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

DISSERTATION

Studien zum Transport von Schilddrüsenhormonen durch Membrantransporter der MCT- und LAT-Familie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anita Kinne

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle

2. Prof. Dr. Dr. med. D. Führer-Sakel

3. Priv.-Doz. Dr. R. Schülein

Datum der Promotion: 09.09.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung **5**

2. Einleitung **6**

2.1 Schilddrüsenhormone 6

2.2 Transportproteine und Schilddrüsenhormontransporter 6

2.3 Mutationen in MCT8 7

2.4 Fehlfaltung von Membranproteinen 9

2.5 Antidepressiva und Schilddrüsenhormone 10

3. Zielstellung **11**

4. Methoden **12**

4.1 T_3-Aufnahmeassay 12

4.2 Biotinylierung von Zellmembranproteinen 13

4.3 Herstellung von Antiseren gegen Lat1 und Lat2 13

5. Ergebnisse **14**

5.1 Charakterisierung pathogener MCT8 Mutanten 14

5.2 Struktur-Funktionsanalysen am MCT8 15

5.2.1 Strukturelle Eigenschaften eines MCT8 Substrats 15

5.2.2 Interaktionen von MCT8 mit dem Substrat 16

5.2.3 Erstellung eines ersten MCT8 Strukturmodells 17

5.3 Schilddrüsenhormontransporter im Gehirn der Maus 18

5.4 Desipramin und Schilddrüsenhormone 19

6. Diskussion **20**

6.1 Molekulare Pathologie von Mutationen in MCT8 20

6.2 Enges Substratspektrum von MCT8 21

6.3 Beteiligung der Aminosäuren R445 und D498 am Substrattransport durch MCT8 23

6.4 Expressionsmuster von Schilddrüsenhormontransportern im Gehirn der Maus 24

6.5 Einfluss von Desipramin auf den Transport von Schilddrüsenhormonen 25

7. Ausblick **27**

8. Abkürzungsverzeichnis **29**

9. Literaturverzeichnis **31**

Anteilserklärung **39**

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen **41**

Lebenslauf **45**

Publikationsliste **46**

Selbständigkeitserklärung **48**

Danksagung **49**

1. Zusammenfassung

Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) ist eine schwere X-chromosomale Erkrankung, die sich phänotypisch in einer mentalen Retardation mit Sprach- und Bewegungsstörungen äußert. Im Gen des Schilddrüsenhormontransporters Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) wurden bei betroffenen Patienten Mutationen identifiziert, die für die Störung ursächlich sind.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert den Pathomechanismus von ausgewählten Mutationen in Zellkulturstudien genauer. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die gestörte Funktionalität der MCT8 Mutanten nicht nur auf einen Transportdefekt, sondern auch auf eine verminderte Zelloberflächenexpression zurückzuführen ist. Anhand dieser Resultate und der zelltypspezifschen Effekte wird ein Erklärungsversuch vorgenommen, warum die Schwere der Erkrankung unter den Betroffenen variiert.

Bei den Analysen zur Substratspezifität von MCT8 mithilfe von Jodthyronin-Derivaten wurden die L-Aminosäurekonformation und das Vorhandensein von mindestens einem Jodatom pro aromatischem Ring als wichtige Voraussetzungen für einen effektiven Transport identifiziert. Studien zum Transportmechanismus von MCT8 zeigten die Aktivitätsrelevanz der geladenen und konservierten Aminosäuren R445 und D498. Dieser Zusammenhang bestätigt sich in einem ersten MCT8 Strukturmodell: Beide Aminosäuren sind in unmittelbarer Nähe des potenziellen Substratkanals lokalisiert.

Im Gegensatz zum AHDS-Patienten führt der Mct8 Verlust im Mausmodell zu einem milderen neurologischen Phänotyp. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise durch speziesspezifische Expressionsmuster alternativer Schilddrüsenhormontransporter erklären, die in der murinen Gehirnentwicklung einen Mct8 Mangel kompensieren können.

Antidepressiva führen im Rattenmodell zu einem Schilddrüsenhormonmangel im Zentralen Nervensystem. Um den Mechanismus zu erforschen, haben wir Transportstudien durchgeführt und eine spezifische Inhibition von MCT8 durch Desipramin beobachtet. Dieses überraschende Ergebnis liefert einen Ansatzpunkt, die zentralen Effekte von Desipramin besser einzuordnen und zu kontrollieren.

2. Einleitung

2.1 Schilddrüsenhormone

Schilddrüsenhormone (SDH) spielen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des menschlichen Gehirns, beim Wachstum und in vielen metabolischen Prozessen. Sie sind im Zentralen Nervensystem für die Differenzierung von Neuronen, die Ausbildung synaptischer Zellkontakte und die Myelinisierung notwendig (Zoeller et al., 2002).
Die Bildung und Sezernierung der SDH, des Prohormons T_4 (3,3`,5,5`-Tetrajod-L-Thyronin, Thyroxin) und des aktiven T_3 (3,3`,5-Trijod-L-Thyronin), erfolgen über die Schilddrüse. Der größte Anteil des zirkulierenden $T_3$ entsteht jedoch über eine 5`-Dejodierung am phenolischen Ring des T_4 außerhalb der Schilddrüse in den peripheren Organen (Köhrle, 2007). Eine Störung in der Verfügbarkeit von SDH in der frühen Embryonalentwicklung kann zu neurologischen Defiziten führen (Zoeller und Rovet, 2004). Defekte in der Hormonsynthese, aber auch Veränderungen im SDH-Transport in die Zielzellen werden als Gründe dafür angenommen.

2.2 Transportproteine und Schilddrüsenhormontransporter

Die strukturelle Basis der SDH bildet das Jod-Thyroningerüst mit ein bis vier Jodatomen; Wirkung und Metabolismus von SDH entfalten sich in der Zelle. Aufgrund ihrer lipophilen Struktur vermutete man ihre Aufnahme in die Zelle lange Zeit über passive Diffusion. Inzwischen hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass diese Hormone über spezifische Membran-Transportproteine die Zellmembran passieren (Hennemann et al., 2001).
Membran-Transportproteine werden allgemein in zwei Klassen unterteilt: Die Adenosin-5`-triphosphat (ATP)-Binding Cassette-Transporter (ABC-Transporter) gehören zu den primären Transportsystemen, welche die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzen. Die zweite Klasse bilden die Mitglieder der Major Facilitator Superfamilie (MFS)-Transporter, die als sekundäre Transporter bzw. Carrier bezeichnet werden (Pao et al., 1998). Hierbei ist die Energie in Form eines Konzentrationsgradienten des Substrats oder eines Kosubstrats (z.B. Natrium- oder Wasserstoffionen) entlang der Plasmamembran die treibende Kraft.
Die MFS umfasst 58 verschiedene Familien mit etwa 5000 Mitgliedern (Law et al., 2008). Im Unterschied zu den ABC-Transportern bestehen sie oft nur aus einer

Polypeptidkette mit zwölf Transmembranhelices (TMHs) (Lemieux, 2007). Sie weisen keine durchgehende Öffnung zwischen beiden Seiten der Membran auf und können während des Transportvorgangs Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Substrat ausbilden. Der sekundäre Transport erfolgt als Uniport, Symport oder Antiport. Bei einem Uniport wird durch die Konzentrationsdifferenz der zu transportierenden Substanz der Transport in eine Richtung getrieben. Der gemeinsame Transport mit einem anderen Substrat wird als Symport bezeichnet. Wenn zwei Substrate gegeneinander bewegt werden, spricht man von einem Antiport.

Bisher sind verschiedene transmembrane SDH-Transporter aus MFS-Familien bekannt: der Monocarboxylat-Transporter (MCTs), der L-Typ Aminosäure-Transporter (LATs), der Natrium-Taurocholat-cotransportierenden Peptide (NTCPs) und der Organischen Anionen-Transporter (OATPs). Vor allem die Mitglieder der OATPs besitzen ein breites Substratspektrum, insbesondere amphipathischer organischer Substrate. So transportieren z.B. OATP4A1 und OATP1A2 neben SDH auch Steroidhormone. Innerhalb der OATPs weist der Transporter OATP1C1 eine hohe Affinität gegenüber SDH auf (Kalliokoski und Niemi, 2009). In der LAT-Familie transportieren LAT1 und LAT2 große und kleine neutrale Aminosäuren sowie SDH (Friesema et al., 2001). Die NTCPs zeigen neben dem Transport von SDH eine hohe Spezifität gegenüber der Gallensäure (Jacquemin et al., 1994; Friesema et al., 1999).

Die Familie der MCT-Transporter hat 14 Mitglieder, wobei MCT1 bis MCT4 und MCT6 Monocarboxylate wie Laktat, Pyruvat und Ketonsäuren transportieren (Halestrap und Price, 1999). Der Transporter MCT10, zunächst als T-Typ-Transporter aromatischer Aminosäuren identifiziert, weist eine hohe Affinität gegenüber SDH auf (Kim et al., 2001; Friesema et al., 2008). Er zeigt in seiner Aminosäuresequenz eine Identität von 49 Prozent mit dem SDH-Transporter MCT8 (van der Deure et al., 2010).

