub>-Aufnahme durch *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Astrozyten führte zur Untersuchung der Dejodase 2. Die Aktivität der Dejodase 2 (im Astrozyten exprimiert) war im Kortex nicht verändert (Abb.3-6 A). Eine Erhöhung der *Dio2*-Aktivität hätte auf einen hypothyreoten Zustand des Gewebes hingedeutet. Auch Untersuchungen

$T_3$ -responsiver Gene in *Slc7a8*-defizienten Mäusen konnten keine Unterschiede gegenüber ihren Wildtypkontrollen aufdecken. Die Expression der neuronalen Marker *RC3* (Neurogranin), *Hr* (*Hairless*) und *Dio3* (Dejodase 3) war im Kortex nicht gestört (Abb.3-6 B-D).



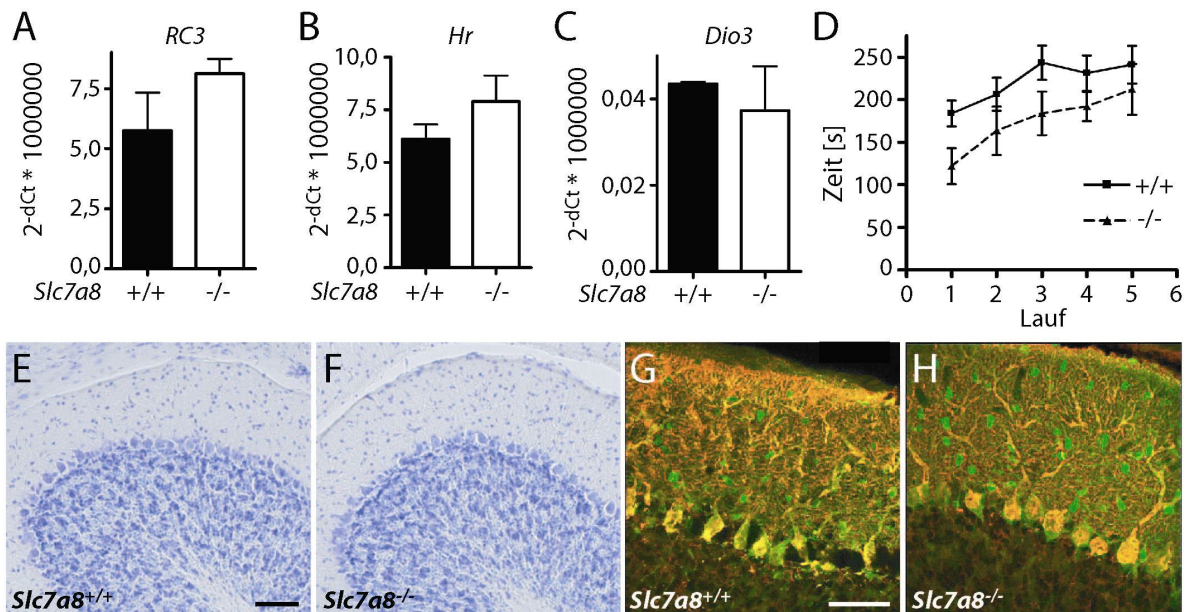
**Abbildung 3-5:** Aktivität der (A) hepatischen und der (B) renalen Dio1 in *Slc7a8*-defizienten Mäusen und ihren Wildtypkontrollen. (C) Genexpression von *Dio2* und *TSHβ* in der Hypophyse. 18S rRNA diente als Referenz. Tierzahl: 3-5 pro Genotyp. Statistische Analyse: t-Test (ungepaart). (Braun et al., 2011b)

Untersuchungen der  $T_3$ -responsiven Gene *RC3*, *Hr* und *Dio3* im Kleinhirn *Slc7a8*-defizienter Mäuse offenbarten ebenfalls keine Veränderungen (Abb.3-7 A-C). Allerdings zeigten *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäuse leichte Störungen in der Bewegungskoordination (Abb.3-7 D), woraufhin die Struktur des Kleinhirns immunhistochemisch untersucht wurde. Die Nissl-Färbung zeigte eine normale Kleinhirnstruktur (Abb.3-7 E+F) und auch die Ausbildung der Purkinje-Zellen und der Sternzellen (Interneurone) wiesen keine Veränderungen auf (Abb.3-7 G+H), wodurch Hypothyreose während der Entwicklung ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 3-6:** (A) Aktivität der Dio2 im zerebralen Kortex *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen. (B - D) Analyse der  $T_3$ -responsiven Genexpression im zerebralen Kortex mittels RT-PCR. (B) *RC3* (Neurogranin), (C) *Hr* (*Hairless*) und (D) *Dio3* (Dejodase 3). 18S rRNA diente als Referenz. Tierzahl: 3-4 pro Genotyp. Statistische Analyse: t-Test (ungepaart). (Braun et al., 2011b)





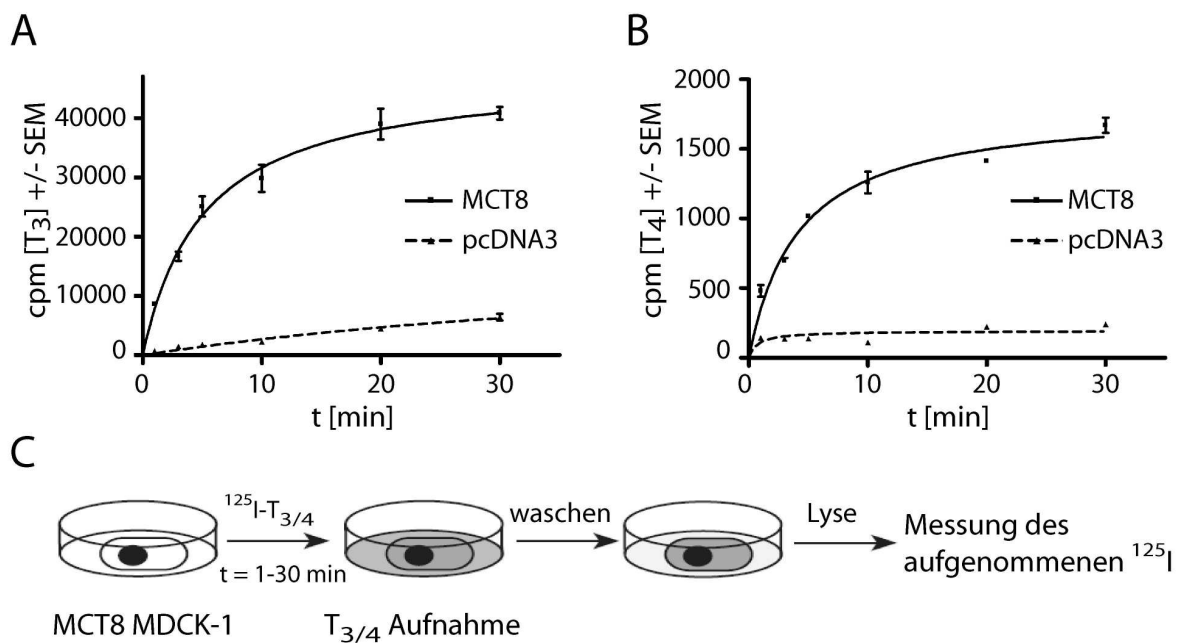
**Abbildung 3-7:** (A - C) Analyse der T<sub>3</sub>-responsiven Genexpression im Kleinhirn *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen mittels RT-PCR. (A) *RC3* (Neurogranin), (B) *Hr* (*Hairless*) und (C) *Dio3* (Dejodase 3). 18S rRNA diente als Referenz. Tierzahl: 3-4 pro Genotyp. Statistische Analyse: t-Test (ungepaart). (D) Vergleich von *Slc7a8*<sup>+/+</sup>- mit *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Rotarod zur Analyse möglicher Bewegungsstörungen. Tierzahl: 8-12 Mäuse pro Genotyp. (E + F) Nissl-Färbung zur Untersuchung der Histogenese des Kleinhirns. (G + H) Immunhistochemische Doppelfärbung mit Calbindin (Marker für Purkinje Zellen; rot) und Parvalbumin (Marker für Purkinje Zellen und Interneurone; grün). Überlagerung beider Marker: gelb. Maßstabsbalken: 50 µm. (Braun et al., 2011b)

## 3.2. Struktur-Funktionsanalysen in MCT8

### 3.2.1. Aufnahme radioaktiv-markierter Jodthyronine in MCT8-exprimierende MDCK-1 Zellen

Zur Untersuchung der Transporteigenschaften von MCT8 wurde ein *in vitro* Zellkulturmodell verwendet, das aus MCT8-exprimierenden MDCK-1 (*Madin-Darby canine kidney*) Zellen bestand (Kinne et al., 2009). MDCK-1 Zellen eignen sich besonders gut zur Untersuchung der Transportereigenschaften, da sie selbst keine endogene MCT8-Expression sowie eine geringe Jodthyroninaufnahme aufweisen. Diese endogene Aufnahme konnte durch die stabile Expression von MCT8 in MDCK-1 Zellen um ein Vielfaches erhöht werden (Abb.3-8 A+B). Die Aufnahme der

Jodthyronine  $T_3$  und  $T_4$  in MCT8-exprimierende MDCK-1 Zellen war in den ersten 3 min linear und erreichte nach circa 10 min die Sättigung.



**Abbildung 3-8:** (A + B) Zeitabhängige Aufnahme von (A)  $^{125}\text{I-T}_3$  und (B)  $^{125}\text{I-T}_4$  in MCT8-exprimierende MDCK-1 Zellen. Als Kontrolle dienten Zellen, die stabil mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert waren. Die Datenpunkte stellen Triplikate einer Messung dar. (C) Durchführung des Experiments: Inkubation MCT8-exprimierender MDCK-1 Zellen mit radioaktiv-markierten Jodthyroninen über verschiedene Zeitpunkte. Waschen und Lyse der Zellen. Messung der aufgenommenen Radioaktivität. (Braun et al., 2012)

### 3.2.2. His192 und His415

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob die Histidinreste an Position 192 und 415 an der Bindung und dem Transport von Jodthyroninen beteiligt sind, wurden folgende Mutationen in die MCT8-Aminosäuresequenz eingeführt: Histidin (His, H) zu Alanin (Ala, A), Phenylalanin (Phe, F) bzw. Glutamin (Gln, Q). Histidinseitenketten sind in der Lage zwei mögliche Formen von Interaktionen mit einem  $T_3$ -Molekül einzugehen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Van-der-Waals Wechselwirkungen. Die Mutation von Histidin zu Alanin würde beide Interaktionsmöglichkeiten verhindern. Des Weiteren würde eine räumliche Lücke in der Struktur des Proteins entstehen. Beim Austausch von Histidin gegen Phenylalanin würde aufgrund der Ringstruktur des Phenylalanins die Möglichkeit bestehen bleiben, hydrophobe

Wechselwirkungen mit dem Substrat einzugehen, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen hingegen wäre unterbunden. Ein Glutamin an der Position des Histidins erhält wiederum die Fähigkeit aufrecht, Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Substrat einzugehen, wäre aber nicht mehr in der Lage die Van-der-Waals Wechselwirkungen der Ringstruktur auszubilden.

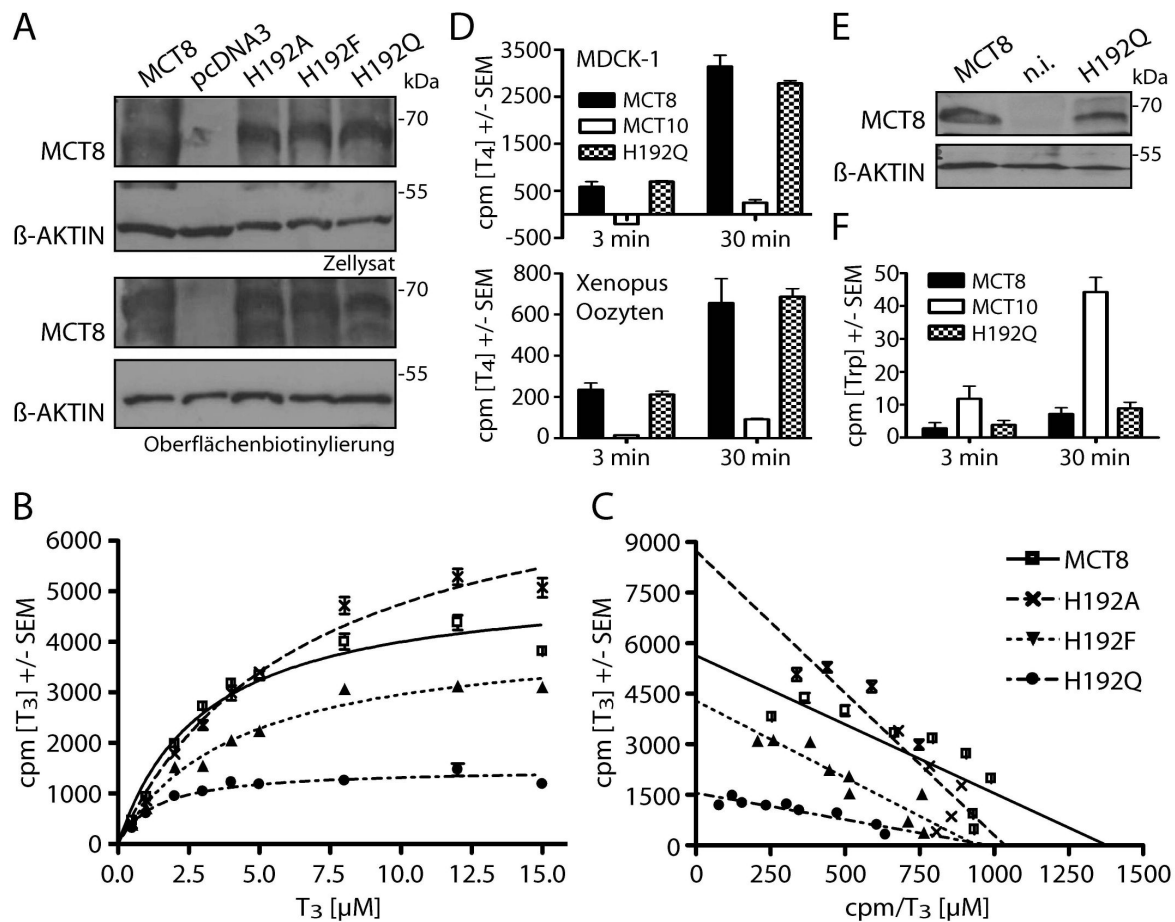
Alle sechs Mutanten wurden schließlich stabil in MDCK-1 Zellen exprimiert und standen somit für weitere Experimente zur Verfügung (Abb.3-9 A und Abb.3-10 A; jeweils Zellysat).

### *His192*

Die Mutation von His192 zu Ala, Phe oder Gln hatte keine Auswirkungen auf die Translokation des jeweiligen Proteins an die Zelloberfläche von MDCK-1 Zellen (Abb.3-9 A; Oberflächenbiotinylierung).

Zur Untersuchung der T<sub>3</sub>-Aufnahme wurden stabil-exprimierende MDCK-1 Zellen mit einer ansteigenden T<sub>3</sub>-Konzentration über einen Zeitraum von 3 min inkubiert und grafisch als Michaelis-Menten-Kinetik dargestellt (Abb.3-9 B). Der Zeitraum wurde anhand der Vorexperimente gewählt (Abb.3-8 A) und lag mit 3 min im linearen Bereich der T<sub>3</sub>-Aufnahme. Durch die grafische Darstellung der Daten in einem Eadie-Hofstee-Diagramm konnten die v<sub>max</sub>-Werte (Schnittpunkt mit der Y-Achse) und die K<sub>m</sub>-Werte (Steigung der Geraden) ermittelt werden (Abb.3-9 C). v<sub>max</sub> war für H192F und H192Q im Vergleich zu MCT8 um 25 % bzw. 80 % verringert, für H192A hingegen um 50 % erhöht. Der K<sub>m</sub>-Wert von H192F ( $4,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ) war vergleichbar mit dem K<sub>m</sub>-Wert von MCT8 ( $4,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ). H192A zeigte hingegen einen erhöhten ( $8,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ) und H192Q einen verringerten K<sub>m</sub>-Wert ( $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ) (Abb.3-9 C).