Im Jahre 2003 wurde die Funktion von MCT8 als spezifischer SDH-Transporter nachgewiesen (Friesema et al., 2003). Er zeigt zwölf putative TMHs und sowohl Amino- als auch Carboxyterminus befinden sich intrazellulär (Lafreniere et al., 1994). Exprimiert ist MCT8 in vielen humanen Geweben wie Schilddrüse, Gehirn, Niere, Leber, Herz, Plazenta und Skelettmuskel (Price et al., 1998; Nishimura und Naito, 2008).

2.3 Mutationen in MCT8

Die X-chromosomale Erkrankung AHDS wurde erstmals von Allan et al. beschrieben

(Allan et al., 1944) und ist vor allem durch eine schwere geistige Retardation, Muskelhypotonie, Sprachstörung und Spastik gekennzeichnet. AHDS-Patienten weisen erhöhte T_3- und verminderte T_4-Spiegel im Serum bei normalem oder leicht erhöhtem TSH (Thyroidea stimulierendes Hormon, Thyrotropin) auf (Dumitrescu et al., 2004; Brockmann et al., 2005; Schwartz et al., 2005; Maranduba et al., 2006; Herzovich et al., 2007). Mutationen im SDH-Transporter MCT8 wurden 2004 bei Betroffenen identifiziert. Sie zeigen unterschiedlich schwer ausgeprägte Phänotypen. So können bspw. Patienten mit der Mutation S194F, L434W oder L568P elementare Sprachkenntnisse erlernen oder eigenständig gehen (Schwartz et al., 2005).

Patienten mit angeborener (congenitaler) Hypothyreose (CH) zeigen Symptome, die denen von AHDS-Patienten ähneln (Macchia et al., 1998; Moreno et al., 2002): Sie leiden an schwachen Reflektionen und Wachstumsdefiziten. Allerdings besitzen sie kaum oder kein SDH, was im Gegensatz zu den hohen T_3-Spiegeln bei AHDS steht. Hinsichtlich Psychomotorik und Intelligenzentwicklung unterscheiden sich beide Krankheitsbilder erheblich; die Einschränkungen sind bei AHDS wesentlich schwerwiegender (Hypothyroidism und Collaborative, 1981; Schwartz et al., 2005; Rastogi und LaFranchi, 2010). Insgesamt ist die Prognose für CH besser, zumal diese durch frühzeitige Substitutionstherapie mit T_4 gut behandelt werden kann (Rose et al., 2006).

Eine mögliche Erklärung für den schwerer ausgeprägten Phänotyp bei AHDS-Patienten war, dass Mutationen in MCT8 durch einen *gain-of-function* Mechanismus zu neurologischen Schäden führen könnten (Bernal, 2005; Wirth et al., 2009). Dagegen sprach jedoch, dass bis heute bereits über 25 pathogene Mutationen in diesem Gen identifiziert wurden. Diese beinhalten *missense* und *nonsense* Mutationen, sowie Deletionen, Insertionen und verschiedene Splicevarianten (Friesema et al., 2010).

Es wird angenommen, dass Mutationen in MCT8 eine Störung des SDH-Transports im Gehirn bewirken, was den neurologischen Phänotyp bei AHDS-Patienten verursacht (Dumitrescu et al., 2004; Jansen et al., 2007). Beim SDH-Transport im Gehirn der Maus spielt Mct8 z.B. in Neuronen und in Astrozyten eine wichtige Rolle (Alkemade et al., 2005; Heuer et al., 2005; Roberts et al., 2008b). Neben Mct8 sind auch die SDH-Transporter Oatp1c1, Lat1 und Lat2 entlang der Blut-Hirn-Schranke (BHS) lokalisiert (Roberts et al., 2008a; Roberts et al., 2008b). Die BHS dient u.a. als physiologische Barriere zwischen Blutkreislauf und Gehirn, um die Homöostase aufrecht zu erhalten und das Gehirn vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern und Giften zu schützen.

Im Mct8-defizienten Mausmodel sind die SDH-Spiegel mit denen humaner Patienten vergleichbar, die neurologischen Veränderungen sind jedoch eher mild ausgeprägt (Wirth et al., 2009). Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Verlust von Mct8 im Gehirn der Maus – im Gegensatz zum Menschen – durch andere SDH-Transporter z.B. aus der Familie der Lat- oder Oatp-Transporter kompensiert wird (Trajkovic et al., 2007; Roberts et al., 2008b; Wirth et al., 2009).

2.4 Fehlfaltung von Membranproteinen

Faltung, Oligomerisierung und posttranslationale Modifikationen finden im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bei ca. einem Drittel aller Proteine statt. Das ER kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und gilt als Eintrittspunkt für den sekretorischen Transportweg (Palade, 1975). Hier erfolgen z.B. die Faltung von Membranproteinen und die Ausbildung von Disulfidbrücken der sekretorischen Proteine, die an die Zelloberfläche transportiert und ggf. sezerniert werden. ER-residente Proteine sind zum großen Teil Chaperone und andere Faltungshelferproteine. Sie unterstützen Proteine, ihre korrekte Konformation zu erlangen. Durch einen Teil des Qualitätskontrollsystems, dem ERAD (ER-assoziierte Proteindegradation), wird der Akkumulation fehlgefalteter Proteine entgegengewirkt. Fehlgefaltete Proteine werden durch Retrotranslokation der Degradation im Cytosol zugeführt und somit dem sekretorischen Weg entzogen (Bonifacino und Weissman, 1998).

Mutationen in Membranproteinen können deren Fehlfaltung und den Verlust spezifischer Zellfunktionen verursachen (Schwartz et al., 2005; Schwartz und Stevenson, 2007). Eine der häufigsten genetischen Erkrankungen, die Cystinurie, ist durch Mutationen im heterodimeren Aminosäure-Transporter rBAT/b0,+AT bedingt. Der Rückresorptionsdefekt von Aminosäuren, wie dem Cystin im proximalen Nierentubulus, führt zur Bildung von Nierensteinen und zu Harntraktinfektionen (Harris et al., 1955). Des Weiteren lassen sich Krankheiten wie die Zystische Fibrose, Retinitis Pigmentosa und der Nephrogene Diabetes Insipidus durch Fehlfaltungen von Membranproteinen begründen (Amaral, 2006).

Es werden daher Therapieversuche unternommen, die korrekte Faltung der Proteine und deren effektive Translokation in die Plasmamembran steigern (Papp und Csermely, 2006). Durch die Anwendung von chemischen Chaperonen bspw. kann eine Proteinfehlfaltung aufgehoben und der ERAD-Weg umgangen werden (Schulz et al.,

2002; Bernier et al., 2004). Lösungsmittel wie Glycerol beeinflussen die Faltung von Proteinen und stabilisieren ihre native Struktur *in vitro* gegen Hitzedenaturierung (Simpson und Kauzmann, 1953; Gekko und Koga, 1983; Tatzelt et al., 1996). Eine weitere Möglichkeit ist die Gabe pharmakologischer Chaperone, die bei der Phenylketonurie genutzt werden (Pey et al., 2004). Durch einen membrandurchlässigen Liganden für das Zielprotein kann die Expression des veränderten integralen Membranproteins erhöht und die richtige dreidimensionale Faltung induziert werden (Bernier et al., 2004).

2.5 Antidepressiva und Schilddrüsenhormone

Bei der medikamentösen Behandlung von Depressionen werden Antidepressiva eingesetzt, die u.a. die Wiederaufnahme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin in die präsynaptische Membran hemmen. Die zusätzliche Einnahme von SDH kann ihre Wirksamkeit erhöhen (Schwarcz et al., 1984; Nemeroff, 1991). Wie Antidepressiva genau funktionieren ist allerdings bis heute nicht vollständig geklärt (Cowen, 2008; Sanacora, 2008). Sie haben jedoch auch einen Einfluss auf den SDH-Spiegel. So stimuliert das trizyklische Antidepressivum Desipramin die Dejodase Typ 2 (Dio2) Aktivität und beeinflusst die SDH-Spiegel im Gehirn von Ratten (Campos-Barros et al., 1994; Eravci et al., 2000). Bislang wurde nicht untersucht, inwieweit Antidepressiva die Aktivität spezifischer SDH-Transporter tangieren, obwohl eine solche Aktivität ursächlich für einen veränderten SDH-Spiegel sein könnte.