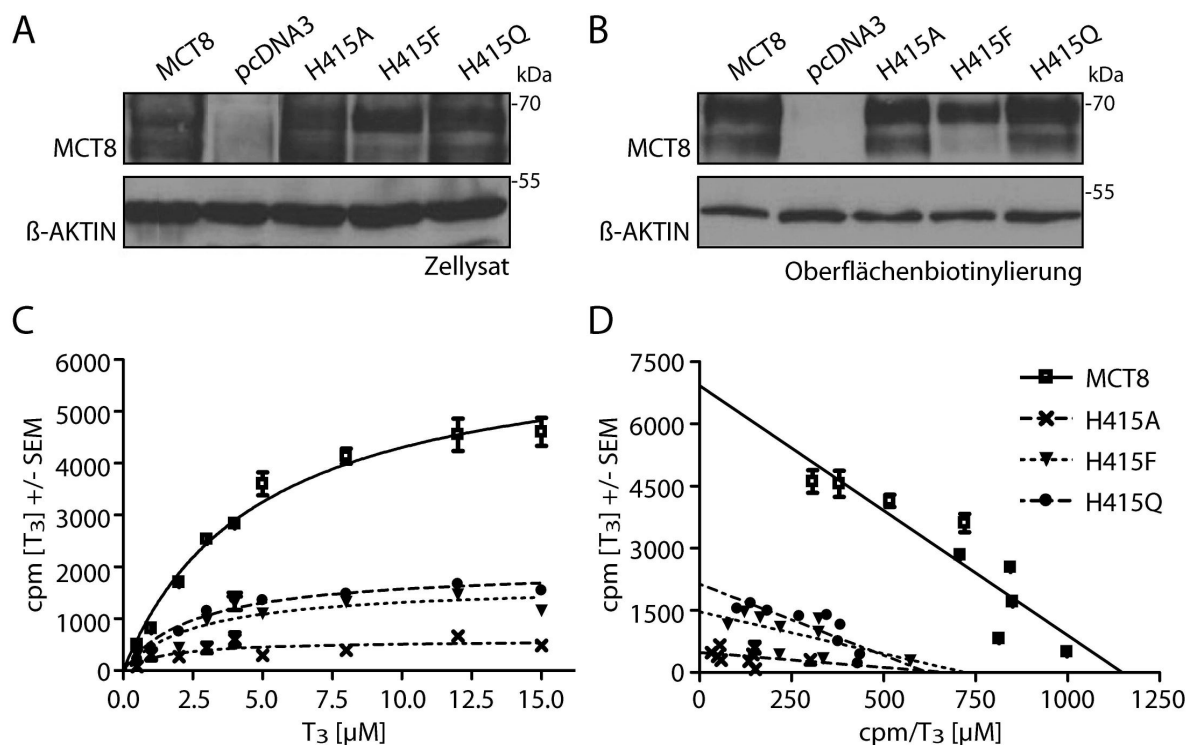
MCT8 und der Monocarboxylattransporter 10 (MCT10) teilen eine 49%ige Sequenzhomologie (Meredith and Christian, 2008), weisen allerdings unterschiedliche Substratspezifitäten auf. MCT10 transportiert T<sub>3</sub> aber kein T<sub>4</sub> und anders als MCT8 die aromatische Aminosäure Tryptophan (Trp). Das MCT10-Homologiemodell (Gunnar Kleinau, Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie) zeigt, dass sich an Position 88 (korrespondierende Aminosäureposition zu His192 in MCT8) ein Glutamin befindet. Da sowohl His192 (MCT8) als auch Gln88 (MCT10) in die jeweiligen potentiellen Substratkänäle hineinragen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Aminosäuren an der Substraterkennung und somit an der unterschiedlichen Substratspezifität beteiligt sein könnten. Daher wurde H192Q hinsichtlich T<sub>4</sub>- und Trp-Transportaktivität untersucht (Abb.3-9 D+F).



**Abbildung 3-9:** (A) Expression verschiedener His192-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (MCT8) in MDCK-1 Zellen im Zellysat und an der Zelloberfläche (Oberflächenbiotinylierung). pcDNA3-Leervektor diente als Negativkontrolle. (B)  $T_3$ -abhängige Michaelis-Menten-Kinetik der His192-Mutanten im Vergleich mit MCT8 nach Abzug der Hintergrundaktivität des Leervektors pcDNA3. Ansteigende  $T_3$ -Konzentration: 0,5-15  $\mu\text{M}$ . Messzeit: 3 min. Messpunkte stellen Triplikate dar. (C) Grafische Darstellung der Daten aus (B) in einem Eadie-Hofstee-Diagramm. Die Steigung der Geraden beschreibt den  $K_m$ -Wert des Transporters. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse gibt die maximale Geschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) des Transports an. (D)  $^{125}\text{I}$ - $T_4$ -Transport von H192Q vs. MCT8 und MCT10 in MDCK-1 Zellen und *Xenopus* Oozyten. pcDNA3 bzw. nicht injizierte Oozyten dienen als Negativkontrolle, deren Hintergrundaktivität von den Messwerten abgezogen wurde. Die Messpunkte stellen Triplikate dar. (E) Expression von H192Q und MCT8 in *Xenopus* Oozyten. Nicht injizierte (n.i.) Oozyten dienen als Negativkontrolle. (F)  $^{14}\text{C}$ -Trp-Transport von H192Q vs. MCT8 und MCT10 in *Xenopus* Oozyten. Nicht injizierte Oozyten dienen als Negativkontrolle, dessen Hintergrundaktivität von den Messwerten abgezogen wurde. Die Messpunkte stellen Triplikate dar. (Braun et al., 2013)

Zur Untersuchung der Tryptophan-Aufnahme wurden *Xenopus* Oozyten als Modell ausgewählt, da Oozyten anders als MDCK-1 Zellen keine endogenen Trp-Transporter exprimieren. Nach Injektion der cRNA konnte die Expression der

jeweiligen Transporter in *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden (Abb.3-9 E). Interessanterweise konnten anders als für T<sub>3</sub> keine Veränderungen hinsichtlich der T<sub>4</sub>-Transportaktivität von H192Q im Vergleich mit MCT8 sowohl in MDCK-1 Zellen als auch in *Xenopus* Oozyten ermittelt werden (Abb.3-9 D). Die Trp-Aufnahme war in mit H192Q-injizierten Oozyten im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls nicht verändert (Abb.3-9 F). MCT10-exprimierende MDCK-1 Zellen (Roth et al., 2010) bzw. mit MCT10-cRNA injizierte *Xenopus* Oozyten dienten als Kontrolle.



**Abbildung 3-10:** (A + B) Expression der His415-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (MCT8) im Zelllysate (A) und an der Zelloberfläche (B) von MDCK-1 Zellen. pcDNA3-Leervektor diente als Negativkontrolle. (C) T<sub>3</sub>-abhängige Michaelis-Menten-Kinetik der His415-Mutanten im Vergleich mit MCT8 nach Abzug der Hintergrundaktivität des Leervektors pcDNA3. Ansteigende T<sub>3</sub>-Konzentration: 0,5-15 μM. Messzeit: 3 min. Messpunkte stellen Triplikate dar. (D) Grafische Darstellung der Daten aus (C) in einem Eadie-Hofstee-Diagramm. Die Steigung der Geraden beschreibt den K<sub>m</sub>-Wert des Transporters. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse gibt die maximale Geschwindigkeit (v<sub>max</sub>) des Transports an. (Braun et al., 2013)

### His415

Während für die Position His192 bereits eine pathogene Mutation in der Literatur beschrieben wurde (Vaurs-Barriere et al., 2009), so konnte His415 bis jetzt noch nicht mit einem gestörten Substrattransport in Verbindung gebracht werden. Die

Mutation von His415 zu Ala, Phe oder Gln hatte wie bereits für His192 gezeigt keine Auswirkungen auf die Translokation der Proteine an die Zelloberfläche von MDCK-1 Zellen (Abb.3-10 B).

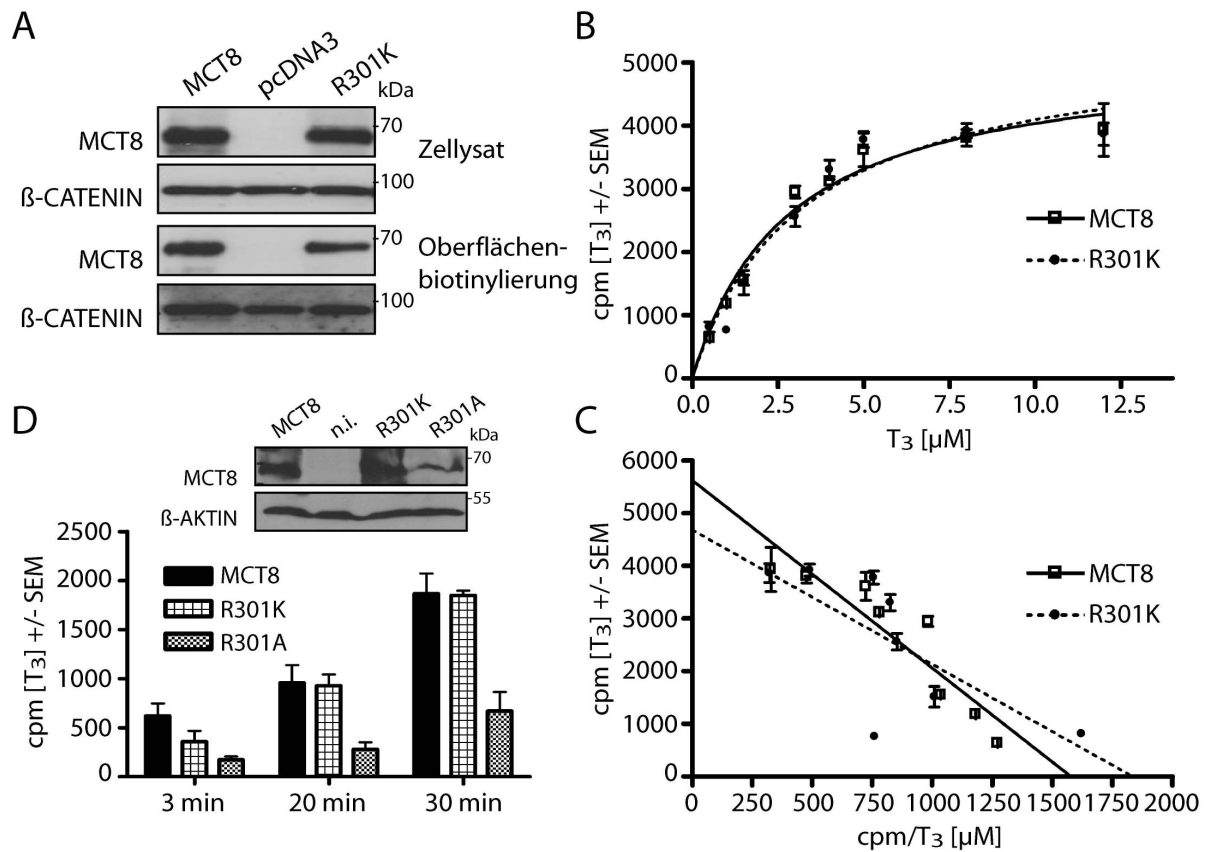
Die Messungen zur  $T_3$ -Transportaktivität offenbarten, dass His415 dabei eine wichtige Rolle spielte (Abb.3-10 C). H415A war nicht mehr in der Lage,  $T_3$  zu transportieren. H415Q und H415F hingegen zeigten eine signifikante Reduktion aber keine komplette Hemmung des Transports um 70 % und 80 % im Vergleich zum Wildtyp. Da die Experimente eine Michaelis-Menten-Kinetik aufzeigten, konnten die Daten in einem Eadie-Hofstee-Diagramm grafisch dargestellt werden (Abb.3-10 D). Der  $K_m$ -Wert für H415F ( $2,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ) war im Vergleich zu MCT8 ( $4,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ) verringert, wohingegen H415Q ( $3,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ) keine signifikante Veränderung offenbarte.

### 3.2.3. Arg301

Zur Klärung der Hypothese, ob Arginin301 (Arg, R) an der Substratbindung bzw. dem Substrattransport beteiligt ist, wurde Arg301 gegen Alanin und Lysin (Lys, K) ausgetauscht. Lysin als geladene aber etwas kleinere Aminosäure weist ähnliche Eigenschaften wie Arginin auf. Alanin hingegen fehlt nicht nur die positive Ladung des Arginins sondern die Polarität der Aminosäureseitenkette, was zu Stabilitätsproblemen in der Proteinstruktur führen könnte.

R301A konnte anders als R301K nicht stabil in MDCK-1 Zellen exprimiert werden (Abb.3-11 A). R301K zeigte ähnliche  $T_3$ -Transporteigenschaften wie der Wildtyp (Abb.3-11 B). Die grafische Darstellung der erhaltenen Michaelis-Menten-Kinetik in einem Eadie-Hofstee-Diagramm offenbarte eine leichte Reduktion von  $v_{\text{max}}$  sowie eine nicht signifikante Verringerung des  $K_m$ -Wertes (Abb.3-11 C).

Da es nicht gelang R301A stabil in MDCK-1 Zellen zu exprimieren, wurde ein weiteres Mal das *Xenopus*-Oozyten-Modell genutzt. *Xenopus* Oozyten, die mit R301K-cRNA injiziert wurden, zeigten wie bereits in MDCK-1 Zellen beobachtet, die gleiche Transportaktivität wie MCT8-Wildtyp-Oozyten (Abb.3-11 D). Die Expression von R301A in *Xenopus* Oozyten und infolgedessen auch der  $T_3$ -Transport waren klar verringert (Abb.3-11 D).



**Abbildung 3-11:** (A + B) Expression von R301K im Vergleich zum Wildtyp (MCT8) im Zellysat und an der Zelloberfläche von MDCK-1 Zellen. pcDNA3-Leervektor diente als Negativkontrolle. (B)  $T_3$ -abhängige Michaelis-Menten-Kinetik von R301K und MCT8 nach Abzug der Hintergrundaktivität des Leervektors pcDNA3. Ansteigende  $T_3$ -Konzentration: 0,5-12  $\mu$ M. Messzeit: 3 min. Messpunkte stellen Triplikate dar. (C) Grafische Darstellung der Daten aus (B) in einem Eadie-Hofstee-Diagramm. Die Steigung der Geraden beschreibt den  $K_m$ -Wert des Transporters. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse gibt die maximale Geschwindigkeit ( $v_{max}$ ) des Transports an. (D) Expression und  $^{125}$ I- $T_3$ -Aufnahme der Arg301-Mutanten im Vergleich mit MCT8 in *Xenopus* Oozyten. Nicht injizierte (n.i.) Oozyten dienten als Negativkontrolle, deren Hintergrundaktivität von den Messwerten abgezogen wurde. (Braun et al., 2013)

### 3.3. Die Identifizierung einer weiblichen AHDS-Patientin

Die Sequenzierung des *SLC16A2*-Gens einer weiblichen AHDS-Patientin offenbarte eine zuvor noch nicht beschriebene Mutation. Die Mutation bestand in einem Austausch von Asparagin gegen Isoleucin an Position 193 der MCT8-Aminosäuresequenz (Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin). Zur Untersuchung der Auswirkungen der N193I-Mutation auf den Schilddrüsenhormontransport wurde die Mutation molekularbiologisch nachgebaut und in einem *in vitro* Zellkulturmodell (siehe Abschnitt 3.2.1.) auf ihre biochemischen Eigenschaften hin getestet.