3. Zielstellung

Mutationen im SDH-Transporter MCT8 führen zum AHDS, einer schweren X-chromosomalen mentalen Retardation. Durch funktionelle Analysen von pathogenen Mutationen in MCT8 kann ein besseres Verständnis des Phänotyps erreicht werden. Um die phänotypischen Unterschiede zwischen AHDS-Patienten und Mct8-defizienten Mäusen zu erforschen, werden die Expressionsmuster der SDH-Transporter Lat1 und Lat2 im Gehirn der Maus untersucht. Der experimentelle Vergleich verschiedener Substrate von MCT8 und die EDV-basierte Erstellung eines Strukturmodells sollen weitergehende Erkenntnisse zum Funktionsmechanismus von SDH-Transportern liefern.
Ob das trizyklische Antidepressivum Desipramin einen Einfluss auf die T_3-Transport-aktivität von MCT8 hat und somit möglicherweise die SDH-Spiegel im Gehirn beeinflusst, wird in einem nächsten Schritt versucht zu klären.

Im Wesentlichen konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die folgenden vier Punkte:
(1) die Etablierung eines Expressionssystems zur biochemischen und molekularbiologischen Untersuchung von MCT8 und des MCT8-abhängigen SDH-Transports. Es sollen die bei AHDS-Patienten nachgewiesenen MCT8 Mutationen funktionell charakterisiert werden.
(2) die vergleichende Analyse der Expressionsmuster von Lat-Transportern im Gehirn der Maus, um festzustellen, ob diese alternativen SDH-Transporter das Fehlen von Mct8 im Mausmodell kompensieren. Dazu ist es notwendig, vorher geeignete Antikörper gegen Lat1 und Lat2 zu entwickeln.
(3) die Durchführung systematischer Untersuchungen zur Charakterisierung eines MCT8 Substrats, um Rückschlüsse auf weitere MCT8 Substrate zu erhalten. Zudem sollen potenziell am Transport beteiligte Aminosäuren im MCT8-Transporter funktionell betrachtet und ein erstes MCT8 Strukturmodell erstellt werden.
(4) die Untersuchung des Einflusses des trizyklischen Antidepressivums Desipramin auf den T_3-Transport durch MCT8.

4. Methoden

4.1 T_3-Aufnahmeassay

Für die Etablierung eines T_3-Aufnahmeassays untersuchten wir zunächst verschiedene Zelllinien hinsichtlich ihrer basalen T_3-Aufnahme. Dafür wurden diese über definierte Zeiträume mit dem radioaktiven Tracer ^{125}I-T_3 inkubiert. Um die extrazelluläre Radioaktivität zu minimieren, folgten nach der Abnahme des Tracers ein Waschschritt mit eiskaltem Salzpuffer und anschließend die Lyse der Zellen mittels Natronlauge. Über einen Gamma-Counter wurde die Menge an intrazellulärem T_3 bestimmt.
Die beiden Zelllinien MDCK1 (Madin-Darby Nierenzelllinie aus dem Hund) und JEG1 (humanes Chorionkarzinom) zeigten den geringsten basalen T_3-Transport und keine endogene MCT8 Expression. Für die Transportstudien wurden sie stabil mit dem humanen SDH-Transporter MCT8, dessen pathogenen Mutanten und dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert. Nach Kontrolle der Proteinexpression einzelner Zellklone mittels Western Blot wurden die Zellklone mit starker MCT8 Expression für die Transportassays verwendet. Bei der Optimierung des Transportassays ermittelten wir anhand des MCT8 Wildtyps (WT) die einzusetzende Zellzahl und die Menge an Tracer. Um den T_3-Transport durch MCT8 zu bestimmen, wurde von dessen Rohsignal die Aufnahme der mit dem Leervektor stabil transfizierten Zellen abgezogen. Die Studien erfolgten bei einer Inkubationszeit von drei Minuten unter maximalem Substrattransport, d.h. im linearen Aufnahmebereich (Abb. 4.1). Prozentual zum WT wurde die T_3-Aufnahme durch die MCT8 Mutanten angegeben und auf die relative Proteinexpression in der Zellmembran normiert.

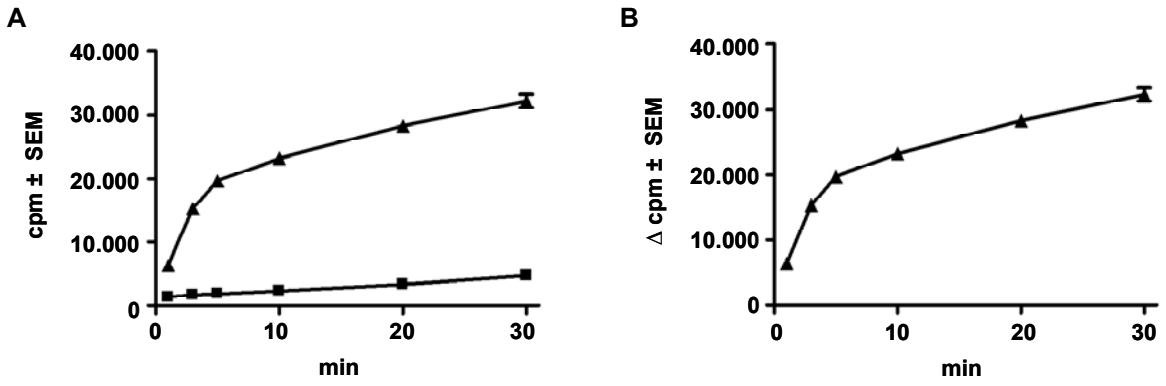

Abbildung 4.1: Zeitverlauf eines ^{125}I-T_3-Aufnahmeassays in stabil transfizierten MDCK1-Zellen mit MCT8 Wildtyp (▲) bzw. dem Leervektor pcDNA3.1 (■): A, Rohdaten der ^{125}I-T_3-Aufnahme. **B**, ^{125}I-T_3-Aufnahme vermittelt durch MCT8 Wildtyp (minus pcDNA3.1).

4.2 Biotinylierung von Zellmembranproteinen

Um die Zelloberflächenexpression der MCT8 Varianten mittels Western Blot in den stabil transfizierten MDCK1- und JEG1-Zellen nachzuweisen, wurde das Cell Surface Protein Isolation Kit (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet. Dabei konnten die Zellzahl und somit die Menge aller Reagenzien halbiert werden.

Im Folgenden wird das Prinzip des Experiments kurz umrissen: Zunächst wird ein chemisch aktiviertes Biotin kovalent an extrazelluläre Lysinreste membranständiger Proteine angefügt. Durch eine anschließende Zelllyse können die mit Biotin markierten Proteine über die Bindung an eine Avidinsäule vom restlichen Zelllysat separiert werden. Die Elution erfolgt über die Spaltung der Disulfidbindungen im Protein mittels Dithiothreitol (DTT) (Abb. 4.2). Danach wird das Eluat via Azeton präzipitiert, um die Zellmembranproteine vom DTT zu trennen, welches bei der folgenden Protein-konzentrationsbestimmung nach Bradford stören würde. Die Expression der MCT8 Mutanten und des WT wurden im gesamten Zelllysat und in der Membranfraktion spezifisch mit einem Antikörper gegen MCT8 mittels Western Blot nachgewiesen.

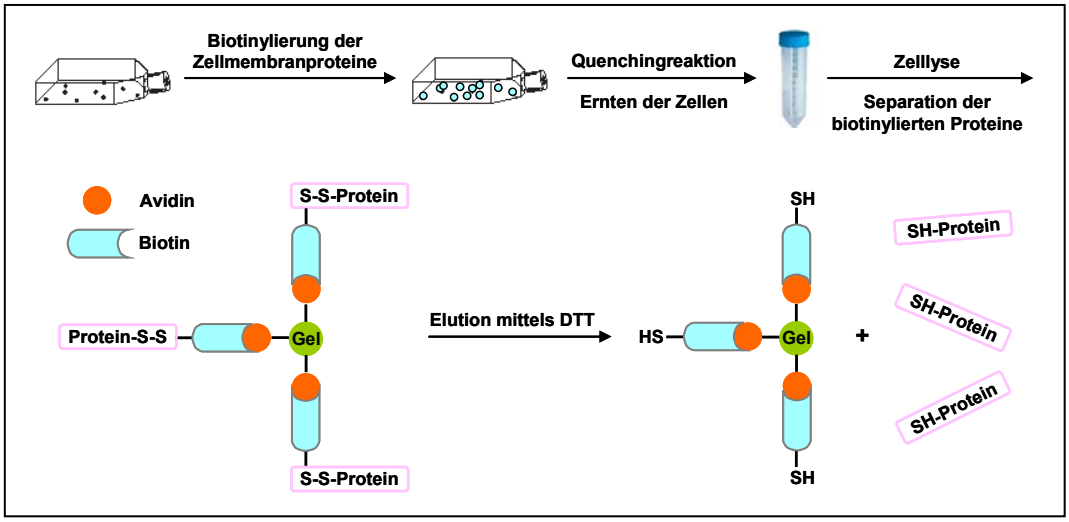

Abbildung 4.2: Isolierung von Zellmembranproteinen mittels Zelloberflächenbiotinylierung. Über die kovalente Bindung von Biotin an zelluläre membranständige Proteine können diese anschließend über eine Avidinsäule vom restlichen Zelllysat separiert und mittels DTT (Dithiothreitol) eluiert werden. Modifiziert nach Herstellerprotokoll (Cell Surface Protein Isolation Kit, Pierce, Rockford, USA).