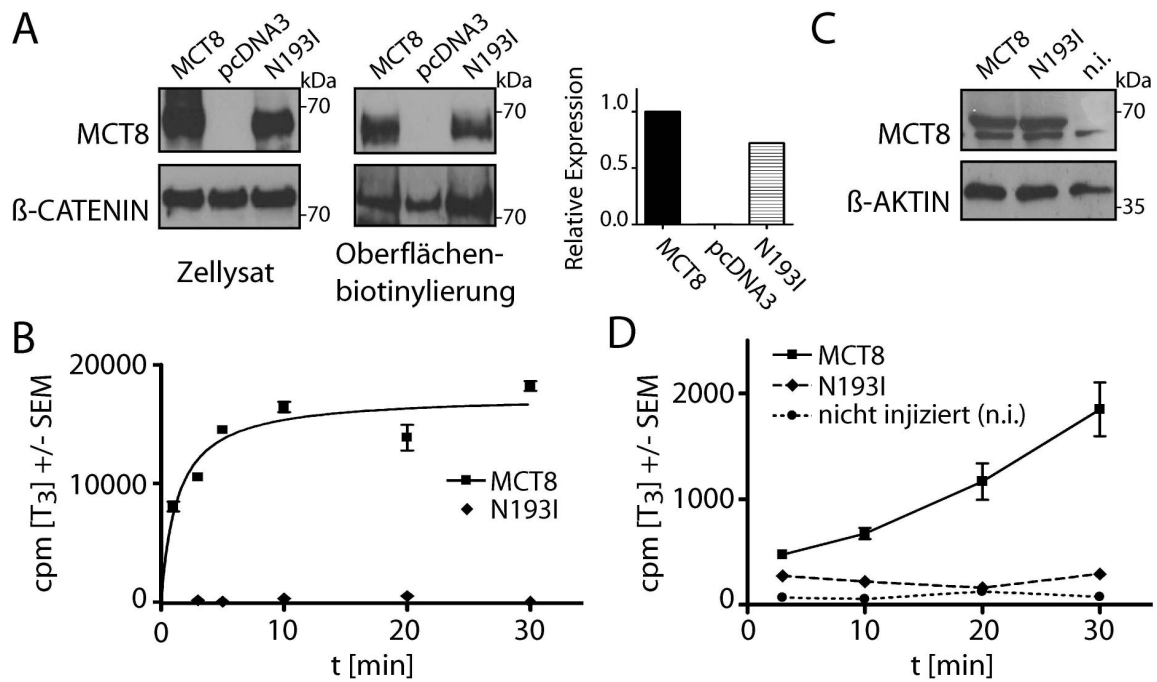
#### 3.3.1. Biochemische Eigenschaften der N193I-Mutation

Der Vergleich von N193I- und MCT8-exprimierenden MDCK-1 Zellen hinsichtlich ihrer Expression an der Zelloberfläche zeigte, dass die Expression und Translokation der N193I-Mutante an die Zelloberfläche nicht gestört ist (Abb.3-12 A). Die Aufnahme von  $T_3$  in stabil-exprimierende MDCK-1 Zellen hingegen offenbarte einen gravierenden Unterschied zwischen MCT8 und N193I. N193I hatte jegliche Transportaktivität verloren (Abb.3-12 B). Experimente in *Xenopus* Oozyten ergaben die gleichen Ergebnisse (Abb.3-12 C+D). *Xenopus* Oozyten wurden als Modell ausgewählt, da sie keine weiteren Schilddrüsenhormontransporter an ihrer Oberfläche exprimieren. So wurde deutlich, dass die N193I-Mutante zwar noch in der Lage war  $T_3$  als Substrat zu binden (sichtbar an den höheren cpm-Werte der N193I-Mutante im Vergleich mit nicht-injizierten Oozyten), aber nicht mehr zu transportieren (Abb.3-12 D).

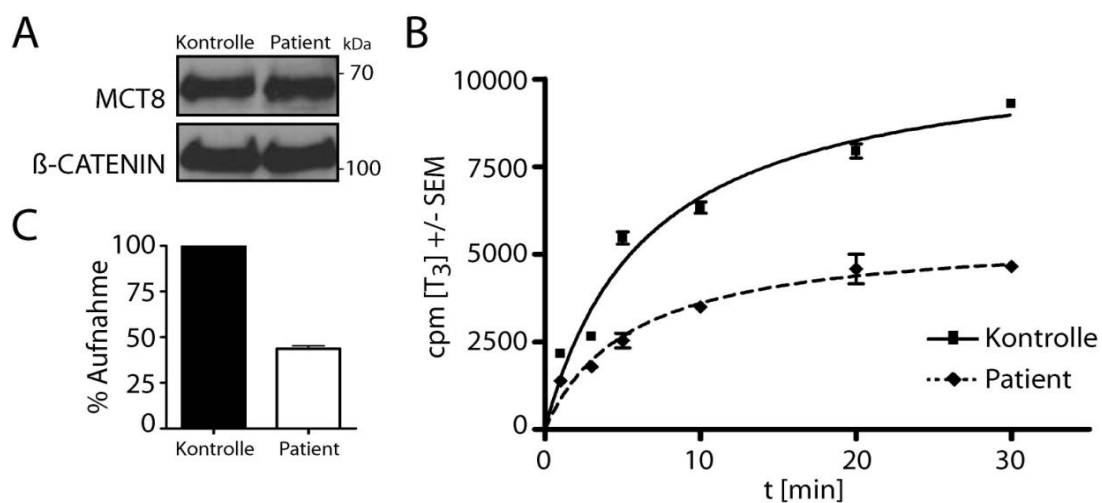
#### 3.3.2. Aufnahme von radioaktiv-markiertem $T_3$ in Fibroblasten einer AHDS-Patientin

Fibroblasten der betroffenen Patientin wurden dazu genutzt, um die Auswirkungen der N193I-Mutation auf den Transport von Jodthyroninen *ex vivo* zu untersuchen. Ebenso wie in Fibroblasten einer gesunden Probandin konnte die Expression von MCT8 in Fibroblasten der AHDS-Patientin nachgewiesen werden (Abb.3-13 A). Der  $T_3$ -Transport in die Fibroblasten der Patientin war im Mittel um circa 45% verringert (Abb.3-13 B+C).





**Abbildung 3-12:** (A) Expression von MCT8 im Vergleich zur N193I-Mutante in MDCK-1 Zellen. Links: Zellysat. Mitte: Zelloberfläche. Rechts: Die Quantifizierung der Expression von MCT8 und N193I an der Zelloberfläche zeigte eine ähnlich starke Expression beider Proteine. (B) Zeitabhängige Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> in MDCK-1 Zellen, die stabil mit MCT8 bzw. N193I transfiziert waren. Kontrolle: MDCK-1 Zellen stabil transfiziert mit pcDNA3 (Leervektor), deren Hintergrundaktivität von den eigentlichen Messwerten abgezogen wurde. Die Datenpunkte stellen Triplikate einer Messung dar. (C) Expression von MCT8 und N193I in *Xenopus* Oozyten. Nicht injizierte (n.i.) Oozyten dienen als Negativkontrolle. (D) Zeitabhängige Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> in *Xenopus* Oozyten, injiziert mit MCT8 bzw. N193I. Kontrolle: nicht injizierte Oozyten. Die Datenpunkte stellen Vierfachbestimmungen einer Messung dar.

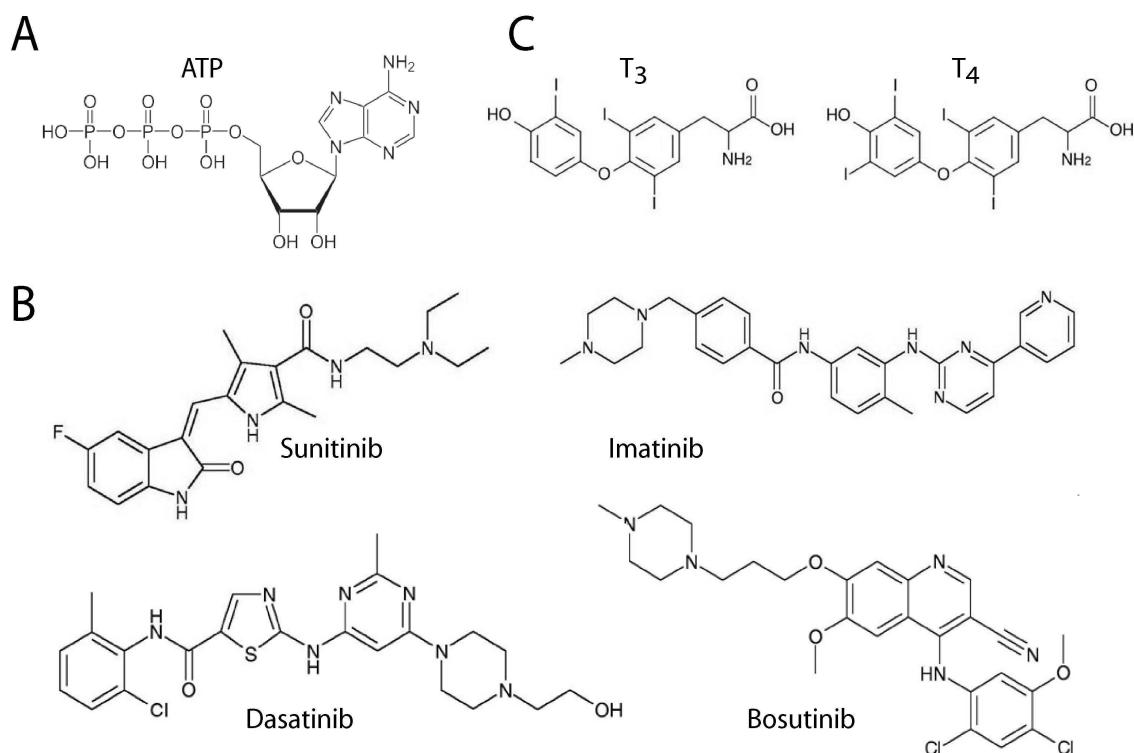


**Abbildung 3-13:** (A) Expression von MCT8 in Fibroblasten einer gesunden Probandin (Kontrolle) und der AHDS-Patientin, die die N193I-Mutation trägt. (B) Zeitabhängige Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub> in Fibroblasten (Kontrolle vs. Patientin). Die Datenpunkte stellen Triplikate einer Messung dar. (C) Berechnung der Verringerung der  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme, welche in (B) bestimmt wurde.

### 3.4. Die Wirkung von Tyrosinkinase Inhibitoren (TKIs) auf den MCT8-vermittelten Transport von Jodthyroninen

#### 3.4.1. Die Struktur der TKIs im Vergleich mit ATP, T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub>

TKIs wurden entwickelt, um die ATP-Bindungsstelle verschiedener Tyrosinkinasen zu blockieren und somit das Tumorwachstum zu hemmen. Die Strukturformel von ATP (Abb.3-14 A) zeigt ein Doppelringssystem bestehend aus Ribose und Adenin. Ähnliche Ringstrukturen wiederholen sich in der Struktur verschiedener TKIs (Abb.3-14 B). Jodthyronine wie T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> weisen ebenfalls Strukturvarianten eines Doppelringssystems auf (Abb.3-14 C). Dies führte zu der Hypothese einer möglichen Inhibition des MCT8-vermittelten Schilddrüsenhormontransports durch TKI-verursachte Blockierung der Substratbindungsstelle im MCT8-Protein.



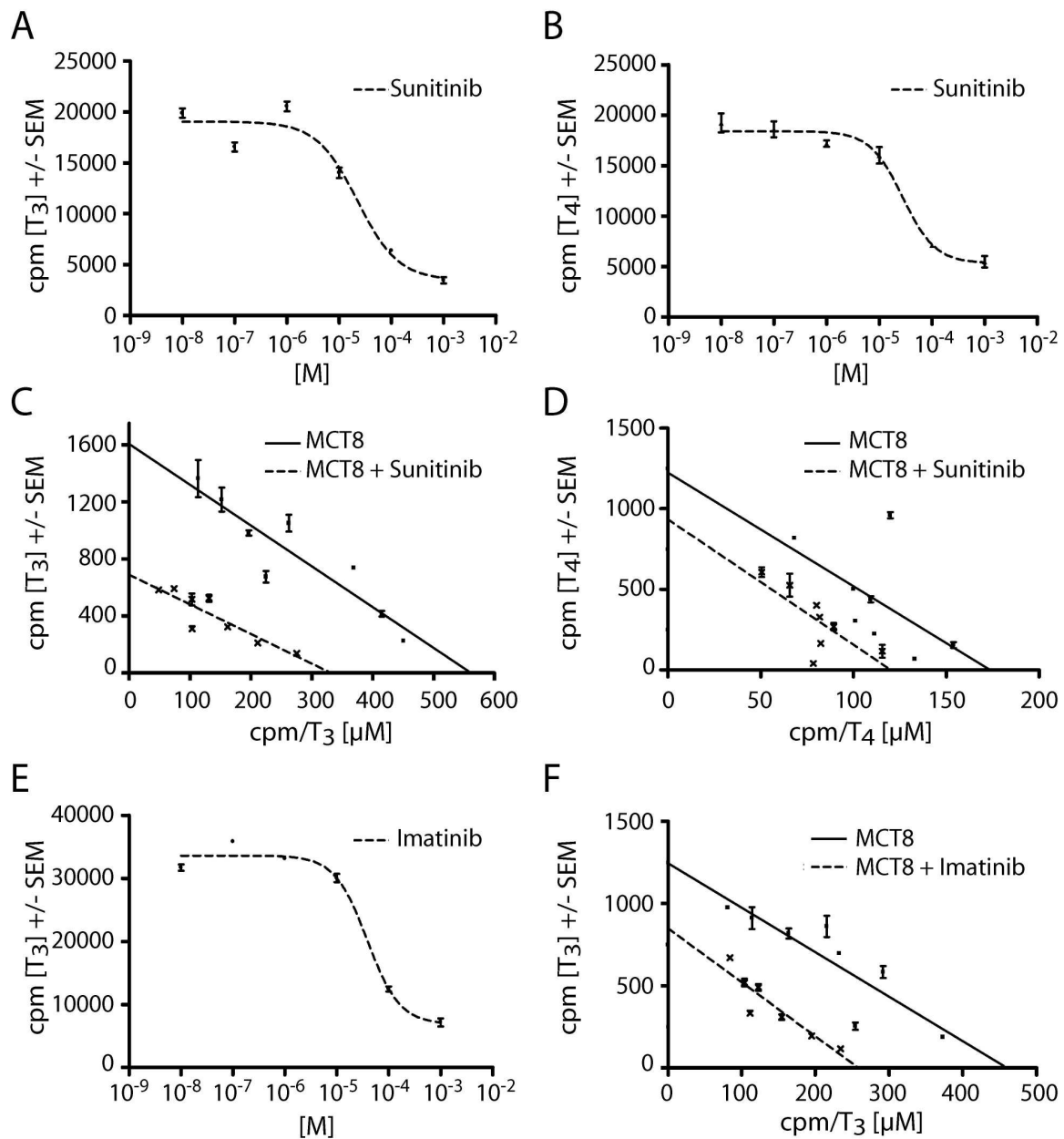
**Abbildung 3-14:** Vergleich der Strukturformeln von (A) ATP, (B) verschiedener TKIs und (C) der Jodthyronine T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub>. (Braun et al., 2012)