4.3 Herstellung von Antiseren gegen Lat1 und Lat2

Die in dieser Arbeit für Expressionsanalysen von murinem Lat1 und Lat2 verwendeten Antikörper wurden in Kaninchen produziert (ImmunoGlobe, Himmelstadt, Deutschland).

Beide Antikörper erkennen Epitope am C-Terminus des Proteins mit folgenden Sequenzen: Lat1: MQVVPQET und Lat2: DPDSEEQP, wobei die Epitope nicht homolog zueinander sind. Durch die transiente Transfektion der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 mit den Plasmiden Lat1-pcDNA3.1 bzw. Lat2-pcDNA3.1 erfolgte der Nachweis der Spezifität verschiedener Testseren im Western Blot. Diese wurden für die Untersuchung der Expressionsprofile in Geweben der Maus angewendet.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung pathogener MCT8 Mutanten

Aufgrund der phänotypischen Variationen bei AHDS-Patienten wurden zwölf verschiedene *missense* Mutationen im SDH-Transporter MCT8 *in vitro* funktionell charakterisiert. Hierzu wurden die Expression und Translokation zur Zellmembran und die Aufnahme des Substrats T_3 bestimmt und verglichen. Die Mutanten ins235V, R271H und L568P zeigten in stabil transfizierten MDCK1-Zellen eine hohe T_3-Aufnahme. Eine effiziente Translokation, aber keine Substrataufnahme, wiesen hingegen die MCT8 Mutanten ins189I, A224V, S194F, ΔF230, L471P und L512P auf (Abb. 5.1).

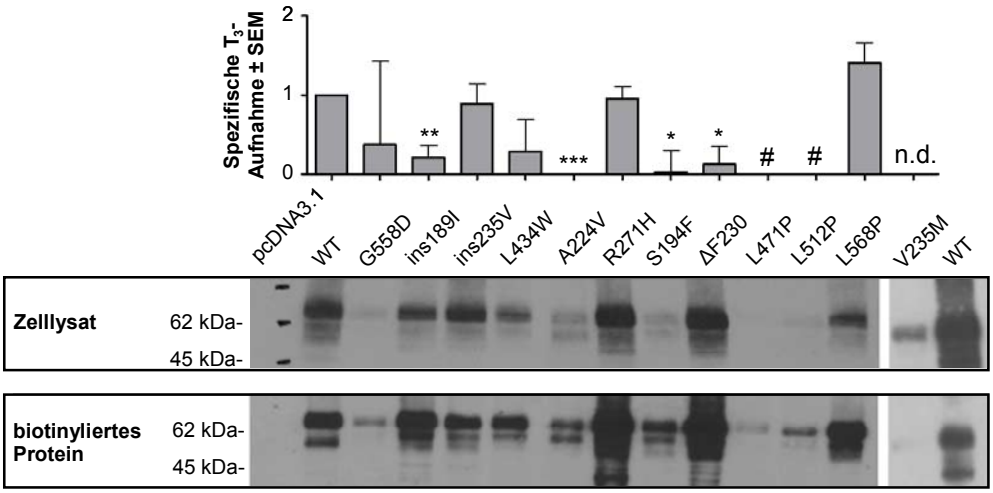

Abbildung 5.1: ^{125}I-T_3-Aufnahme und Zelloberflächentranslokation von MCT8 Varianten in stabil transfizierten MDCK1-Zellen. Durch die Normalisierung der T_3-Aufnahme relativ zur Zellmembranexpression wurde die spezifische T_3-Aufnahme der MCT8 Varianten bestimmt. Die MCT8 Expression wurde im gesamten Zelllysat und aufgereinigten biotinylierten Zellmembranproteinen mittels Western Blot nachgewiesen. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 Unterschied zum MCT8 Wildtyp (WT); n.d. nicht definiert (aufgrund der nicht nachzuweisenden Zellmembranexpression (V235M)); # negative Werte nach der Subtraktion der Hintergrundaufnahme. Modifiziert nach Kinne et al., 2009.

In der JEG1-Zelllinie ließ nur die MCT8 Mutante R271H einen aktiven Transport von T_3 erkennen. Bei den meisten pathogenen MCT8 Mutanten war keine aktive Substrataufnahme nachweisbar, obwohl sie an der Zelloberfläche lokalisiert waren (ins189I, V235M, A224V, S194F, ΔF230, L471P, L512P).
Einige MCT8 Mutanten befinden sich in beiden Zellsystemen effizient in der Zellmembran, zeigen jedoch keine T_3-Transportaktivität, z.B. ins189I, A224V und ΔF230. Unterschiede zwischen beiden Zellsystemen in der spezifischen Aufnahme von T_3 sind durch die Translokation in der Zellmembran oder durch eine Proteindegradierung begründet. Dieser Effekt wurde bei der in JEG1-Zellen inaktiven L568P Mutante, welche in MDCK1-Zellen einen aktiven T_3-Transport aufweist, erkannt. Im JEG1-Zellsystem ist die Mutante ins235V zum Teil an der Zelloberfläche exprimiert, zeigt aber auch partiell degradiertes Protein. Dabei ist sie in MDCK1-Zellen effizient in der Zellmembran lokalisiert (Kinne et al., 2009).

5.2 Struktur-Funktionsanalysen am MCT8

5.2.1 Strukturelle Eigenschaften eines MCT8 Substrats

Mögliche strukturelle Determinanten am Substrat, die durch MCT8 erkannt werden, sind die funktionellen Gruppen und die jodierten Ringe des Thyroningerüstes (Abb. 5.2.1A). Für die Charakterisierung eines MCT8 Substrats wurden Jodthyronine und Jodthyronin-Derivate kompetitiv zum ^{125}I-T_3 gegeben und deren Einfluss auf die MCT8-vermittelte T_3-Aufnahme bestimmt.
Im ersten Schritt untersuchten wir den Einfluss der Anzahl von Jodatomen am Jodthyroningerüst. Unter den L-Jodthyroninen zeigten nur 3,3`-Dijod-L-Thyronin (3,3`-T_2), 3,3`,5`-Trijod-L-Thyronin (rT_3), T_3 und T_4 eine starke Inhibition auf die T_3-Aufnahme. Dieses Resultat lässt vermuten, dass das Substrat mit einem Jodatom jeweils an der 3- und 3`-Position in beiden aromatischen Ringen durch MCT8 transportiert wird. Die L-Aminosäuregrundstruktur des Substrats erscheint notwendig für die Erkennung durch MCT8, da die D-Isomere der Jodthyronine keinen Einfluss auf den T_3-Transport erkennen ließen.
Im Folgenden wurden die funktionellen Gruppen, wie die Carboxyl- und die Aminogruppe, am Substrat analysiert. Thyronamine sind decarboxylierte Jodthyronine und weisen kein chirales Zentrum auf (Abb. 5.2.1C). Unter ihnen führte nur das T_1AM (3-Jodthyronamin) zu einer Verminderung der T_3-Aufnahme. Die SDH-Derivate ohne

Aminogruppe und chiralem Zentrum wie TRIAC (3,3`,5-Trijodthyroessigsäure) (Abb. 5.2.1D) und TETRAC (3,3`,5,5`-Tetrajodthyroessigsäure) zeigten keine Inhibition des T_3-Transporters.

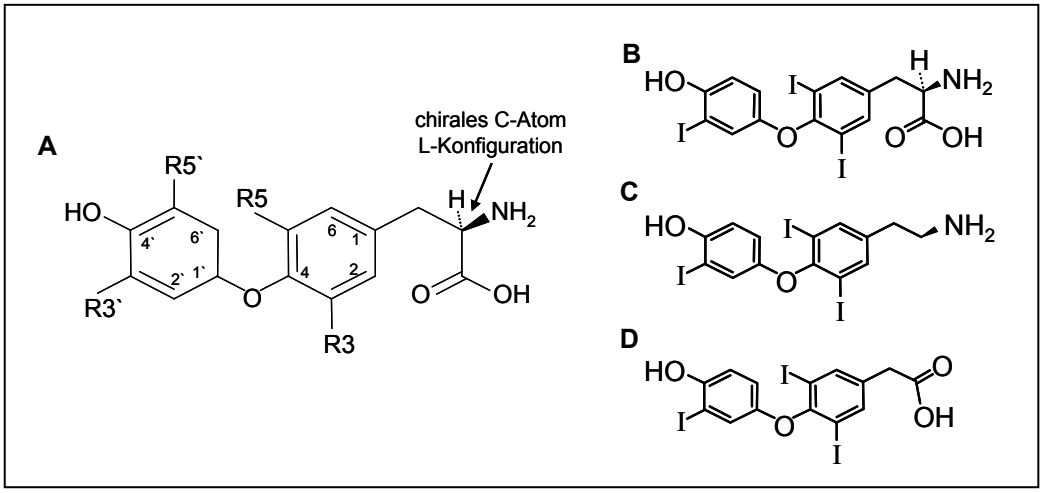

Abbildung 5.2.1: Strukturformel der Jodthyronine und deren Derivate sowie die strukturellen Eigenschaften eines MCT8 Substrats. A, Allgemeine Strukturformel der Jodthyronine, bei denen ein Jodatom an der 3- und 3`- Position und die L-Konfiguration als wichtig für ein MCT8 Substrat identifiziert wurden. **B-D**, Strukturformeln von **B**, $T_3$ (3,3`,5-Trijod-L-Thyronin), **C,** T_3AM (3,3`,5-Trijodtyronamin) und **D**, TRIAC (3,3`,5-Trijodthyroessigsäure).