### 3.4.2. Inhibition des MCT8-vermittelten Jodthyronintransports durch TKIs der ersten Generation

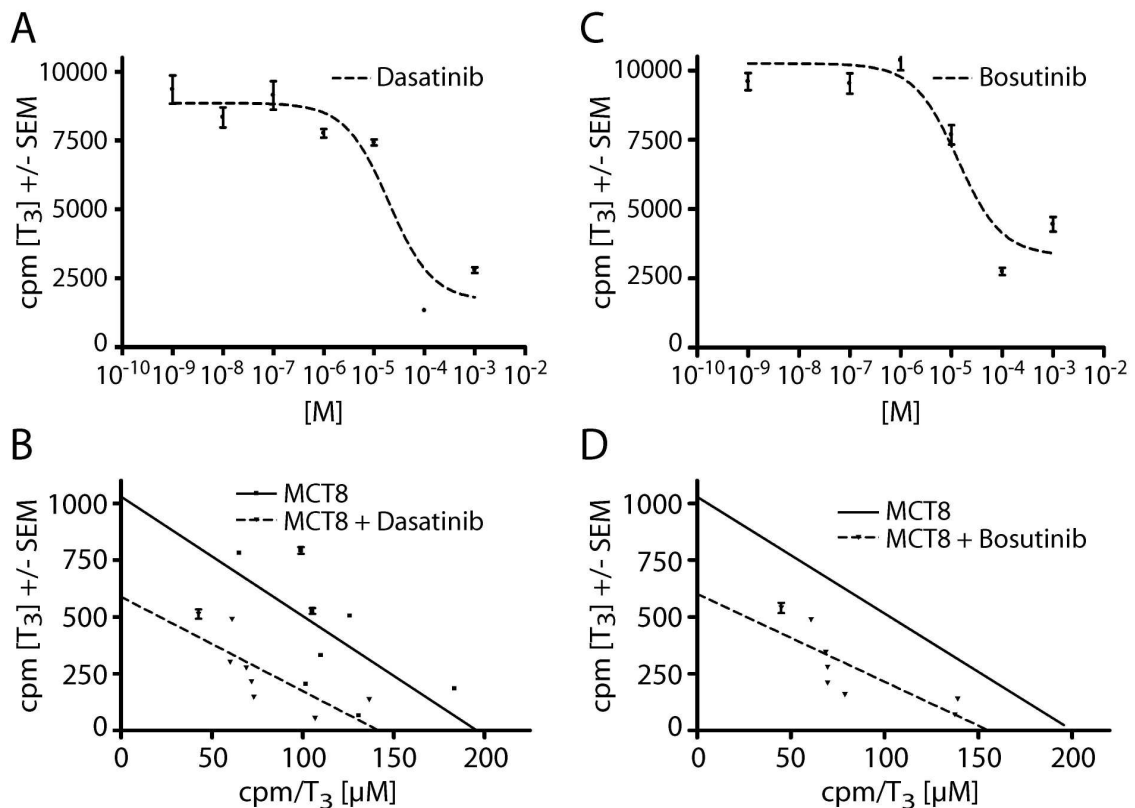
Die Untersuchung der Wirkung von Sunitinib und Imatinib erfolgte in dem unter Abschnitt 3.2.1. beschriebenen *in vitro* Zellkulturmodell. Die Inkubation von MCT8-exprimierenden MDCK-1 Zellen mit radioaktiv-markiertem T<sub>3</sub> bzw. T<sub>4</sub> in Gegenwart ansteigender Sunitinib-Konzentrationen führte zur Hemmung des Jodthyronintransports. Die Sunitinib-vermittelte Inhibition zeigte sich in einer sigmoidalen konzentrationsabhängigen Kurve mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 22 µM für T<sub>3</sub> (Abb.3-15 A) und 27 µM für T<sub>4</sub> (Abb.3-15 B). Der Modus der MCT8-Inhibition wurde durch die Titration von <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> bzw. <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> in Gegenwart von 7 µM Sunitinib ermittelt. Durch die grafische Darstellung der Daten in einem Eadie-Hofstee-Diagramm wurde eine Parallelverschiebung zweier Geraden sichtbar (Abb.3-15 C+D). Die Parallelverschiebung der Geraden in Gegenwart von Sunitinib steht für einen nicht-kompetitiven Modus der Inhibition. Anhand der Steigung der Geraden ließen sich die K<sub>m</sub>-Werte der Substrate bestimmen. Die ermittelten K<sub>m</sub>-Werte für T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> lagen bei 4 µM bzw. 8 µM und konnten somit frühere Resultate des gleichen Zellkulturmodells bestätigen (Kinne et al., 2009). Imatinib, ein weiterer TKI der ersten Generation, verhielt sich ähnlich wie Sunitinib. Der MCT8-vermittelte T<sub>3</sub>-Transport wurde durch ansteigende Imatinib-Konzentrationen mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 38 µM nicht-kompetitiv gehemmt (Abb.3-15 E+F).

### 3.4.3. Inhibition des MCT8-vermittelten Jodthyronintransports durch TKIs der zweiten Generation

Für Dasa- und Bosutinib konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie zuvor für Sunitinib- und Imatinib (Abb.3-15). Dasatinib führte zu einer nicht-kompetitiven Hemmung des MCT8-vermittelten T<sub>3</sub>-Transports mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 19 µM (Abb.3-16 A+B). Interessanterweise konnte auch bei der Verwendung von Bosutinib, einem TKI für den noch keine Nebenwirkungen hinsichtlich der Schilddrüsenfunktion beobachtet werden konnten, ein nicht-kompetitiv gehemmter T<sub>3</sub>-Transport mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 13 µM nachgewiesen werden (Abb.3-16 C+D).



**Abbildung 3-15:** TKIs der ersten Generation hemmen den MCT8-vermittelten Jodthyronintransport. (A + B) Sunitinib-Inhibition der (A)  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme ( $\text{IC}_{50} = 22 \mu\text{M}$ ) und der (B)  $^{125}\text{I}$ -T<sub>4</sub>-Aufnahme ( $\text{IC}_{50} = 27 \mu\text{M}$ ). MCT8 stabil-exprimierende MDCK-1 Zellen wurden mit radioaktiv-markiertem Tracer und einer ansteigenden Sunitinibkonzentration für einen Zeitraum von 3 min inkubiert. (C + D) Inkubation von MCT8 stabil-exprimierenden MDCK-1 Zellen mit einer ansteigenden Jodthyroninkonzentration (0,5 -12  $\mu\text{M}$ ) bei konstanter Sunitinibkonzentration (7  $\mu\text{M}$ ) für einen Zeitraum von 3 min. Das Eadie-Hofstee-Diagramm der (C)  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme und der (D)  $^{125}\text{I}$ -T<sub>4</sub>-Aufnahme in Gegenwart von Sunitinib offenbarte einen nicht-kompetitiven Modus der Inhibition. (E) Imatinib-Inhibition der  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme ( $\text{IC}_{50} = 38 \mu\text{M}$ ). (F) Eadie-Hofstee-Diagramm der  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme in Gegenwart von 21  $\mu\text{M}$  Imatinib offenbarte einen nicht-kompetitiven Modus der Inhibition. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie für Sunitinib. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten. (Braun et al., 2012)

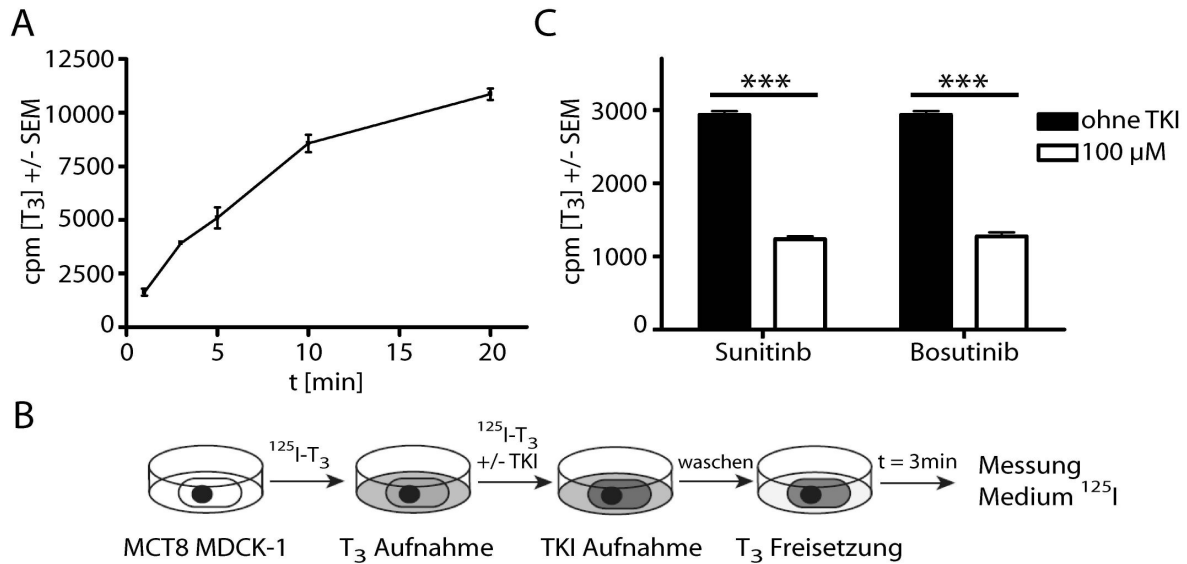


**Abbildung 3-16:** TKIs der zweiten Generation hemmen den MCT8-vermittelten Jodthyronintransport. (A) Dasatinib-Inhibition der  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme (IC<sub>50</sub> = 19 μM). MCT8 stabil-exprimierende MDCK-1 Zellen wurden mit radioaktiv-markiertem Tracer und einer ansteigenden Dasatinibkonzentration für einen Zeitraum von 3 min inkubiert. (B) Inkubation von MCT8 stabil-exprimierenden MDCK-1 Zellen mit einer ansteigenden Jodthyroninkonzentration (0,5 -12 μM) bei konstanter Dasatinibkonzentration (19 μM) für einen Zeitraum von 3 min. Das Eadie-Hofstee-Diagramm der  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme in Gegenwart von Dasatinib offenbarte einen nicht-kompetitiven Modus der Inhibition. (C) Bosutinib-Inhibition der  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme (IC<sub>50</sub> = 13 μM). (D) Eadie-Hofstee-Diagramm der  $^{125}\text{I}$ -T<sub>3</sub>-Aufnahme in Gegenwart von 13 μM Bosutinib offenbarte einen nicht-kompetitiven Modus der Inhibition. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie für Dasatinib. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten. (Braun et al., 2012)

#### 3.4.4. Inhibition des MCT8-vermittelten Efflux durch TKIs der ersten und zweiten Generation

MCT8 kann Schilddrüsenhormone sowohl in eine Zelle hinein (Influx) als auch aus einer Zelle heraus (Efflux) transportieren (Abb.3-17 A). Zur Untersuchung etwaiger Beeinträchtigungen des Effluxs wurden MCT8-exprimierende MDCK-1 Zellen mit radioaktiv-markiertem T<sub>3</sub> beladen, danach mit 100 μM Suni- bzw. Bosutinib inkubiert

und letztendlich die Freisetzung von  $^{125}\text{I-T}_3$  über einen Zeitraum von 3 min gemessen (Abb.3-17 B). Sowohl Sunitinib als auch Bosutinib konnten die  $\text{T}_3$ -Freisetzung signifikant reduzieren (Abb.3-17 C).



**Abbildung 3-17:** (A) Zeitabhängiger  $^{125}\text{I-T}_3$ -Efflux MCT8-exprimierender MDCK-1 Zellen. Die Freisetzung von radioaktiv-markiertem  $\text{T}_3$  war für die ersten 5 min linear. Die Messung erfolgte in einer Sechsfach-Bestimmung. (B) Durchführung des Experiments: Inkubation MCT8-exprimierender MDCK-1 Zellen mit radioaktiv-markiertem  $\text{T}_3$  für 30 min. Inkubation der Zellen für weitere 15 min mit  $^{125}\text{I-T}_3$  plus 100  $\mu\text{M}$  eines TKIs. Waschen der Zellen und Messung der  $\text{T}_3$ -Freisetzung im Medium. (C) Der  $^{125}\text{I-T}_3$ -Efflux in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Sunitinib bzw. Bosutinib war signifikant reduziert. Statistische Analyse: t-Test, ungepaart, zweiseitig mit \*\*\*P < 0,001. (Braun et al., 2012)

## 4. Diskussion

### 4.1. Der L-Typ Aminosäuretransporter 2 als möglicher kompensierender T<sub>3</sub>-Transporter bei Mct8-Defizienz in Mäusen

Schilddrüsenhormontransporter sind essentiell um die bei physiologischen pH-Wert geladenen Schilddrüsenhormone über Zellmembranen zu transportieren. Im Gehirn sind Schilddrüsenhormontransporter dafür verantwortlich, den Transport von Schilddrüsenhormonen über die Bluthirnschranke zu vermitteln bzw. die Aufnahme der Hormone in die verschiedenen Zelltypen des Gehirns zu vereinfachen. Dass die Abwesenheit eines Transporters verheerende Auswirkungen haben kann, zeigt sich im Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS). AHDS wird u.a. durch mentale Retardierung, anormale Schilddrüsenhormonwerte sowie Muskelhypotonie charakterisiert. Der Krankheit liegen inaktivierende Mutationen des Monocarboxylattransporter 8 zugrunde, die zu einer Unterversorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen während der embryonalen Entwicklung führen. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass die verringerte Expression eines weiteren Mitglieds der Monocarboxylattransporter-Familie im Gehirn, des Lactattransporters MCT1 (SLC16A1), vermutlich eine Ursache für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist, einer degenerativen Erkrankung von motorischen Neuronen (Lee et al., 2012). Beide Beispiele unterstreichen somit die Wichtigkeit von Transportmolekülen für die Entwicklung bzw. den Metabolismus verschiedener Zellen des Gehirns.

Im Unterschied zur kongenitalen Hypothyreose bezieht sich die Unterversorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen bei AHDS-Patienten nur auf die Zelltypen, die T<sub>3</sub> ausschließlich MCT8-abhängig transportieren. So ist die Entwicklung des Kleinhirns wie z.B. die Reifung der Purkinje Zellen und die Verzweigung von Dendriten bei MCT8-Defizienz nicht gestört (Trajkovic et al., 2007; Morte et al., 2010), die schilddrüsenhormonabhängige Myelinisierung durch Oligodendrozyten hingegen verzögert (Holden et al., 2005; Namba et al., 2008). Die Expression von Mct8 konnte bereits in Oligodendrozyten der Ratte nachgewiesen werden (Braun et al., 2011a).

Interessanterweise offenbaren *Slc16a2*-defiziente Mäuse keine erkennbaren neurologischen Defekte, obwohl die T<sub>3</sub>-Aufnahme in kortikale Neurone signifikant reduziert ist, allerdings nicht vollständig zum Erliegen kommt (Wirth et al., 2009).

Pharmakologische Studien ergaben, dass die verbleibende Transportaktivität BCH-sensitiv ist (Wirth et al., 2009), ein Hinweis auf die Koexpression von Mct8 mit Transportern des Systems L wie z.B. Lat2. Anders als der Mensch exprimieren Mäuse bereits im Embryonalstadium Mct8 und Lat2 in Pyramidenzellen, bei Menschen setzt die LAT2-Expression hingegen erst nach der Geburt ein (Wirth et al., 2009). Lat2 könnte demnach den Verlust der Mct8-Aktivität in Mäusen kompensieren, zumal die Koexpression beider Transporter sowohl in primären Neuronen (Braun et al., 2011a) als auch in primären Astrozyten der Maus nachgewiesen werden konnte (Abb.3-3 E). Zur Untersuchung der Bedeutung von Lat2 für den Schilddrüsenhormonmetabolismus sowie seiner Rolle als möglicher kompensierender Transporter in *Slc16a2*-defizienten Mäusen (Abschnitt 1.3.1.2.) wurden *Slc7a8*-defiziente Mäuse generiert, deren Phänotyp überraschenderweise sehr mild ausfiel.

#### 4.1.1. Lat2 als Aminosäuretransporter

##### *Lat2 in Niere, Dünndarm und Plazenta*

Lat2 als Aminosäuretransporter wird hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert wie z.B. in Zellen des Proximalen Tubulus der Niere, im Dünndarm und in der Plazenta. Dort übernimmt der Transporter die Aufgabe Aminosäuren zu (re-)absorbieren. Mutationen ähnlicher Aminosäuretransporter wie z.B. *Slc7a9* und *Slc7a7* führen bei Mäusen zu einer vermehrten Ausscheidung von Aminosäuren über den Urin, Cystinurie (Feliubadalo et al., 2003) bzw. LPI (Sperandeo et al., 2007) genannt. Auch in *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine Aminoazidurie nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde allerdings nur ein Teil des Lat2-Substratspektrums vermehrt über die Niere ausgeschieden, einige neutrale Aminosäuren sowie die aromatischen Aminosäuren waren nicht betroffen (Abb.3-2 B). So scheint der Transport von neutralen Aminosäuren durch alternative Transporter kompensiert zu werden. Die Aufgabe des Transports aromatischer Aminosäuren wird möglicherweise durch Mct10 (*Slc16a10*) übernommen, dessen Expression in der Niere *Slc7a8*-defizienter Mäuse leicht erhöht war (Abb.3-2 C).

Lat2 ist wie viele andere Aminosäuretransporter ein Antiporter (Broer, 2008). Durch die Inaktivierung von Lat2 und den Verlust von Aminosäuren über den Urin, gehen Kosubstrate anderer Transporter verloren. *Slc7a7* (ebenfalls ein Antiporter) transportiert neben den geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin auch die neutrale



Aminosäure Leucin (Broer, 2008). Der Verlust von Leucin über den Urin *Slc7a8*-defizienter Mäuse könnte demnach Auswirkungen auf den Lysinhaushalt haben und die erhöhte Lysinkonzentration im Serum *Slc7a8*-defizienter Mäuse erklären.

Die intestinale Absorption von Aminosäuren in *Slc7a8*-defizienten Mäusen ist vermutlich nicht gestört, da keine Veränderungen hinsichtlich Körpergewicht und Körperlänge festgestellt werden konnten (Abb.3-1 C). Auch der Transport von Aminosäuren über die Plazenta scheint nicht vermindert zu sein, da die Nachkommen heterozygoter *Slc7a8*-Zuchtpaare keine Abweichungen in der Mendelschen Verteilung der Genotypen aufweisen sowie *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Nachkommen ein normales Wachstum zeigen. Der Funktionsverlust von Lat2 in Plazenta und Dünndarm wird demnach von anderen Transportern kompensiert.