Zusätzlich wurde der Einfluss der beiden Flavonoide EMD21388 und Naringenin auf die MCT8-vermittelte T_3-Aufnahme untersucht. Beide Substrate binden TTR (Transthyretin) und konkurrieren somit um die Bindung mit T_4. Da auch hier kein Inhibitionseffekt nachzuweisen war, werden Moleküle, die keine Jodthyronine darstellen, vermutlich nicht von MCT8 transportiert (Kinne et al., 2010).

5.2.2 Interaktionen von MCT8 mit dem Substrat

Die Untersuchungen des SDH-Transporters MCT8 wiesen darauf hin, dass die sterische Anordnung der Carboxyl- und der Aminogruppe für die Substraterkennung von entscheidender Bedeutung ist. Daher analysierten wir den Transporter hinsichtlich geladener Aminosäuren im Transmembranbereich. Das Alignment der Sequenzen aller Mitglieder der MCT-Familie zeigte ein konserviertes Arginin (R445) in der TMH8. Zudem fanden wir in der TMH10 ein Aspartat (D498), welches bei MCT8 und MCT10 konserviert ist.

Um die Relevanz beider Aminosäuren für den Substrattransport zu bestimmen, wurden sie jeweils zu Alanin mutiert. Die mit beiden Konstrukten stabil transfizierten MDCK1-

Zellen nahmen kein T_3 auf. Eine direkte Messung der T_3-Aufnahme mittels LC-MS/MS (Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie) bestätigte den Verlust der T_3-Transportaktivität.

Anhand dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese beiden geladenen Aminosäuren mit dem Aminosäuregerüst interagieren, und folglich die entsprechenden Alaninmutanten T_3AM oder TRIAC als Substrat akzeptieren könnten. Unsere Messungen über LC-MS/MS zeigten auch hier keinen aktiven Transport. Diese Ergebnisse demonstrieren die essentielle Bedeutung beider geladener Aminosäuren im Transmembranbereich von MCT8 für den Transport von Jodtyroninen (Kinne et al., 2010).

5.2.3 Erstellung eines ersten MCT8 Strukturmodells

Basierend auf der Kristallstruktur des bakteriellen Glycerol-3-Phosphat-Transporters (GlpT, Protein Data Bank (PDB) code 1PW4 (Huang et al., 2003)) wurde zusammen mit Dr. Gunnar Kleinau und Dr. Gerd Krause (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin) ein erstes Homologiemodell für MCT8 erstellt (Abb. 5.2.3).

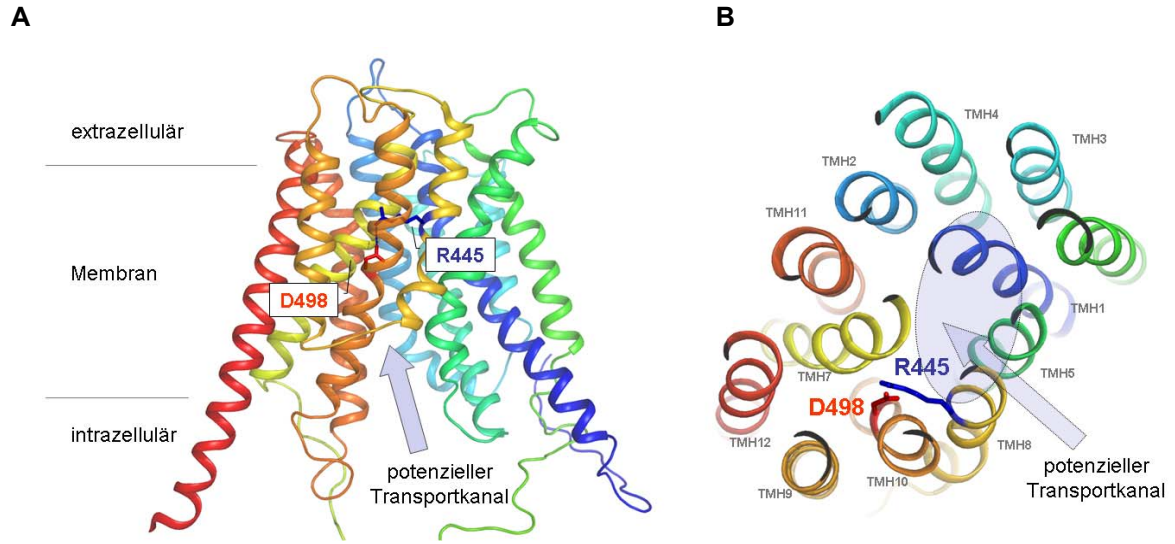

Abbildung 5.2.3: Strukturmodell des humanen SDH-Transporters MCT8. Das Homologiemodell für MCT8 basiert auf der Kristallstruktur des bakteriellen Glycerol-3-Phosphat-Transporters. **A**, Lokalisation der beiden geladenen und potenziell am Substrattransport beteiligten Aminosäuren R445 (blau, Transmembranhelix 8 (TMH8))und D498 (rot, TMH10) im MCT8 Strukturmodell. **B**, R445 und D498 flankieren den potenziellen Kanal für den Substrattransport und interagieren im Modell miteinander. Modifiziert nach Kinne et al., 2010.

Die geladene Seitenkette von R445 zeigt in diesem Modell zum potenziellen Substratkanal des Transporters. Vermutlich könnte dieses Arginin mit einer negativ geladenen Seitenkette des Substrats interagieren. Die Aminosäure D498 liegt in einer Position, die auch eine Interaktion mit der Aminogruppe des L-Jodthyronins erlauben würde.

Das Modell legt einen weiteren Zusammenhang nahe: Eine Salzbrücke zwischen den beiden Aminosäuren R445 und D498 wurde bei der Moleküldynamikrechnung spontan ausgebildet. Man könnte daraus schließen, dass beide geladenen Reste bei Helix-Helix-Interaktionen für den Transportmechanismus eine wesentliche Funktion ausüben (Kinne et al., 2010).

5.3 Schilddrüsenhormontransporter im Gehirn der Maus

Die Analyse per qPCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) offenbarte, dass die mRNA (messenger-Ribonukleinsäure)-Konzentrationen für Mct8, Mct10, Lat1, Lat2 und Oatp1c1 in unterschiedlichen Entwicklungsstadien im Gehirn der Maus charakteristische Unterschiede aufweisen. In geringeren Konzentrationen waren Slco4c1 (solute carrier organic anion transporter family, member 4a1) und Slco4a1 nachweisbar (Braun, Kinne et al., 2011). Daher wollten wir in einem nächsten Schritt die entsprechenden Proteinexpressionen in verschiedenen Zelltypen im Gehirn der Maus vergleichen.

Dazu haben wir Antikörper gegen Lat1 und Lat2 entwickelt und im Western Blot getestet. Die Spezifität beider Antikörper konnte in transient transfizierten HEK293-Zellen gezeigt werden (Abb. 5.4.1A). Zudem belegten immunhistochemische Färbungen der Niere der Lat2-defizienten Maus, dass der Lat2 Antikörper spezifisch ist (Abb. 5.4.1B) (Braun, Kinne et al., in Vorbereitung).

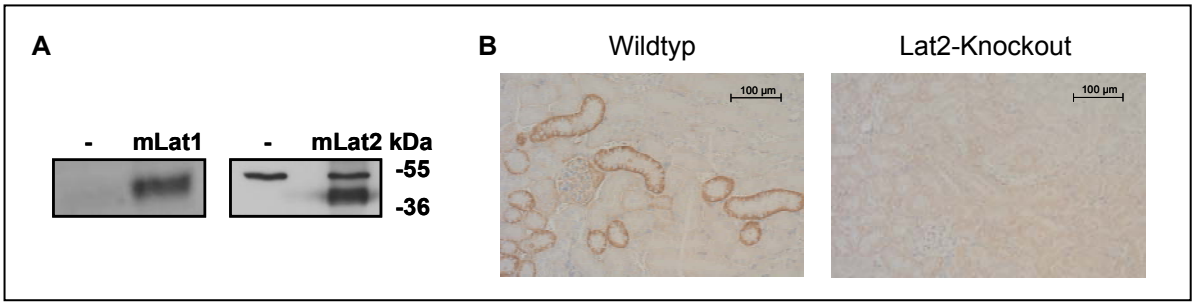

Abbildung 5.4.1: Spezifikation der Lat1 und Lat2 Antikörper. A, Western Blots mit untransfizierten (-) oder mit Lat1-pcDNA3.1 (Lat1) bzw. Lat2-pcDNA3.1 (Lat2) transient transfizierten HEK293-Zellen. **B**, Immunhistochemische Färbungen der Niere von Wildtyp bzw. Lat2-Knockout-Mäusen.

Im Cortex und Cerebellum der Maus wiesen wir anhand von Western Blots die Expression von Mct8, Lat1 und Lat2 nach. In primären murinen Neuronen sind diese drei SDH-Transporter exprimiert, was sich in immunhistochemischen Färbungen zeigte.
Um den Einfluss der SDH-Spiegel auf die SDH-Transporterexpression in der Maus zu testen, wurde deren Regulation in Geweben wie Cortex, Leber und Niere aus hyper- bzw. hypothyreoten adulten Mäusen mittels Western Blot analysiert. Eine verringerte Expression von Mct8 konnte in der Leber von hypothyreoten Tieren gezeigt werden, in hyperthyreoten Mäusen kam es zu einer leichten Zunahme (Abb. 5.4.2).

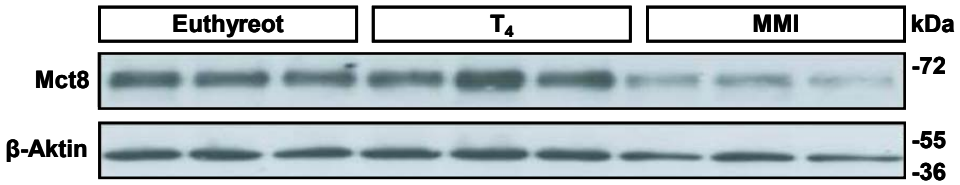

Abbildung 5.4.2: Regulation der Mct8 Expression in der Leber in hyper- (T_4) bzw. hypothyreoten (MMI, Methimazol) Mäusen. Der Expressionsnachweis von Mct8 erfolgte anhand von Western Blots, wobei β-Aktin als Ladungskontrolle des Gels verwendet wurde. Modifiziert nach Braun, Kinne et al., 2011.

In hyperthyreoten Mäusen war keine Regulation der Mct8 Expression in der Niere und nur eine gering verminderte Mct8 Expression im Cortex nachweisbar. Die SDH-Transporter Lat1 und Lat2 waren durch niedrige bzw. hohe SDH-Spiegel in ihrer Expression nicht verändert (Braun, Kinne et al., 2011).

5.4 Desipramin und Schilddrüsenhormone

Da mit dem trizyklischen Antidepressivum Desipramin behandelte Ratten Veränderungen im SDH-Spiegel des Gehirns zeigen, vermuteten wir, dass Desipramin einen Inhibitor von MCT8 darstellt. Tatsächlich konnten wir anhand des ^{125}I-T_3-Aufnahme-assays eine Inhibition des T_3-Transports durch Desipramin in Wildtyp-Neuronen der Maus von über 50 Prozent nachweisen. Die Substrataufnahme durch Mct8-defiziente Neurone hatte keine signifikante Inhibition, was einen primären Effekt auf den T_3-Transport durch Mct8 bestätigte.
Um den Einfluss von Desipramin auf humane SDH-Transporter zu untersuchen, wurden mit MCT8 und MCT10 stabil transfizierte MDCK1-Zellen verwendet. Einen signifikanten Inhibitionseffekt auf den T_3-Transport bestimmten wir bei beiden Transportern (MCT8: 75 Prozent, MCT10: 40 Prozent, bei 1mM Desipramin). Die anschließende Ermittlung

der Inhibitionskonstanten (K_i) von Desipramin auf die T_3-Aufnahme ergab bei MCT8 495µM und bei MCT10 390µM.
Für die Feststellung des Inhibitionsmodus von Desipramin auf MCT8 wurde die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) für T_3 von MCT8 bei verschiedenen Desipraminkonzentrationen bestimmt. Die nach dem Eadie-Hofstee-Plot erhaltenen Geraden verliefen parallel, was einen nicht-kompetitiven Inhibitionsmodus von Desipramin auf den T_3-Transport durch MCT8 zeigt (Roth & Kinne et al., 2010).

6. Diskussion

6.1 Molekulare Pathologie von Mutationen in MCT8

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, unterscheiden sich die Phänotypen von AHDS-Patienten teilweise erheblich. Der folgende Abschnitt skizziert mögliche Ansätze zur Klärung der Ursachen.
Einige der AHDS-Patienten können elementare Grundlagen von Sprache erlernen oder eigenständig gehen (Schwartz et al., 2005). Diese milderen Mutationen S194F, L434W und L568P ließen uns eine vorhandene, aber verminderte T_3-Transportaktivität vermuten. Um den Pathomechanismus dieser und anderer MCT8 Mutationen genauer zu verstehen, haben wir zwölf bekannte *missense* Mutationen hinsichtlich ihrer T_3-Aufnahme und Translokation in der Zellmembran in zwei stabil transfizierten Zellsystemen charakterisiert: den JEG1- und den MDCK1-Zellen. Bei allen drei Mutationen bestätigte sich die Annahme in Bezug auf den geringeren T_3-Transport (Kinne et al., 2009). Auch andere Studien in JEG3-Zellen legen diesen Schluss nahe (Jansen et al., 2008). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Korrelation des Phänotyps mit der Restaktivität von MCT8 als T_3-Transporter hin.
Im Hinblick auf die Lokalisation in der Zellmembran ergab sich folgendes Bild: Einige der MCT8 Mutationen zeigten keine und andere eine verminderte T_3-Aufnahme, obwohl sie effizient in der Zellmembran lokalisiert waren. Verglichen mit dem WT erhöhte sich der Substrattransport der Mutante R271H in JEG1-Zellen, was in ähnlichen Transportuntersuchungen bereits belegt wurde (Jansen et al., 2007). Bei den aktiven MCT8 Mutanten ins235V, R271H und L568P in MDCK1-Zellen bestimmten wir K_M-Werte für T_3, die mit dem des WT vergleichbar sind (Kinne et al., 2009). Die Resultate lassen darauf schließen, dass bisher als inaktiv angesehene MCT8 Mutanten als T_3-

Transporter funktionell sein könnten, wenn sie effizient in der Zellmembran lokalisiert würden.

Zudem wurde von uns erstmals nachgewiesen, dass das Ausmaß der Translokation von MCT8 Mutanten in der Zellmembran ein zelltypspezifischer Vorgang ist. Diese Beobachtung liefert einen möglichen Erklärungsansatz für die fehlende Korrelation der T_3-Spiegel im Plasma mit der mentalen Entwicklung der AHDS-Patienten (Friesema et al., 2006). Unterschiede in der T_3-Transportaktivität zwischen beiden Zellsystemen wie bei den Mutationen R271H, L568P und ins235V können durch eine verminderte Proteinexpression, Zelloberflächenexposition oder Substrataffinität des membranständigen Transporters begründet sein. Die benutzten Zelllinien – die humane Plazentazelllinie JEG1 und die Nierenzelllinie MDCK1 aus der Spezies Hund – sind epithelial und zeigen eine epitheltypische Polarität der Zellkörper. Überdies haben die Differenzierungsgrade im verwendeten Zellsystem Einfluss auf posttranslationale Modifikationen wie auf N-Azetylierungs- und Phosphorylierungsstellen. Diese wirken auf die Faltung, Stabilität und die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle.

Die zellulären Chaperone und ERAD-Komponenten bei Neuronen, Hepatozyten und thyrotrophen Zellen der Hypophyse unterscheiden sich, was möglicherweise eine andere Funktionalität der MCT8 Mutationen im jeweiligen Zellsystem zur Folge hat. Wir vermuten, dass die mentalen Einschränkungen des Betroffenen nicht so schwer ausfallen, wenn z.B. der T_3-Spiegel sehr hoch ist und veränderte MCT8 Proteine teilweise in Neuronen, aber nicht in der Hypophyse funktionell sind. Wenn umgekehrt MCT8 in Neuronen nicht funktionell ist und der T_3-Spiegel sich im Plasma normal zeigt, werden die mentalen Einschränkungen wahrscheinlich erheblich ausfallen.