#### *Lat2 im Gehirn*

Die Wichtigkeit des Transporters für das Gehirn ist beim Blick auf die Lat2-Expressionsspiegel unverkennbar (Abb.3-1 D+F). Es wird angenommen, dass astrozytäres Lat2 für die Alaninaufnahme verantwortlich ist (Broer et al., 2007). Alanin wird als Ammoniumquelle für den zerebralen Glutamin/Glutamat-Zyklus gehandelt (Broer et al., 2007): Von exzitatorischen Neuronen in den synaptischen Spalt ausgeschiedenes Glutamat wird durch Astrozyten aufgenommen und dort mithilfe von Alanin als Ammoniumquelle in Glutamin umgewandelt. Nach dem Transport des Glutamins zurück in das Neuron wird die Aminosäure mithilfe der Glutaminase in Glutamat umgewandelt, welches in den synaptischen Spalt freigesetzt wird und als Neurotransmitter wirken kann (Edwards, 2007). Die Inaktivierung von Lat2 könnte demnach den Glutamin/Glutamat-Zyklus verlangsamen, indem die Konzentration an Alanin im Astrozyten durch einen verringerten Import vermindert wird. Möglicherweise liegt hier die Ursache für die verlangsamten Bewegungen von *Slc7a8*-defizienten Mäusen. Dieser Aspekt wurde allerdings nicht weiter untersucht und würde weitere detaillierte elektrophysiologische Untersuchungen erfordern.

#### 4.1.2. Lat2 als Schilddrüsenhormontransporter

##### *Lat2 im Astrozyten*

Lat2 transportiert Schilddrüsenhormone sowohl *in vitro* (Ritchie et al., 1999; Friesema et al., 2001; Braun et al., 2010) als auch *ex vivo* (Abb.3-3 A-D). Die Vermutung, dass

ein BCH-sensitives Transportsystem an der Schilddrüsenhormonaufnahme durch Astrozyten beteiligt ist, konnte bereits zu einem früheren Zeitpunkt bestätigt werden (Blondeau et al., 1993). Ein genetischer Beweis zeigte sich in der signifikant reduzierten Aufnahme von  $T_3$  in primäre *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Astrozyten (Abb.3-3 D). Die gleichzeitige Inkubation von Wildtyp-Astrozyten zusammen mit  $T_3$  und BCH verminderte ebenfalls die Aufnahme des Schilddrüsenhormons (Abb.3-3 C). Die Aufnahme sank auf ein Niveau, das zuvor in *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Astrozyten gefunden wurde. In beiden Transportstudien wurde die Aufnahme von  $T_3$  allerdings nicht vollständig gehemmt. Mct8 als spezifischer  $T_3$ -Transporter wird ebenfalls in Astrozyten exprimiert und trägt somit zur Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in Astrozyten bei, ein Vorgang, der durch BSP einen bekannten Mct8-Inhibitor, gehemmt werden konnte. BSP und BCH führten in *Slc16a2*<sup>-/-</sup>-Astrozyten ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion aber keiner vollständigen Hemmung der  $T_3$ -Aufnahme (Abb.3-3 F). Das ist ein Indiz dafür, dass neben Mct8 und Lat2 noch weitere Transporter an der Aufnahme von  $T_3$  in Astrozyten beteiligt sein könnten oder aber einfach die Konzentration an Inhibitor nicht ausreichte, um eine komplette Inhibition herbeizuführen.

Die ermittelten  $K_m$ -Werte für den Schilddrüsenhormontransport in Astrozyten lagen bei 4,2  $\mu\text{M}$  für  $T_3$  und 3,7  $\mu\text{M}$  für  $T_4$ . Aufgrund der Expression mehrerer Transporter in diesem Zelltyp setzen sich die  $K_m$ -Werte aus mehreren Systemen zusammen. Es wurde beschrieben, dass der  $K_m$ -Wert von MCT8 zwischen 4 - 8  $\mu\text{M}$  liegt (Friesema et al., 2001). LAT2 hingegen zeigte eine höhere Affinität mit  $K_m$ -Werten zwischen 0,5 - 2  $\mu\text{M}$  (Ritchie et al., 1999; Friesema et al., 2001). Die ermittelten  $K_m$ -Werte lagen demnach genau zwischen den Werten, die in der Literatur angegeben sind.

Die vorrangige Aufgabe eines Astrozyten ist laut Modell (Abschnitt 1.3.3.) weniger die Aufnahme von  $T_3$  als vielmehr die Aufnahme von  $T_4$ .  $T_4$  wird durch die Aktivität der Dio2 in  $T_3$  umgewandelt und den Neuronen zur Verfügung gestellt. Die Transportmechanismen, die *in vivo* für den Export von  $T_3$  aus dem Astrozyten verantwortlich sind, sind noch nicht bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass MCT8 sowohl als Importer als auch als Exporter fungieren kann (Abb.3-17 A) (Visser et al., 2008). Genauso ist Lat2 als *Exchanger* bekannt (Pineda et al., 1999). Beide Moleküle könnten demnach sowohl den  $T_4$ -Import steuern als auch die Aufgabe des Exports von  $T_3$  übernehmen.

### *Lat2 und die Schilddrüsenhormonachse*

*Mct8*-defiziente Mäuse zeigen erhöhte  $T_3$ - und verringerte  $T_4$ -Spiegel im Plasma (Dumitrescu et al., 2006; Trajkovic et al., 2007). Da Lat2 neben Aminosäuren auch Schilddrüsenhormone transportieren kann, wurden die zirkulierenden Schilddrüsenhormonwerte untersucht. Beide Transporter sind sowohl in der Niere, dem Gehirn und der Hypophyse exprimiert (Abb.3-1 D+F). Die Feststellung unveränderter  $T_3$ -,  $T_4$ - und TSH-Werte in *Slc7a8*<sup>-/-</sup>-Mäusen ließ darauf schließen (Abb.3-4), dass die Zellen, die für die Regulation der Schilddrüsenhormonachse verantwortlich sind, mehr auf *Mct8* und weniger auf Lat2 angewiesen sind. Ob neben Aminosäuren auch Schilddrüsenhormone vermehrt über den Urin ausgeschieden werden, muss an dieser Stelle offenbleiben. Untersuchungen des 24 h-Urins *Slc7a8*-defizienter Mäuse und ihrer Wildtypkontrollen via LC-MS/MS brachten keine verwertbaren Ergebnisse. Das  $T_4$ -Signal lag nur knapp oberhalb des Hintergrundsignals, so dass keine Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt werden konnten. Allerdings fanden sich keine Veränderungen in der renalen Dio1-Aktivität (Abb.3-5 B), was auf einen unveränderten Schilddrüsenhormongehalt in der Niere schließen lässt.

### *Lat2 als kompensierender Transporter*

*Mct8* ist nicht nur mit Lat2 im Gehirn kolokalisiert (Abb.3-1 F), auch andere Schilddrüsenhormontransporter wie *Mct10* oder *Oatp1c1* kommen für die Aufgabe der Kompensation in Frage.

*Mct10* als Mitglied der Monocarboxylattransporter-Familie wurde zuerst als Tryptophantransporter charakterisiert bevor der Transport von  $T_3$  durch diesen Transporter nachgewiesen werden konnte (Kim et al., 2001; Visser et al., 2011). Die mRNA von *Mct10* konnte zwar im murinen Gehirn detektiert werden, ist dort aber weit weniger stark exprimiert als beispielsweise in Dünndarm oder Niere (Ramadan et al., 2006). Auch im humanen Gehirn konnte der Transporter nachgewiesen werden (Alkemade et al., 2011; Chan et al., 2011; Friesema et al., 2012): *MCT10* mRNA konnte in undifferenzierten ZNS-Zellen und frühen Neuronen sowie der humanen pluripotenten embryonalen Vorläuferzelllinie NT2 (Differenzierung zu Neuronen) in Kolokalisation mit *MCT8* detektiert werden (Chan et al., 2011). Somit scheidet *MCT10* als potentieller Kandidat zur Kompensation bei *MCT8*-Mutation aus, da dieser Transporter zwar exprimiert wird aber die Ausbildung von AHDS nicht verhindern kann.

Das Gehirn *Slc16a2*-defizienter Mäuse weist einen hypothyreoten Zustand auf. Der  $T_3$ -Gehalt des Gehirns ist signifikant reduziert (Dumitrescu et al., 2004; Trajkovic et al., 2007), wohingegen die  $T_4$ -Aufnahme nicht gestört ist. Die Aktivität der Dejodase 2 wird hochreguliert, wodurch vermehrt  $T_4$  zu  $T_3$  umgewandelt und somit dem hypothyreoten Zustand entgegengewirkt wird (Dumitrescu et al., 2006). Die Aufnahme von  $T_3$  und  $T_4$  in das Gehirn wird begrenzt durch die Expression von Schilddrüsenhormontransportern an der Bluthirnschranke. Roberts et al. (2008) konnten die Kolo-kalisation des  $T_4$ -Transporters *Oatp1c1* (*Slco1c1*) zusammen mit *Mct8* in den Endothelzellen der Bluthirnschranke des Nagerhirns nachweisen. Untersuchungen zur Expression zeigten, dass *Oatp1c1* in Nagern bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Trächtigkeit detektiert werden kann, wohingegen man *OATP1C1* im humanen Gehirn erst in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft findet (Chan et al., 2011) und im Affen gar nicht nachweisen kann (Ito et al., 2011). *Oatp1c1* könnte demnach dafür verantwortlich sein, dass der Transport von  $T_4$  in das murine, *Slc16a2*-defiziente Gehirn während sensibler Phasen der Entwicklung gewährleistet bleibt, eine mögliche Kompensation, die im humanen Gehirn durch die fehlende *OATP1C1*-Expression ausbleibt und letztendlich zur mentalen Retardierung führen könnte. Dagegen spricht die Expression weiterer Mitglieder der *OATP*-Familie an der Bluthirnschranke, die Schilddrüsenhormone transportieren können (Gao et al., 2000; Fujiwara et al., 2001; Bronger et al., 2005; Lee et al., 2005; Hagenbuch, 2007).

Das Gehirn *Oatp1c1*-defizienter Mäuse konnte wie das Gehirn *Slc16a2*-defizienter Mäuse als hypothyreot charakterisiert werden. Es zeichnet sich durch verringerte  $T_3$ - und  $T_4$ -Werte sowie eine erhöhte *Dio2*- und eine verminderte *Dio3*-Aktivität aus (Mayerl et al., 2012). Das Fehlen von *Oatp1c1* an der Bluthirnschranke führte zu einer verminderten  $T_4$ -Aufnahme, die aber überraschenderweise scheinbar nicht durch *Mct8*, einem Transporter, der sowohl  $T_3$  als auch  $T_4$  transportieren kann, kompensiert wird (Mayerl et al., 2012). Die Inaktivierung beider Transporter führte in der *Slc16a2/Oatp1c1*-doppelt-defizienten Maus zu einem ernsteren Phänotyp als es für die einfach-defizienten Mäuse beschrieben wurde, da im Gehirn dieser Mäuse sowohl der  $T_3$ - als auch der  $T_4$ -Gehalt signifikant reduziert war (Mayerl et al., 2012, *American Thyroid Association* Konferenz, Quebec City, Kanada, Thyroid 22 Suppl1: A6-128). Das stark hypothyreote Gehirn weist eine gestörte Differenzierung inhibitorischer Neurone des cerebralen Kortex auf sowie einen Myelinisierungsdefekt, der mit zunehmendem Alter allerdings verschwindet. Verhaltensstudien zeigten außerdem, dass die doppelt-defizienten Mäuse Defizite in der Bewegungs-

koordination aufweisen. Da diese Ergebnisse Symptome der humanen MCT8-Defizienz widerspiegeln, könnte die *Slc16a2/Oatp1c1*-doppelt-defiziente Maus als Tiermodell zur Untersuchung der Krankheit herangezogen werden.

Ein weiterer Angriffspunkt für eine mögliche Kompensation findet sich in der Kolo-kalisation von Mct8 und Lat2 in murinen Neuronen und Astrozyten (Braun et al., 2011a). Die Hypothese von Lat2 als potentiell kompensierender Transporter wurde aufgestellt, nachdem gezeigt werden konnte, dass die verbliebene Transportaktivität in *Slc16a2*-defizienten Neuronen BCH-sensitiv ist und LAT2 im humanen embryonalen Gehirn nicht nachgewiesen werden konnte (Wirth et al., 2009). Um eine mögliche Kompensation zu untersuchen, wurde das Gehirn *Slc7a8*-defizienter Mäuse untersucht.

Die gewebeabhängige Aktivierung T<sub>3</sub>-responsiver Gene des Gehirns ist in *Slc7a8*-defizienten Mäusen nicht verändert (Abb.3-6 B-D; Abb.3-7 A-C). Zusammen mit den unveränderten Schilddrüsenhormonspiegeln spricht das für eine normale Entwicklung des Groß- und Kleinhirns. Tatsächlich zeigen *Slc7a8*-defiziente Tiere eine leichte Beeinträchtigung in der Bewegungskoordination, was aber weder mit einer veränderten Morphologie des Gehirns (Abb.3-7 E-H) noch mit Veränderungen des Schilddrüsenhormonmetabolismus erklärt werden konnte (Abb.3-5). Möglicherweise sind Veränderungen im Metabolismus von Neurotransmittern wie Glutamat beteiligt (s.o.). Eine weitere Erklärung wäre eine gegenseitige Kompensation hinsichtlich des Schilddrüsenhormontransports. Zum einen könnte Lat2 den Funktionsausfall von Mct8 in *Mct8*-defizienten Mäusen ausgleichen, was den milden neurologischen Phänotyp dieser Tiere im Vergleich zu AHDS-Patienten erklären würde, zum anderen gleicht Mct8 möglicherweise die Lat2-Inaktivierung aus. Genaue Erklärungen hinsichtlich dieser Hypothese kompensierender Transporter im Gehirn können allerdings erst bei einer gleichzeitigen Inaktivierung beider Transporter geliefert werden. Die anfängliche Zucht doppelt-defizienter *Slc7a8/Slc16a2*-Tiere ergab drei Individuen, die in ihrer Bewegungskoordination eingeschränkt bzw. verlangsamt waren. Die Ausschaltung beider Transporter führte demnach nicht zu einer embryonalen Letalität. Dennoch konnten aus ungeklärten Gründen keine weiteren doppelt-defizienten Tiere generiert und untersucht werden. Ein neuer Versuchsansatz beschäftigt sich daher mit der Untersuchung konditioneller Mäuse, bei denen zelltypspezifisch (entweder in Astrozyten oder Neuronen) das *Slc16a2*-Gen ausgeschaltet wird. Eva K. Wirth und Kollegen planen damit die Komplexität des

Gehirns zu reduzieren, die mögliche Rolle von Mct8 an der Bluthirnschranke zu untersuchen und mögliche Interaktionen zwischen Astrozyten und Neuronen aufzudecken.

## 4.2. Identifizierung von Aminosäuren in der MCT8-Sequenz, die am Substrattransport beteiligt sind

Neben der Hypothese kompensierender Transporter zum Ausgleich der Mct8-Defizienz in Mäusen gibt es die Hypothese eines bis jetzt noch nicht identifizierten MCT8-Substrats, dessen Abwesenheit beim Menschen zur Ausbildung von AHDS führt. Um einen Einblick in die Wirkungsweise eines Transporters zu erhalten und/oder mögliche Bindungsstellen zu identifizieren, ist die Kristallstruktur des Proteins unabdingbar. Die 3-dimensionale MCT8-Struktur konnte bis jetzt noch nicht gelöst werden, allerdings ermöglichte die Entwicklung eines MCT8-Homologiemodells, biochemische Eigenschaften des Transporters genauer zu untersuchen sowie bereits bestehende Daten zu interpretieren (Kinne et al., 2010; Kleinau et al., 2011). Das MCT8-Homologiemodell basiert auf der bereits gelösten Struktur des bakteriellen Glycerol-3-Phosphattransporters (GlpT) (Huang et al., 2003). Sowohl MCT8 als auch GlpT gehören der *Major Facilitator* Superfamilie (MFS) an, weisen allerdings nur geringe Sequenzübereinstimmungen (25,5%) auf. Nichtsdestotrotz diente der GlpT bereits als Vorlage zur Entwicklung weiterer Homologiemodelle wie Oatp1c1 (Ratte; T<sub>4</sub>-Transporter) und Mct1 (Ratte; Lactattransporter) (Manoharan et al., 2006; Westholm et al., 2010).