6.2 Enges Substratspektrum von MCT8

Auf Grundlage der phänotypischen Unterschiede zwischen AHDS und CH wird spekuliert, dass MCT8 am Transport eines nicht identifizierten Moleküls beteiligt sein könnte, dessen Fehlen die drastischen neurologischen Defekte auslöst. Um die Eigenschaften der durch MCT8 transportierten Substrate zu bestimmen, wurden systematisch Jodthyronine und deren verwandte Substanzen untersucht. Alle Substanzen weisen die Aminosäure Tyrosin bzw. das Thyronin als Basisstruktur auf. Sie unterscheiden sich in ihrer Anzahl an Jodatomen und deren Position sowie dem Vorhandensein funktioneller Gruppen wie der Carboxyl- und der Aminogruppe. Trotz

großer Homologie zum MCT10 zeigt MCT8 keinen Transport von aromatischen Aminosäuren (Friesema et al., 2003; Friesema et al., 2008), was vermuten lässt, dass MCT8 spezifisch gegenüber der Thyroninstruktur ist. In der vorliegenden Arbeit konnten wir belegen, dass das Substratspektrum von MCT8 sehr eng ist und sowohl die L-Aminosäurekonfiguration als auch die 3,3'-Dijodthyroninstruktur verlangt (Kinne et al., 2010).

Für AHDS-Patienten gibt es bis heute keine wirksame Therapie (Biebermann et al., 2005; Wemeau et al., 2008; Di Cosmo et al., 2009). Ein neuer und viel versprechender Ansatz könnte die Behandlung mit dem SDH-Analogon DITPA sein, einem Agonisten am T_3-Rezeptor. An der Mct8-defizienten Maus wurde die thyromimetische Wirkung von DITPA gezeigt (Di Cosmo et al., 2009). Bei unserer Untersuchung potenzieller MCT8 Substrate fanden wir heraus, dass DITPA kein Substrat für MCT8 darstellt und somit über noch unbekannte Transporter in die Zelle aufgenommen wird (Kinne et al., 2010).

Unsere Substratanalysen an MCT8 lassen zudem vermuten, dass MCT8 im Vergleich zu den T_3-Rezeptoren, Dejodasen und anderen Plasmatransportproteinen am selektivsten ist. Substanzen, die nicht durch MCT8 transportiert werden wie DITPA oder das Flavonoid EMD21388 binden am T_3-Rezeptor bzw. an das Plasmatransportprotein TTR (Köhrle et al., 1988; Mendel et al., 1992; Duan et al., 1995; Adamson et al., 2004). EMD21388 ist ein synthetisches T_4-Analogon und zeigt verglichen mit T_3 eine geringere Affinität zum T_3-Rezeptor (Köhrle et al., 1988; Hofmann et al., 2009).

Die von uns untersuchten decarboxylierten Jodthyronine, die Thyronamine, sind Substrate der Dejodasen (Piehl et al., 2008). Unter den Thyronaminen inhibierte nur das T_1AM die T_3-Aufnahme vermittelt durch MCT8, was auch andere Transportuntersuchungen bestätigen (Ianculescu et al., 2010). Eine Aufnahme von T_1AM mittels LC-MS/MS konnten wir hingegen nicht zeigen. Überdies werden weder rT_3 noch TRIAC von MCT8 als Substrat akzeptiert. Beide Moleküle sind jedoch potenzielle Inhibitioren von Dejodasen und binden an TBG (Thyroxin-bindendes Globulin) (Köhrle et al., 1986).

Zusätzlich unterscheiden sich SDH-Transporter, T_3-Rezeptoren und Dejodasen im Hinblick auf die Substrataffinitäten gegenüber SDH. Die Serumkonzentrationen von totalem (freiem und gebundenem) T_4 beträgt 90nM und totalem T_3 2nM (Schussler, 2000). Davon sind 99,9 Prozent des T_4 und 99,0 Prozent des T_3 an spezifische Plasmatransportproteine gebunden: an TBG, TTR und Albumin.

Die K_M-Werte für SDH-Transporter liegen im Vergleich zum nanomolaren Bereich der Bindungskonstanten (K_D) für T_3-Rezeptoren im mikromolaren Bereich (Samuels et al., 1976; Shanker et al., 1981; Friesema et al., 2001; Friesema et al., 2003; Hagenbuch, 2007). Da SDH über spezifische Transporter intrazellulär verfügbar ist, scheinen die K_M-Werte im mikromolaren Bereich verglichen mit den freien T_3- und T_4-Serumkonzentrationen erklärbar – sie transportieren SDH demzufolge bei einer maximalen Geschwindigkeit.

Die niedrigen K_D-Werte für T_3-Rezeptoren weisen auf eine hohe Bindungsaffinität gegenüber SDH hin. Damit diese dauerhaft besteht, ist ihr K_D-Wert im nanomolaren Bereich zu finden, da die T_3-Serumkonzentration ebenfalls hier liegt. Die K_M-Werte der Dejodasen hingegen sind im mikromolaren (Dio1 und Dio3) und nanomolaren Bereich angesiedelt (Dio2) (Köhrle, 1999). Alle drei Selenoenzyme regulieren den intrazellulären SDH-Gehalt. Verglichen mit den freien T_3- und T_4-Konzentrationen erweisen sich die K_M-Werte der Dejodasen als relativ hoch. So zeigt z.B. der hohe K_M-Wert der Dio2 (1 bis 2nM) (Köhrle, 1999) in Bezug auf die Serumkonzentration des freien T_4, dass die Dio2 eine hohe Affinität gegenüber SDH besitzt.

6.3 Beteiligung der Aminosäuren R445 und D498 am Substrattransport durch MCT8

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen aller MCT-Familienmitglieder zeigte, dass die von uns untersuchte geladene Aminosäure R445 im Transmembranbereich hoch konserviert ist. R445 übt daher möglicherweise eine spezifische Funktion während des Transportvorgangs aus. Die Aminosäure D498 ist nur bei MCT8 und MCT10 konserviert. Innerhalb der MCT-Familie transportieren nur diese beiden Vertreter Jodthyronine und/oder aromatische Aminosäuren. Eine Ladungsänderung durch die Mutation beider Aminosäuren zum Alanin in MCT8 führte zum Verlust des T_3-Transports, obwohl diese Mutanten in der Zellmembran lokalisiert waren (Kinne et al., 2010).

In einem weiteren Schritt haben wir anhand eines erstellten MCT8 Strukturmodells die Lage beider geladenen Aminosäuren im Transporter analysiert. Als Vorlage für unser MCT8 Modell diente die Kristallstruktur des GlpT, die auch für andere Mitglieder aus der MFS-Familie wie MCT1, den Glukose-Transporter 1 und Oatp1c1 verwendet wurde (Manoharan et al., 2006; Westholm et al., 2010). Die Seitenketten beider Aminosäuren sind im Modell dem potenziellen Substratkanal zugewandt, was unsere experimentellen

Daten bestätigte. Unser Strukturmodell legt weiterhin eine potenzielle Salzbrücke zwischen beiden Aminosäureseitenketten nahe. Diese wird möglicherweise während des Substrattransports gebildet. Ähnliches lässt sich bei den geladenen Aminosäuren R306 und D302 in der TMH8 in MCT1 beobachten. Vermutlich spielen sie in Helix-Interaktionen oder der Substraterkennung eine Rolle (Manoharan et al., 2006).

Die Kristallstruktur der ligandenbindenden Domäne des T_3-Rezeptors (PDB code 3GWS) gibt detaillierte Einblicke in die Substratbindung (Nascimento et al., 2006). Um weitere in Substratinteraktionen involvierte Aminosäuren in MCT8 zu identifizieren, haben wir den potenziellen Substratkanal in unserem MCT8 Strukturmodell mit der Substratbindungstasche des T_3-Rezeptors verglichen. Die Anordnung der Aminosäuren in der Substratbindungstasche könnte ein typisches T_3-Bindungsmuster darstellen. Umgeben von hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren bindet T_3 über Wasserstoffbrücken an ein Arginin (R282) und ein Histidin (H435). Weitere Untersuchungen an unserem MCT8 Strukturmodell legen nahe, dass zwei Histidine (H192, H415) und drei positiv geladene Seitenketten (R445, K418, R301) in den Substratkanal ragen. Alignments innerhalb der MCT-Familien zeigten, dass die Aminosäure R301 (TMH5) in den humanen MCTs 1 bis 13 und das Histidin H415 (TMH7) in den MCTs 8, 10, 11 und 13 konserviert sind.

Die Ladungen der genannten Aminosäuren im potenziellen Substratkanal von MCT8 sind mit denen im untersuchten T_3-Rezeptor vergleichbar. Ihre Funktion sollte in weiterführenden experimentellen Arbeiten untersucht werden, wobei ihre Mutation Ladungsänderungen im potenziellen Transportkanal einbringen könnten. Ihre funktionelle Charakterisierung würde möglicherweise zur Identifizierung weiterer mit dem Substrat interagierender Aminosäuren führen.

Zusätzlich sollten die experimentellen Daten mit den aus dem MCT8 Strukturmodell abgeleiteten Voraussagen verglichen werden. Dadurch könnte das Modell bestätigt oder in Frage gestellt und entsprechend verbessert werden.