Mithilfe des MCT8-Homologiemodells konnten geladene Aminosäuren im Transmembranbereich identifiziert werden, die am T<sub>3</sub>-Transport beteiligt sind (Kinne et al., 2010). Des Weiteren zeigte sich, dass viele pathogene MCT8-Mutationen, um den potentiellen Substrattransportkanal herum angeordnet sind (Kleinau et al., 2011).

Die Analyse der liganden-bindenden Domäne des T<sub>3</sub>-Rezeptors führte schließlich zur Identifizierung von His-Arg-Paarungen, die potentiell an der Bindung des T<sub>3</sub> durch Interaktion mit dem Phenolrest bzw. der Carboxylgruppe beteiligt sein könnten. Ähnliche His-Arg-Paarungen offenbarte das MCT8-Homologiemodell mit den Paaren His192 - Arg445 und His415 - Arg301 (Kleinau et al., 2011). Die Wichtigkeit der Aminosäuren an den Positionen His192 und Arg445 für die Aktivität, zeigte sich

bereits durch die pathogenen Mutationen H192R und R445C, die in AHDS-Patienten gefunden wurden (Friesema et al., 2010). Arg445 bildet wahrscheinlich mit der Aminosäure Asp498 eine Salzbrücke. Die Mutation beider Aminosäuren zu Alanin führte entsprechend zur Transportinaktivität (Kinne et al., 2010). Eine Salzbrücke an ähnlicher Stelle ist mit Asp302 und Arg306 auch in Mct1 beschrieben (Manoharan et al., 2006). Pathogene Mutationen an den Positionen His415 bzw. Arg301 sind bis jetzt noch nicht bekannt, nichtsdestotrotz wurden diese Positionen untersucht, da sie eine ähnliche Geometrie aufweisen wie die His-Arg-Paarung des  $T_3$ -Rezeptors (Kleinau et al., 2011).

### *His415*

Histidine besitzen aufgrund ihrer chemischen Struktur die Fähigkeit, mit Jodthyroninen sowohl polare Wasserstoffbrückenbindungen als auch hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen einzugehen. Zur Untersuchung der Frage, welche Interaktionen notwendig sind, um das Substrat zu transportieren, wurden verschiedene Mutationen in die MCT8-Sequenz eingeführt.

Die verschiedenen Mutationen des Histidins415 hatten keine Auswirkungen auf die Expression des jeweiligen Proteins an der Zelloberfläche, verringerten den  $T_3$ -Transport allerdings deutlich (Abb.3-10). Eine 90%ige Hemmung zeigte sich bei H415A, da die Struktur des Alanins sowohl die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen als auch von Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Substrat verhinderte. H415F und H415Q hingegen verringerten den Transport zwar jeweils um mehr als die Hälfte, die Mutationen führten allerdings nicht zu einer kompletten Inhibition des Transports. Die Verringerung des  $K_m$ -Wertes der Phenylalanin-Mutante wies auf einen veränderten Modus der Substratbindung hin. Der  $K_m$ -Wert von H415Q unterschied sich nicht signifikant vom Wildtyp. Die Vermutung, dass an Position 415 sowohl polare Wasserstoffbrückenbindungen als auch hydrophobe Van-der-Waals Wechselwirkungen von Bedeutung sind, konnte somit bestätigt werden. Dieses Erkenntnis war überraschend, da Histidin415 zuvor noch nicht mit dem Transport von  $T_3$  in Verbindung gebracht werden konnte.

Einen Hinweis auf die Wichtigkeit der Aminosäure fand sich allerdings in der Mutation der korrespondierenden Aminosäure Phenylalanin360 des Monocarboxylattransporters 1 (Mct1). Die Mutation von Phe360 zu Cystein führte zu einer veränderten Substratspezifität, bei der der Transporter den Transport von Lactat und Pyruvat einstellte und den Transport von Mevalonat aufnahm (Garcia et al., 1994).

### *Arg301*

Der wahrscheinlichste Partner des Histidins<sup>415</sup> in einer His-Arg-Paarung ist Arginin<sup>301</sup>. Die Mutation von Arginin<sup>301</sup> zu Lysin hatte keine Auswirkungen auf die Expression des Proteins an der Zelloberfläche (Abb.3-11 A). Die Expression von R301A hingegen war in MDCK-1 Zellen gar nicht und in *Xenopus* Oozyten nur schwach nachweisbar (Abb.3-11 A+D). Arginin ist im Gegensatz zu Alanin eine geladene, hydrophile Aminosäure. Das Fehlen beider Eigenschaften scheint zu Störungen in der Proteinstruktur und schneller Proteindegradierung zu führen. Anders verhält es sich bei der Mutation von Arginin<sup>301</sup> zu Lysin. Hier wurde eine positiv geladene Aminosäure gegen eine Aminosäure ausgetauscht, die ähnliche Eigenschaften mit Arginin teilt. Sequenzvergleiche zwischen den verschiedenen Mitgliedern der MCT-Familie ergaben, dass die Positionen 300 und 301 stark konserviert sind (Kleinau et al., 2011). An diesen Positionen findet man entweder Arginine oder Lysine.

Transportstudien zeigten, dass die positive Ladung der Aminosäureseitenkette an Position 301 essentiell für den Substrattransport ist (Abb.3-11 B+C). Wie durch die verminderte Proteinexpression zu erwarten war, war der Substrattransport durch R301A verringert, wohingegen R301K kaum Unterschiede zu MCT8 aufwies. Rückblickend wären wahrscheinlich die Mutationen von Arg<sup>301</sup> zu Glutamin bzw. Glutamat aufschlussreich gewesen. Beide Aminosäuren weisen ähnliche Struktureigenschaften wie Arginin auf (hinsichtlich der Ausbildung potentieller Wasserstoffbrücken), allerdings fehlt beiden Aminosäuren die positive Ladung.

Arg<sup>301</sup> ist Bestandteil der Transmembranhelix 5 und in der *inside-open* Konformation des MCT8-Homologiemodells so positioniert, dass es entlang des Transportkanal liegt. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Arg<sup>301</sup> mit den geladenen Jodthyroninen könnte es womöglich zu einer Konformationsänderung kommen aufgrund derer sich der Kanal zum Extrazellularraum hin öffnet. Ein ähnliches Prinzip deutet das Homologiemodell des protonenabhängigen Lactattransporters Mct1 an (Halestrap, 2012; Meredith and Christian, 2008). Der vermutete Transportmechanismus beinhaltet den Wechsel zwischen zwei Konformationen. Die geöffnete Konformation exponiert die Substratbindungsstelle dem Extrazellularraum (*outside-open*), in der geschlossenen Konformation hingegen wird die Substratbindungsstelle dem Intrazellularraum offenbart (*inside-open*). Lysin<sup>38</sup> ist eine Aminosäure der Transmembranhelix 1 und befindet sich in der *outside-open* Konformation in einer hydrophoben Tasche am Ende des vermuteten



Kanals. Lys38 interagiert sowohl mit einem Proton als auch dem Substrat (Halestrap, 2012). Die Protonierung von Lys38 und die Interaktion von Lactat mit weiteren Aminosäureresten führt zum Wechsel der Konformation in die geschlossene Form. Durch die Freisetzung des Substrats und die Deprotonierung von Lys38 wechselt der Transporter wieder in die geöffnete Konformation (*rocker-switch* Modell) (Halestrap, 2012).

Da der MCT8-vermittelte Transport von Jodthyroninen allerdings pH-unabhängig ist, ist eine Interaktion von MCT8 mit Protonen für den Transport nicht notwendig. Auch ist die Positionierung von Arg301 in MCT8 und Lys38 in Mct1 unterschiedlich. Die Aminosäuren verschließen jeweils in der gegensätzlichen Konformation den Transportkanal (Arg301 - *inside-open*; Lys38 - *outside-open*). Nichtsdestotrotz ist die Beteiligung von Arg301 am *rocker-switch* Modell nicht ausgeschlossen, da hier womöglich ein ähnlicher Mechanismus wie in Mct1 verfolgt wird.

### *His192*

Histidin192 ist zwischen den unterschiedlichen Mct8-Spezies aber nicht zwischen den verschiedenen Mitgliedern der MCT-Familie konserviert (Kleinau et al., 2011). Der Glycerol-3-Phosphattransporter weist an der korrespondierenden Position ein Arginin auf (Arg45), deren Bedeutung für die Substratbindung bereits nachgewiesen werden konnte. Arg45 im GlpT ist für die Bindung von Phosphatresten (freies Phosphat bzw. der Phosphatrest des Glycerol-3-Phosphats) verantwortlich (Lemieux et al., 2004). Die pathogene H192R-Mutation ist ein weiterer Hinweis für die Wichtigkeit dieser Aminosäureposition für die Funktion des Transporters.

H192A zeigte eine schnellere Transportgeschwindigkeit bei erhöhtem  $K_m$ -Wert (Abb.3-9 B+C). Die verkürzte Seitenkette der Aminosäure scheint bei ausreichender Substratkonzentration den Transport von  $T_3$  zu erleichtern. Für H192Q hingegen sind der  $K_m$ -Wert und die Geschwindigkeit der Reaktion verringert (Abb.3-9 B+C). Glutamin ist kleiner als Histidin und Phenylalanin. Für H192F konnte keine Veränderung hinsichtlich des  $K_m$ -Wertes festgestellt werden (Abb.3-9 B+C). Daher liegt die Vermutung nahe, dass nicht die Größe der Glutaminseitenkette sondern eine mögliche störende Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Glutamin- und dem Phenolrest des  $T_3$ -Moleküls zu einer Erhöhung der Aktivierungsenergie führt, durch die die Konformationsänderung und letztendlich der  $T_3$ -Transport verlangsamt werden. Der Transport von  $T_4$  durch H192Q untermauert diese Vermutung, da die Mutation zu Glutamin den  $T_4$ -Transport nicht beeinflusst. Die Möglichkeit der

Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung wird durch das fehlende Wasserstoffatom am Phenolat des T<sub>4</sub> scheinbar verhindert (Abb.1-5).

Die korrespondierende Aminosäureposition zu His192 in MCT8 ist Gln88 in MCT10. Sowohl MCT8 als auch MCT10 sind dazu in der Lage T<sub>3</sub> zu transportieren. Zusätzlich transportiert MCT8 im Gegensatz zu MCT10 weitere Jodthyronine wie T<sub>4</sub> und rT<sub>3</sub>. MCT10 hingegen hat die Fähigkeit aromatische Aminosäuren wie Tryptophan zu transportieren, eine Eigenschaft, die MCT8 gänzlich fehlt. Sowohl His192 in MCT8 als auch Gln88 in MCT10 ragen in den potentiellen Transportkanal hinein und könnten somit potentiell an Substrattransport bzw. -erkennung beteiligt sein. Diese Eigenschaften sind Grundlage einer Hypothese, bei der Glutamin für die unterschiedliche Substratspezifität von MCT8 und MCT10 verantwortlich ist. Wie bereits erwähnt, zeigte sich eine ähnliche Beobachtung bei Mct1. Hier fungiert eine einzelne Aminosäure (Phe360) als Spezifitätsfilter (Garcia et al., 1994).

Zum Test der oben beschriebenen Hypothese wurden *Xenopus* Oozyten verwendet, da Tryptophan eine essentielle Aminosäure ist und *Xenopus* Oozyten anders als MDCK-1 Zellen keine endogenen Tryptophantransporter aufweisen. Die Vermutung, dass ein Glutaminrest am Erkennen von Tryptophan und somit an der Substratspezifität beteiligt ist, konnte allerdings nicht bestätigt werden (Abb.3-9 D-F). H192Q transportiert weiterhin in gleichem Maße wie MCT8 T<sub>4</sub> und konnte des Weiteren keine erhöhte Tryptophanaufnahmeaktivität aufweisen. Nicht auszuschließen sind jedoch weitere Aminosäurereste, die in den potentiellen Transportkanal hineinragen und in Kombination mit Gln88 bzw. His192 für die unterschiedlichen Substratspezifitäten verantwortlich sind.

Die erhobenen Daten demonstrieren, dass das MCT8-Homologiemodell dazu geeignet ist, Hypothesen zu erstellen und einzelne Aminosäuren zu identifizieren, um deren Funktion zu untersuchen. Die genaue Funktionsweise von MCT8 kann allerdings erst aufgeklärt werden, wenn die 3-dimensionale Struktur des Proteins gelöst wurde, ein Projekt, welches durch Ulrich Schweizer und Jörg Johannes weitergeführt wird.

### 4.3. Eine neue MCT8-Mutation als Ursache für AHDS in einer weiblichen Patientin

Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) gehört zu den X-chromosomal vererbten Krankheiten. Daher manifestiert sich diese Krankheit vor allem bei Knaben. Die Mütter der Betroffenen sind meist heterozygote Überträgerinnen des MCT8-Gendefekts ohne selbst erkennbare Symptome zu offenbaren. Die Überträgerinnen weisen ein normales Wachstum auf und zeigen keine Hinweise auf eine gestörte geistige Entwicklung.

Nichtsdestotrotz können auch Mädchen AHDS-typische Symptome entwickeln. Diese fallen allerdings meist milder aus als es bei Knaben beobachtet wurde. So wurden erhöhte T<sub>3</sub>-Werte im Serum nachgewiesen als auch Entwicklungsverzögerungen beschrieben (Herzovich et al., 2007; Schwartz and Stevenson, 2007; Frints et al., 2008).

Während der Embryonalentwicklung kommt es beim weiblichen Geschlecht zu einer zufälligen Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen. Die rückgebildeten X-Chromosomen werden als Barr-Körperchen bezeichnet. Der Vorgang der Inaktivierung dient der Gendosiskompensation. Die milde Ausprägung AHDS-typischer Symptome erklärt sich durch die zufällige Inaktivierung des X-Chromosoms, das die *SLC16A2*-Mutation trägt, was zur überwiegenden Expression des Wildtyp-Allels führt. (Schwartz and Stevenson, 2007). Je nach Häufigkeit der Inaktivierung des X-Chromosoms, das die *SLC16A2*-Mutation trägt, fallen die AHDS-typischen Symptome bei Mädchen milder oder schwerwiegender aus. Ähnliche Beobachtungen wurden beim Fragilen-X-Syndrom (OMIM: #300624) gemacht, einer Erbkrankheit, die für 50% der X-gekoppelten mentalen Retardierung verantwortlich ist. Das Fragile-X-Syndrom betrifft sowohl Männer als auch Frauen, die Beeinträchtigungen kognitiver Fähigkeiten fallen allerdings unterschiedlich stark aus. Auch bei dieser Krankheit sind die Symptome bei den weiblichen Trägerinnen des Gendefekts aufgrund der zufälligen Inaktivierung eines X-Chromosoms milder ausgeprägt als bei männlichen Betroffenen.

2008 wurde die erste weibliche AHDS-Patientin beschrieben (Frints et al., 2008). Diese Patientin offenbarte einen AHDS-typischen Phänotyp wie er auch bei männlichen Patienten vorzufinden war: erhöhte T<sub>3</sub>-Werte im Serum, mentale

Retardierung und Muskelhypotonie. Sequenzanalysen ergaben, dass das *SLC16A2*-Gen der Patientin durch eine Chromosomentranslokation zerstört wurde. Eine komplette Inaktivierung des „gesunden“ X-Chromosoms führte dazu, dass kein funktionsfähiges MCT8-Protein mehr exprimiert wurde (Frints et al., 2008).

Die Sequenzierung des *SLC16A2*-Gens einer zweiten weiblichen Patientin mit AHDS-typischen Symptomen ergab eine zuvor noch nicht beschriebene heterozygote Mutation, die in 70 % der *MCT8*-Transkripte in Fibroblasten vorkam (Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité-Universitätsmedizin, Berlin). Die Mutation besteht in einem Aminosäureaustausch (Asparagin zu Isoleucin) an Position 193 der MCT8-Sequenz. Im Zellkulturmodell führte diese Mutation zu einem gestörten T<sub>3</sub>-Transports (Abb.3-12 B). Die verringerte Aktivität konnte nicht mit einer Fehlfaltung des Proteins oder mit einer gestörten Translokation in Verbindung gebracht werden, da nachgewiesen werden konnte, dass N193I an der Zelloberfläche exprimiert wird (Abb.3-12 A). Vielmehr konnte in *Xenopus* Oozyten gezeigt werden, dass die Mutation den T<sub>3</sub>-Transport aber nicht die T<sub>3</sub>-Bindung beeinflusst (Abb.3-12 C+D).

Fibroblasten der Patientin wiesen keinen komplett gehemmten aber einen um circa 45% verringerten T<sub>3</sub>-Transport auf (Abb.3-13), was auf eine Restaktivität des MCT8-Wildtypproteins oder auf die Expression weiterer T<sub>3</sub>-Transporter an der Zelloberfläche von Fibroblasten zurückzuführen sein könnte.

Analysen des MCT8-Homologiemodells offenbarten, dass die Seitenkette des Asparagins in den potentiellen Substratkanal hineinragt. Da Isoleucin und Asparagin in etwa die gleiche Größe aufweisen, sind sterische Hindernisse als Erklärung für den gestörten T<sub>3</sub>-Transport eher auszuschließen. Vielmehr sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der hydrophilen Aminosäure Asparagin und den verschiedenen MCT8-Substraten oder auch anderen Aminosäuren des Transporters denkbar, die für die Transportfunktion von MCT8 notwendig sind und mit Isoleucin an dieser Position nicht ausgebildet werden können.

Sequenzvergleiche zeigen, dass Asparagin in MCT10 und vielen anderen Mct8-Subspezies konserviert ist (Kleinau et al., 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die korrespondierenden Aminosäuren in GlpT (Lys46) und Mct1 (Lys38) jeweils an der Bindung bzw. dem Transport ihres Substrats beteiligt sind (Huang et al., 2003; Wilson et al., 2009). Beide Beobachtungen sind Indizien für die Wichtigkeit dieser Aminosäure an dieser Position. Ein weiterer Hinweis für die

Beteiligung der Region an einem funktionsfähigen MCT8-Protein sind bereits beschriebene pathogene Mutationen mit H192R und S194F (Abb.1-7 B) (Kleinau et al., 2011). Genauere Betrachtungen zur Funktionsweise des Proteins können allerdings erst angestellt werden, wenn die Kristallstruktur des Transporters gelöst wurde.

#### **4.4. Der MCT8-vermittelte Jodthyronintransport wird durch Tyrosinkinase Inhibitoren (TKIs) nicht-kompetitiv gehemmt**

Tyrosinkinase Inhibitoren der ersten Generation wie Sunitinib und Imatinib werden zur Behandlung einer Vielzahl von Krebsarten herangezogen (de Groot et al., 2005; Desai et al., 2006; Rini et al., 2007; Dora et al., 2008). Sie inhibieren die ATP-Bindungsstelle von Tyrosinkinasen und verhindern somit deren Mitwirkung am Wachstum von Tumoren (Mendel et al., 2003; Arora and Scholar, 2005). Nebenwirkungen dieser Behandlung äußern sich als primäre Hypothyreose und Thyreoditis sowie einem erhöhten Bedarf an Levothyroxin in athyreoten Patienten (de Groot et al., 2005; Wong et al., 2007). Auch die TKIs der zweiten Generation, eigentlich als Weiterentwicklung zur Verhinderung von Nebenwirkungen gedacht, führen in Krebspatienten zu anormalen Schilddrüsenfunktionstests (Kim et al., 2010).

Mehrere potentielle Mechanismen wurden vorgeschlagen, um die veränderten Schilddrüsenfunktionstest zu erklären. So gibt es Hinweise auf Schilddrüsenatrophie (Faris et al., 2007) sowie die Rückbildung von Kapillaren in der Schilddrüse durch Hemmung des VEGFR (Kappers et al., 2011). Außerdem zeigte sich durch den Nachweis erhöhter  $rT_3$ - gegenüber  $T_4$ -Spiegel, dass ein Tyrosinkinase Inhibitor namens Sorafenib die Aktivität der 5-Dejodase-Aktivität erhöht (Abdulrahman et al., 2010). Anormale Schilddrüsenhormonwerte könnten demnach durch eine übermäßige Inaktivierung von  $T_4$  in der Peripherie ausgelöst werden.

Eine weitere Möglichkeit findet sich in der Inhibition von MCT8. MCT8 wird sowohl in der Schilddrüse als auch in der Hypophyse exprimiert. In der Schilddrüse könnte MCT8 am Export von Schilddrüsenhormonen beteiligt sein. Dessen Inhibition würde dazu führen, dass Schilddrüsenhormone in der Drüse akkumulieren und nicht mehr ins Blut abgegeben werden, so dass der Schilddrüsenhormongehalt im Serum sinkt.

Die Akkumulation von Schilddrüsenhormonen in der Schilddrüse wurde bereits für Mct8-defiziente Mäuse prognostiziert (Di Cosmo et al., 2010; Trajkovic-Arsic et al., 2010). Auch die Hypophyse als eines der Regulationszentren des thyreotropen Regelkreises exprimiert MCT8. Inhibition von MCT8 durch TKIs auf dieser Ebene würde somit zu einer mangelhaften Bestimmung der Schilddrüsenhormonkonzentration führen, was eine Erhöhung von TSH im Serum zur Folge hätte.

Die durchgeführten Experimente offenbarten, dass TKIs der ersten und zweiten Generation die MCT8-vermittelte Schilddrüsenhormonaufnahme nicht-kompetitiv hemmen (Abb.3-15 und 3-16). Nun könnte man spekulieren, dass MCT8 ein Substrat von Tyrosinkinase darstellt. Allerdings sind keine funktionellen Phosphorylierungsstellen in MCT8 bekannt und außerdem kann aufgrund des kurzen Zeitraumes von 3 Minuten davon ausgegangen werden, dass sich die Inhibition der Zielkinasen nicht negativ auf die MCT8-Funktion auswirkt.

Ein nicht-kompetitiver Modus der Inhibition deutet entweder auf eine Verringerung der MCT8-Moleküle an der Zelloberfläche oder aber auf die Blockierung des Transportkanals bzw. der Substratbindungsstelle von MCT8 hin. Indizien für die Blockierung des Kanals liefert eine Substanz namens Desipramin. Desipramin hemmt ähnlich wie die TKIs den MCT8-vermittelten Transport von Schilddrüsenhormonen nicht-kompetitiv (Roth et al., 2010). Studien zeigten, dass Desipramin den zerebralen Schilddrüsenhormonmetabolismus in einer Weise beeinflusst, die vergleichbar mit einer Inhibition der  $T_4$ -Aufnahme an der Bluthirnschranke ist (Bauer et al., 1998). Es ist außerdem bekannt, dass Desipramin an vesikuläre Monoamintransporter von Nervenzellen bindet. Monoamintransporter weisen Strukturhomologien zum bakteriellen Transporter LeuT auf. Auch die Sensitivität von LeuT gegenüber Desipramin ist vergleichbar mit der Sensitivität der Monoamintransporter gegenüber dem Inhibitor. Die Kristallstruktur von LeuT zusammen mit gebundenen Desipramin zeigt, dass der Inhibitor den Transportkanal blockiert (Zhou et al., 2007). Ähnlich könnte es sich auch bei der Bindung der TKIs an MCT8 verhalten.

Interessanterweise wurden für Bosutinib, einem TKI der zweiten Generation, noch keine Nebenwirkungen hinsichtlich der Schilddrüsenfunktion in Patienten beschrieben, dennoch weisen die erhaltenen Daten auf eine MCT8-Inhibition hin. Neue Erkenntnisse zeigen allerdings, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Material (Bosutinib von LC Laboratories) um ein fälschlicherweise in

Umlauf gebrachtes Isomer der besagten Substanz handelt (Levinson and Boxer, 2012). Möglicherweise gibt es Unterschiede in der Wirkungsweise beider Isomere, die aber noch nicht herausgearbeitet wurden. Für den künftigen Bestand der erhaltenen Ergebnisse sprechen nichtsdestotrotz die Wirkungen von Sunitinib, Imatinib und Dasatinib, die strukturell weiter von Bosutinib entfernt sind als sein Isomer und trotzdem MCT8 inhibieren.

Die TKI-Konzentrationen, die im Plasma von Patienten gemessen wurden, liegen zwischen 0,1 - 4  $\mu\text{M}$  ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Im Experiment werden  $\text{IC}_{50}$ -Werte ermittelt, die zwar ebenfalls im micromolaren Bereich zu finden sind, allerdings teilweise um eine Zehnerpotenz höher liegen (Abb.3-15 und 3-16). Nichtsdestotrotz könnten diese TKI-Konzentrationen ausreichen, um MCT8 teilweise zu hemmen. Die partielle Inhibition von MCT8 könnte unter anderem Auswirkungen auf die Verfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen im Gehirn haben. Ein geringerer Schilddrüsenhormongehalt im Gehirn ist eine mögliche Erklärung für eine der am weitesten verbreiteten Nebenwirkungen der TKI-Behandlung, Müdigkeit. Die Hemmung von MCT8 hätte ebenso Auswirkungen auf Hypophyse und Hypothalamus. Die Inhibition von MCT8 in Hypophyse und Hypothalamus wäre ein Grund für den erhöhten Bedarf an Levothyroxin in athyreoten Patienten, um normale Werte in Schilddrüsenfunktionstests zu erreichen. Die Beobachtung, dass sich die abweichenden Schilddrüsenwerte in athyreoten Patienten normalisieren sobald die Behandlung mit TKIs beendet wird, wäre mit dieser Hypothese erklärbar. TKIs könnten ebenso die Absorption von Schilddrüsenhormonen im Darm hemmen. MCT8 konnte bis jetzt noch nicht im Darm nachgewiesen werden. Dennoch könnte auch die Hemmung eines bis jetzt noch nicht identifizierten, intestinalen  $\text{T}_4$ -Transporters den erhöhten Bedarf an Levothyroxin erklären.

Auch wenn TKIs Nebenwirkungen aufweisen, so steht doch die positive Wirkung der Substanzen hinsichtlich der Hemmung des Tumorwachstums im Vordergrund. Das Verständnis für die Substanzen kann jedoch dabei helfen, Nebenwirkungen wie Hypothyreose durch die Gabe von höheren Dosen Levothyroxin zu behandeln.

## Referenzen

- Abdulrahman RM, Verloop H, Hoftijzer H, Verburg E, Hovens GC, Corssmit EP, Reiners C, Gelderblom H, Pereira AM, Kapiteijn E, Romijn JA, Visser TJ, Smit JW (2010) Sorafenib-induced hypothyroidism is associated with increased type 3 deiodination. *J Clin Endocrinol Metab* 95:3758-3762.
- Abe T, Kakyo M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert SC, Matsuno S, Kondo H, Yawo H (1998) Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J Biol Chem* 273:22395-22401.
- Alkemade A, Friesema EC, Kalsbeek A, Swaab DF, Visser TJ, Fliers E (2011) Expression of thyroid hormone transporters in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E967-971.
- Arora A, Scholar EM (2005) Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 315:971-979.
- Auso E, Lavado-Autric R, Cuevas E, Del Rey FE, Morreale De Escobar G, Berbel P (2004) A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration. *Endocrinology* 145:4037-4047.
- Bagamasbad P, Denver RJ (2011) Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *General and comparative endocrinology* 170:3-17.
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120:1097-1108.
- Bauer M, Hellweg R, Graf KJ, Baumgartner A (1998) Treatment of refractory depression with high-dose thyroxine. *Neuropsychopharmacology* 18:444-455.
- Bernal J (2011) [Thyroid hormone resistance syndromes]. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición* 58:185-196.
- Biebermann H, Schoneberg T, Krude H, Schultz G, Gudermann T, Gruters A (1997) Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3471-3480.
- Biebermann H, Winkler F, Handke D, Gruters A, Krude H, Kleinau G (2011) Molecular description of non-autoimmune hyperthyroidism at a neonate caused by a new thyrotropin receptor germline mutation. *Thyroid research* 4 Suppl 1:S8.
- Bizhanova A, Kopp P (2009) Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* 150:1084-1090.
- Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F, Francon J (1993) Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes. *J Neurochem* 60:1407-1413.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Braun D, Wirth EK, Schweizer U (2010) Thyroid hormone transporters in the brain. *Reviews in the neurosciences* 21:173-186.
- Braun D, Lelios I, Krause G, Schweizer U (2013) Histidines in Potential Substrate Recognition Sites Affect Thyroid Hormone Transport by Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8). *Endocrinology*.
- Braun D, Kim TD, le Coutre P, Kohrle J, Hershman JM, Schweizer U (2012) Tyrosine kinase inhibitors noncompetitively inhibit MCT8-mediated iodothyronine transport. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E100-105.
- Braun D, Kinne A, Brauer AU, Sapin R, Klein MO, Kohrle J, Wirth EK, Schweizer U (2011a) Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells. *Glia* 59:463-471.
- Braun D, Wirth EK, Wohlgemuth F, Reix N, Klein MO, Gruters A, Kohrle J, Schweizer U (2011b) Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter Slc7a8. *Biochem J* 439:249-255.



- Broer S (2008) Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological reviews* 88:249-286.
- Broer S, Broer A, Hansen JT, Bubb WA, Balcar VJ, Nasrallah FA, Garner B, Rae C (2007) Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain. *J Neurochem* 102:1758-1770.
- Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D, Nies AT (2005) ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* 65:11419-11428.
- Chan SY, Martin-Santos A, Loubiere LS, Gonzalez AM, Stieger B, Logan A, McCabe CJ, Franklyn JA, Kilby MD (2011) The expression of thyroid hormone transporters in the human fetal cerebral cortex during early development and in N-Tera-2 neurodifferentiation. *J Physiol* 589:2827-2845.
- Chantoux F, Blondeau JP, Francon J (1995) Characterization of the thyroid hormone transport system of cerebrocortical rat neurons in primary culture. *J Neurochem* 65:2549-2554.
- Chiu-Ugalde J, Wirth EK, Klein MO, Sapin R, Fradejas-Villar N, Renko K, Schomburg L, Kohrle J, Schweizer U (2012) Thyroid function is maintained despite increased oxidative stress in mice lacking selenoprotein biosynthesis in thyroid epithelial cells. *Antioxidants & redox signaling* 17:902-913.
- Chomczynski P, Rymaszewski M (2006) Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. *BioTechniques* 40:454, 456, 458.
- Christensen HN (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiological reviews* 70:43-77.
- de Groot JW, Zonnenberg BA, Plukker JT, van Der Graaf WT, Links TP (2005) Imatinib induces hypothyroidism in patients receiving levothyroxine. *Clin Pharmacol Ther* 78:433-438.
- Debrand E, Heard E, Avner P (1998) Cloning and localization of the murine Xpct gene: evidence for complex rearrangements during the evolution of the region around the Xist gene. *Genomics* 48:296-303.
- del Amo EM, Urtti A, Yliperttula M (2008) Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci* 35:161-174.
- Dentice M, Salvatore D (2011) Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol* 209:273-282.
- Desai J, Yassa L, Marqusee E, George S, Frates MC, Chen MH, Morgan JA, Dychter SS, Larsen PR, Demetri GD, Alexander EK (2006) Hypothyroidism after sunitinib treatment for patients with gastrointestinal stromal tumors. *Ann Intern Med* 145:660-664.
- Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S (2010) Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest* 120:3377-3388.
- Docter R, Friesema EC, van Stralen PG, Krenning EP, Everts ME, Visser TJ, Hennemann G (1997) Expression of rat liver cell membrane transporters for thyroid hormone in *Xenopus laevis* oocytes. *Endocrinology* 138:1841-1846.
- Dora JM, Leie MA, Netto B, Fogliatto LM, Silla L, Torres F, Maia AL (2008) Lack of imatinib-induced thyroid dysfunction in a cohort of non-thyroidectomized patients. *Eur J Endocrinol* 158:771-772.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S (2004) A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 74:168-175.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S (2006) Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* 147:4036-4043.
- Edwards RH (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55:835-858.
- Faris JE, Moore AF, Daniels GH (2007) Sunitinib (sutent)-induced thyrotoxicosis due to destructive thyroiditis: a case report. *Thyroid* 17:1147-1149.

- Feldman DR, Martorella AJ, Robbins RJ, Motzer RJ (2007) Re: Hypothyroidism in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst* 99:974-975; author reply 976-977.
- Feliubadalo L, Arbones ML, Manas S, Chillaron J, Visa J, Rodes M, Rousaud F, Zorzano A, Palacin M, Nunes V (2003) Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet* 12:2097-2108.
- Friesema EC, Visser WE, Visser TJ (2010) Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Mol Cell Endocrinol* 322:107-113.
- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ (2003) Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278:40128-40135.
- Friesema EC, Jansen J, Heuer H, Trajkovic M, Bauer K, Visser TJ (2006) Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:512-523.
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Verrey F, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (2001) Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology* 142:4339-4348.
- Friesema EC, Visser TJ, Borgers AJ, Kalsbeek A, Swaab DF, Fliers E, Alkemade A (2012) Thyroid hormone transporters and deiodinases in the developing human hypothalamus. *Eur J Endocrinol*.
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun* 254:497-501.
- Frints SG et al. (2008) MCT8 mutation analysis and identification of the first female with Allan-Herndon-Dudley syndrome due to loss of MCT8 expression. *Eur J Hum Genet* 16:1029-1037.
- Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Shiiba K, Suzuki M, Kondo Y, Nunoki K, Shimosegawa T, Iinuma K, Ito S, Matsuno S, Abe T (2001) Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology* 142:2005-2012.
- Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, Benke D, Aguzzi A, Meier PJ (2000) Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 294:73-79.
- Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS (1994) Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76:865-873.
- Ghandour A, Reust C (2011) Hyperthyroidism: a stepwise approach to management. *The Journal of family practice* 60:388-395.
- Gilbert ME, Sui L, Walker MJ, Anderson W, Thomas S, Smoller SN, Schon JP, Phani S, Goodman JH (2007) Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology* 148:92-102.
- Gruters A, l'Allemand D, Beyer P, Eibs G, Helge H, Korth-Schutz S, Oberdisse U, Schwartz-Bickenbach D, Weber B (1983) [Screening of newborn infants for hypothyroidism in Berlin (West) 1978-1982]. *Monatsschrift Kinderheilkunde : Organ der Deutschen Gesellschaft fur Kinderheilkunde* 131:100-105.
- Hagenbuch B (2007) Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 21:209-221.
- Halestrap AP (2012) The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB life* 64:1-9.
- Halestrap AP, Meredith D (2004) The SLC16 gene family--from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447:619-628.

- Henderson J (2005) Ernest Starling and 'Hormones': an historical commentary. *J Endocrinol* 184:5-10.
- Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ (2001) Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocrine reviews* 22:451-476.
- Herzovich V, Vaiani E, Marino R, Dratler G, Lazzati JM, Tilitzky S, Ramirez P, Iorcansky S, Rivarola MA, Belgorosky A (2007) Unexpected peripheral markers of thyroid function in a patient with a novel mutation of the MCT8 thyroid hormone transporter gene. *Hormone research* 67:1-6.
- Heuer H, Mason CA (2003) Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha1. *J Neurosci* 23:10604-10612.
- Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema EC, Visser TJ, Bauer K (2005) The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146:1701-1706.
- Holden KR, Zuniga OF, May MM, Su H, Molinero MR, Rogers RC, Schwartz CE (2005) X-linked MCT8 gene mutations: characterization of the pediatric neurologic phenotype. *J Child Neurol* 20:852-857.
- Howdeshell KL (2002) A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environmental health perspectives* 110 Suppl 3:337-348.
- Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301:616-620.
- Ishizuya-Oka A, Hasebe T, Shi YB (2010) Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. *Apoptosis* 15:350-364.
- Ito K, Uchida Y, Ohtsuki S, Aizawa S, Kawakami H, Katsukura Y, Kamiie J, Terasaki T (2011) Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939-3950.
- Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ (2005) Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15:757-768.
- Jones SA, Jolson DM, Cuta KK, Mariash CN, Anderson GW (2003) Triiodothyronine is a survival factor for developing oligodendrocytes. *Mol Cell Endocrinol* 199:49-60.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273:23629-23632.
- Kappers MH, van Esch JH, Smedts FM, de Krijger RR, Eechoute K, Mathijssen RH, Sleijfer S, Leijten F, Danser AH, van den Meiracker AH, Visser TJ (2011) Sunitinib-induced hypothyroidism is due to induction of type 3 deiodinase activity and thyroidal capillary regression. *J Clin Endocrinol Metab* 96:3087-3094.
- Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H (2001) Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276:17221-17228.
- Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB (2011) Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol* 226:2484-2493.
- Kim TD, Schwarz M, Nogai H, Grille P, Westermann J, Plockinger U, Braun D, Schweizer U, Arnold R, Dorken B, le Coutre P (2010) Thyroid dysfunction caused by second-generation tyrosine kinase inhibitors in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Thyroid* 20:1209-1214.
- Kinne A, Roth S, Biebermann H, Kohrle J, Gruters A, Schweizer U (2009) Surface translocation and triiodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. *J Mol Endocrinol* 43:263-271.

- Kinne A, Kleinau G, Hoefig CS, Gruters A, Kohrle J, Krause G, Schweizer U (2010) Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J Biol Chem* 285:28054-28063.
- Kleinau G, Schweizer U, Kinne A, Kohrle J, Gruters A, Krude H, Biebermann H (2011) Insights into molecular properties of the human monocarboxylate transporter 8 by combining functional with structural information. *Thyroid research* 4 Suppl 1:S4.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LaFranchi SH (2011) Approach to the diagnosis and treatment of neonatal hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2959-2967.
- Lafreniere RG, Carrel L, Willard HF (1994) A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Hum Mol Genet* 3:1133-1139.
- Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, Kim RB (2005) Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem* 280:9610-9617.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487:443-448.
- Lemieux MJ, Huang Y, Wang DN (2004) Glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: structure, function and regulation. *Research in microbiology* 155:623-629.
- Levinson NM, Boxer SG (2012) Structural and spectroscopic analysis of the kinase inhibitor bosutinib and an isomer of bosutinib binding to the Abl tyrosine kinase domain. *PLoS One* 7:e29828.
- Lima FR, Gervais A, Colin C, Izembart M, Neto VM, Mallat M (2001) Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *J Neurosci* 21:2028-2038.
- Lindholm J, Laurberg P (2011) Hypothyroidism and thyroid substitution: historical aspects. *J Thyroid Res* 2011:809341.
- Maia AL, Goemann IM, Meyer EL, Wajner SM (2011) Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol* 209:283-297.
- Mannavola D, Coco P, Vannucchi G, Bertuelli R, Carletto M, Casali PG, Beck-Peccoz P, Fugazzola L (2007) A novel tyrosine-kinase selective inhibitor, sunitinib, induces transient hypothyroidism by blocking iodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3531-3534.
- Manoharan C, Wilson MC, Sessions RB, Halestrap AP (2006) The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. *Molecular membrane biology* 23:486-498.
- Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F (1998) Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395:288-291.
- Mayerl S, Visser TJ, Darras VM, Horn S, Heuer H (2012) Impact of Oatp1c1 deficiency on thyroid hormone metabolism and action in the mouse brain. *Endocrinology* 153:1528-1537.
- Mebis L, van den Berghe G (2009) The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in critical illness. *The Netherlands journal of medicine* 67:332-340.
- Meier C, Ristic Z, Klauser S, Verrey F (2002) Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *Embo J* 21:580-589.
- Mendel DB et al. (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9:327-337.
- Meredith D, Christian HC (2008) The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 38:1072-1106.

- Miyai K (2007) Congenital thyrotropin deficiency--from discovery to molecular biology, postgenome and preventive medicine. *Endocrine journal* 54:191-203.
- Morte B, Ceballos A, Diez D, Grijota-Martinez C, Dumitrescu AM, Di Cosmo C, Galton VA, Refetoff S, Bernal J (2010) Thyroid hormone-regulated mouse cerebral cortex genes are differentially dependent on the source of the hormone: a study in monocarboxylate transporter-8- and deiodinase-2-deficient mice. *Endocrinology* 151:2381-2387.
- Namba N, Etani Y, Kitaoka T, Nakamoto Y, Nakacho M, Bessho K, Miyoshi Y, Mushiake S, Mohri I, Arai H, Taniike M, Ozono K (2008) Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *European journal of pediatrics* 167:785-791.
- Nascimento AS, Dias SM, Nunes FM, Aparicio R, Ambrosio AL, Bleicher L, Figueira AC, Santos MA, de Oliveira Neto M, Fischer H, Togashi M, Craievich AF, Garratt RC, Baxter JD, Webb P, Polikarpov I (2006) Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. *J Mol Biol* 360:586-598.
- Nunez J, Celi FS, Ng L, Forrest D (2008) Multigenic control of thyroid hormone functions in the nervous system. *Mol Cell Endocrinol* 287:1-12.
- Obregon MJ, Calvo RM, Del Rey FE, de Escobar GM (2007) Ontogenesis of thyroid function and interactions with maternal function. *Endocrine development* 10:86-98.
- Ohye H, Sugawara M (2010) Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 235:424-433.
- Pardridge WM (1979) Carrier-mediated transport of thyroid hormones through the rat blood-brain barrier: primary role of albumin-bound hormone. *Endocrinology* 105:605-612.
- Patel J, Landers K, Li H, Mortimer RH, Richard K (2011) Thyroid hormones and fetal neurological development. *J Endocrinol* 209:1-8.
- Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA (2006) Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* 147:2705-2716.
- Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M (1999) Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274:19738-19744.
- Ramadan T, Camargo SM, Summa V, Hunziker P, Chesnov S, Pos KM, Verrey F (2006) Basolateral aromatic amino acid transporter TAT1 (Slc16a10) functions as an efflux pathway. *J Cell Physiol* 206:771-779.
- Rastogi MV, LaFranchi SH (2010) Congenital hypothyroidism. *Orphanet journal of rare diseases* 5:17.
- Raymond FL (2006) X linked mental retardation: a clinical guide. *J Med Genet* 43:193-200.
- Rini BI, Tamaskar I, Shaheen P, Salas R, Garcia J, Wood L, Reddy S, Dreicer R, Bukowski RM (2007) Hypothyroidism in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst* 99:81-83.
- Ritchie JW, Peter GJ, Shi YB, Taylor PM (1999) Thyroid hormone transport by 4F2hc-IU12 heterodimers expressed in *Xenopus* oocytes. *J Endocrinol* 163:R5-9.
- Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N (2008) Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 149:6251-6261.
- Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC (1999) LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274:34948-34954.
- Roth S, Kinne A, Schweizer U (2010) The tricyclic antidepressant desipramine inhibits T3 import into primary neurons. *Neurosci Lett* 478:5-8.

- Ruf J, Carayon P (2006) Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 445:269-277.
- Salem AK, Fenton MS, Marion KM, Hershman JM (2008) Effect of sunitinib on growth and function of FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid* 18:631-635.
- Schomburg L, Bauer K (1995) Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136:3480-3485.
- Schomburg L, Turwitt S, Prescher G, Lohmann D, Horsthemke B, Bauer K (1999) Human TRH-degrading ectoenzyme cDNA cloning, functional expression, genomic structure and chromosomal assignment. *European journal of biochemistry / FEBS* 265:415-422.
- Schwartz CE, Stevenson RE (2007) The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 21:307-321.
- Schwartz CE, Ulmer J, Brown A, Pancoast I, Goodman HO, Stevenson RE (1990) Allan-Herndon syndrome. II. Linkage to DNA markers in Xq21. *Am J Hum Genet* 47:454-458.
- Sijens PE, Rodiger LA, Meiners LC, Lunsing RJ (2008) 1H magnetic resonance spectroscopy in monocarboxylate transporter 8 gene deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1854-1859.
- Song Y, Yao X, Ying H (2011) Thyroid hormone action in metabolic regulation. *Protein & cell* 2:358-368.
- Sperandeo MP, Annunziata P, Bozzato A, Piccolo P, Maiuri L, D'Armiento M, Ballabio A, Corso G, Andria G, Borsani G, Sebastio G (2007) Slc7a7 disruption causes fetal growth retardation by downregulating Igf1 in the mouse model of lysinuric protein intolerance. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C191-198.
- Spitzweg C, Morris JC (2010) Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations. *Mol Cell Endocrinol* 322:56-63.
- Streckfuss F, Hamann I, Schomburg L, Michaelis M, Sapin R, Klein MO, Kohrle J, Schweizer U (2005) Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 337:739-745.
- Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y (2003) Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem* 278:43489-43495.
- Tohyama K, Kusuhara H, Sugiyama Y (2004) Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 145:4384-4391.
- Torrents D, Mykkanen J, Pineda M, Feliubadalo L, Estevez R, de Cid R, Sanjurjo P, Zorzano A, Nunes V, Huoponen K, Reinikainen A, Simell O, Savontaus ML, Aula P, Palacin M (1999) Identification of SLC7A7, encoding y+LAT-1, as the lysinuric protein intolerance gene. *Nat Genet* 21:293-296.
- Trajkovic-Arsic M, Muller J, Darras VM, Groba C, Lee S, Weih D, Bauer K, Visser TJ, Heuer H (2010) Impact of monocarboxylate transporter-8 deficiency on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in mice. *Endocrinology* 151:5053-5062.
- Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, Raivich G, Bauer K, Heuer H (2007) Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest* 117:627-635.
- Vaurs-Barriere C, Deville M, Sarret C, Giraud G, Des Portes V, Prats-Vinas JM, De Michele G, Dan B, Brady AF, Boespflug-Tanguy O, Touraine R (2009) Pelizaeus-Merzbacher-Like disease presentation of MCT8 mutated male subjects. *Ann Neurol* 65:114-118.
- Verrey F (2003) System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 445:529-533.
- Visser WE, Friesema EC, Visser TJ (2011) Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 25:1-14.

- Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ (2008) Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19:50-56.
- Wade LA, Katzman R (1975) Synthetic amino acids and the nature of L-DOPA transport at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 25:837-842.
- Wagner CA, Lang F, Broer S (2001) Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1077-1093.
- Weissbach L, Handlogten ME, Christensen HN, Kilberg MS (1982) Evidence for two Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transport systems in primary cultures of rat hepatocytes. Time-dependent changes in activity. *J Biol Chem* 257:12006-12011.
- Werthmann RC, Volpe S, Lohse MJ, Calebiro D (2012) Persistent cAMP signaling by internalized TSH receptors occurs in thyroid but not in HEK293 cells. *Faseb J*.
- Westholm DE, Marold JD, Viken KJ, Duerst AH, Anderson GW, Rumbley JN (2010) Evidence of evolutionary conservation of function between the thyroxine transporter Oatp1c1 and major facilitator superfamily members. *Endocrinology* 151:5941-5951.
- Williams GR, Bassett JH (2011) Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. *J Endocrinol* 209:261-272.
- Wilson MC, Meredith D, Bunnun C, Sessions RB, Halestrap AP (2009) Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle. *J Biol Chem* 284:20011-20021.
- Wirth EK, Roth S, Blechschmidt C, Holter SM, Becker L, Racz I, Zimmer A, Klopstock T, Gailus-Durner V, Fuchs H, Wurst W, Naumann T, Brauer A, de Angelis MH, Kohrle J, Gruters A, Schweizer U (2009) Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J Neurosci* 29:9439-9449.
- Wolter P, Stefan C, Decallonne B, Dumez H, Bex M, Carmeliet P, Schoffski P (2008) The clinical implications of sunitinib-induced hypothyroidism: a prospective evaluation. *Br J Cancer* 99:448-454.
- Wong E, Rosen LS, Mulay M, Vanvugt A, Dinolfo M, Tomoda C, Sugawara M, Hershman JM (2007) Sunitinib induces hypothyroidism in advanced cancer patients and may inhibit thyroid peroxidase activity. *Thyroid* 17:351-355.
- Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X (2006) Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* 246:121-127.
- Zavacki AM, Ying H, Christoffolete MA, Aerts G, So E, Harney JW, Cheng SY, Larsen PR, Bianco AC (2005) Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. *Endocrinology* 146:1568-1575.
- Zhou Z, Zhen J, Karpowich NK, Goetz RM, Law CJ, Reith ME, Wang DN (2007) LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake. *Science* 317:1390-1393.
- Zoeller RT, Rovet J (2004) Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *Journal of neuroendocrinology* 16:809-818.

## Publikationen

**Braun D**, Wirth EK, Schweizer U (2010) Thyroid hormone transporters in the brain. *Rev Neurosci* 21:173-186.

Kim TD, Schwarz M, Nogai H, Grille P, Westermann J, Plöckinger U, **Braun D**, Schweizer U, Arnold R, Dörken B, le Coutre P (2010) Thyroid dysfunction caused by second-generation tyrosine kinase inhibitors in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Thyroid* 20(11):1209-14.

**Braun D**, Kinne A, Brauer AU, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, Wirth EK, Schweizer U (2011) Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells. *Glia* 59:463-471.

**Braun D**, Wirth EK, Wohlgemuth F, Reix N, Klein MO, Grüters A, Köhrle J, Schweizer U (2011) Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter Slc7a8. *Biochem J* 15;439(2):249-55.

**Braun D**, Kim TD, le Coutre P, Köhrle J, Hershman JM, Schweizer U (2012) Tyrosine kinase inhibitors noncompetitively inhibit MCT8-mediated iodothyronine transport. *J Clin Endocrinol Metab* 97(1):E100-5.