6.4 Expressionsmuster von Schilddrüsenhormontransportern im Gehirn der Maus

Einen Erklärungsansatz für die phänotypischen Unterschiede zwischen Mct8-defizienten Mäusen und AHDS-Patienten geben möglicherweise die vorliegenden Ergebnisse: Im Gegensatz zum Menschen können Mäuse das Fehlen von Mct8 durch alternative SDH-Transporter kompensieren. Es wurde gezeigt, dass Lat2 in den

Neuronen und auch in den Astrozyten der Maus schon während der embryonalen Entwicklung vorkommt, während die LAT2 Expression in hippokampalen Neuronen beim Menschen erst postnatal beginnt (Wirth et al., 2009).
Die Expression von Lat1 und Lat2 im Gehirn der Maus haben wir in unseren Untersuchungen mit selbst entwickelten Antikörpern nachgewiesen. In primären Astrozyten sind neben Mct8 auch Lat1 und Lat2 koexprimiert, was sich mit den qPCR-Daten deckt. Zudem führte die genetische Inaktivierung von Lat2 in der Maus zu einer Reduktion der T_3-Aufnahme in den Astrozyten (Braun, Kinne et al., 2011). So scheint neben Mct8 auch Lat2 beim T_3-Transport in Astrozyten sowie bei der SDH-Versorgung im Gehirn der Maus essentiell zu sein. Ein Mausmodell aus der Kreuzung von Lat2-defizienten Mäusen mit Mct8-defizienten Mäusen könnte darüber näheren Aufschluss geben.
Zusätzlich haben wir die Regulation der Transporter Mct8, Lat1 und Lat2 durch den SDH-Spiegel in verschiedenen Geweben der Maus analysiert (Braun, Kinne et al., 2011). Eine verringerte Expression von Mct8 konnte in der Leber von hypothyreoten Tieren gezeigt werden, wohingegen es zu einer leichten Zunahme in hyperthyreoten Mäusen kam. Diese Regulation in der Leber könnte vor einer hepatischen Inaktivierung durch zirkulierende SDH schützen. Eine gering verminderte Expression von Mct8 war im Cortex hyperthyreoter Mäuse nachweisbar, was im homöostatischen Mechanismus begründet sein könnte, der das Gehirn vor zu hohen SDH-Spiegeln schützt. Durch die Homöostase – die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts des inneren Milieus des Körpers – werden z.B. die Körpertemperatur und der Hormonhaushalt gesteuert. Untersuchungen an Dio2-defizienten Mäusen unterstreichen die Bedeutung homöostatischer Mechanismen für die Regulation der T_3-Spiegel im Serum oder der T_4-Spiegel im Gehirn (Galton et al., 2007).

6.5 Einfluss von Desipramin auf den Transport von Schilddrüsenhormonen

Es ist bekannt, dass die Verabreichung des trizyklischen Antidepressivums Desipramin die Dio2 Expression im Gehirn von Ratten stimuliert (Campos-Barros et al., 1994). Zudem wurde 2003 gezeigt, dass Desipramin die T_4-Konzentration im Gewebe verringert (Pinna et al., 2003).
Die vorliegende Arbeit veranschaulichte erstmals, dass der T_3-Transport von murinem und humanem MCT8 durch Desipramin signifikant beeinflusst wird. Zusätzlich konnten

wir eine Inhibition von Desipramin auf die T_3-Aufnahme durch humanen MCT10 feststellen (Roth & Kinne et al., 2010). In anderen Untersuchungen beeinflusste Desipramin die Aktivität der Lat-Transporter (Ritchie et al., 2001; Taylor und Ritchie, 2007). Neben MCT8 sind auch die Lats entlang der BHS, in Neuronen und Astrozyten exprimiert (Kido et al., 2001; Roberts et al., 2008a). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Desipramin auf verschiedene SDH-Transporter und damit auf unterschiedliche Zelltypen wirkt.

Zhou et al. haben die Kristallstruktur des bakteriellen Leucin-Transporters (LeuT) im Komplex mit Leucin und Desipramin bestimmt und konnten damit die strukturelle Grundlage der Wirkung von Antidepressiva ableiten. Durch die Bindung von Desipramin wird die extrazelluläre Öffnung des LeuT verschlossen. Es wird dabei von einer Haarnadelschleife (hairpin loop) und einer Salzbrücke gehalten und verhindert eine Konformationsänderung und somit den Substrattransport (Zhou et al., 2007). Demnach wäre eine extrazelluläre Bindung von Desipramin an MCT8 wie am LeuT vorstellbar.

MCT8 transportiert neben T_3 auch T_4 (Friesema et al., 2003). Wir vermuten, dass mittels Desipramin nicht ausschließlich der von uns nachgewiesene T_3-Transport, sondern auch der T_4-Transport über MCT8 inhibiert und die gezeigte Dio2 Expression im Gehirn von Ratten erhöht wird.

Auch im Mct8-defizienten Mausmodell wurde neben einer Veränderung der T_3- und der T_4-Spiegel eine erhöhte Dio2 Aktivität im Gehirn nachgewiesen (Dumitrescu et al., 2006; Trajkovic et al., 2007). Zudem zeigte sich, dass der Zugang von T_3 ins Gehirn vom Mct8-Transporter abhängig ist (Trajkovic et al., 2007). Diese Daten deuten daraufhin, dass durch die Desipramin-abhängige Reduktion des SDH-Transports über MCT8 die Dio2 Expression induziert werden könnte.

Desipramin besitzt eine hohe Affinität zu vesikulären Noradrenalin- und Serotonin-Transportern und zeigt auch Wirkung bei Patienten, bei denen SSRIs (selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer) versagen (Deupree et al., 2007). Es ist denkbar, dass dieser Effekt zusammen mit dem hemmenden Einfluss auf den SDH-Transport die beabsichtigte pharmakologische Wirkung entfaltet.

7. Ausblick

Bis heute gibt es keine wirksamen therapeutischen Verfahren, um die Schwere von AHDS zu mildern. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auch auf den komplexen Pathomechanismus zurückzuführen. Wie in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt, verhalten sich einige MCT8 Mutationen in verschiedenen Zellsystemen jeweils funktionell anders. Zudem würden AHDS-Patienten mit den Mutationen ins189I und A224V von einer Behandlung mit dem Ziel einer effizienteren Translokation in der Zellmembran nicht profitieren. Beide Mutationen zeigen trotz Membranexpression keinen aktiven T_3-Transport. Eine von MCT8 unabhängige Therapie könnte die Entwicklung synthetischer Liganden für T_3-Rezeptoren darstellen. Diese Liganden sollten die BHS und die neuronale Zellmembran durchqueren. Darüber hinaus könnten in zukünftigen Arbeiten pathogene Mutationen im MCT8 Strukturmodell dargestellt und durch parallele Aktivitätstests charakterisiert werden – woraus sich Hypothesen für die jeweiligen Pathomechanismen entwickeln ließen.

Unser MCT8 Modell bildet überdies eine Grundlage zur Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen in SDH-Transportern. Auf dieser Basis könnten in weiteren Studien andere am Substrattransport beteiligte Aminosäuren identifiziert und die Substratbindung in MCT8 näher beschrieben werden.

Für die Aufklärung des spezifischen SDH-Transports sind zusätzliche Analysen mit dem MCT8 Homologon MCT10 notwendig. Da MCT10 im Vergleich zu MCT8 neben SDH auch aromatische Aminosäuren transportiert, könnte die funktionelle Analyse von nicht konservierten Aminosäuren bei beiden Transportern Bereiche identifizieren, die direkt die Substratspezifität determinieren. Die Charakterisierung von Chimären aus den Transportern würde möglicherweise einen Anhaltspunkt für die Aufklärung der am SDH- bzw. Aminosäuretransport beteiligten Strukturen bilden.

Für ein besseres Verständnis des milderen neurologischen Phänotyps in der Mct8-defizienten Maus könnten Untersuchungen der Expressionslevel in der post- wie auch pränatalen Entwicklung der Maus bei weiteren SDH-Transportern helfen z.B. aus der Oatp-Familie. Vergleichbare Analysen an humanen SDH-Transportern würden vermutlich eine zusätzliche Grundlage für die phänotypischen Differenzen zwischen AHDS-Patienten und dem Mct8-defizienten Mäusen darstellen.

Wie in Kapitel 5.4 beschrieben, wiesen wir einen Inhibitionseffekt auf den MCT8-vermittelten T_3-Transport durch das Antidepressivum Desipramin nach. Zukünftig sollte

der Zusammenhang zwischen den SDH-Spiegeln im Gehirn und der Einnahme von Antidepressiva näher geprüft und die Wirkung auf andere SDH-Transporter, z.B. aus der Familie der Oatps, stärker in den Fokus gerückt werden.

8. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	Adenosin-5`-triphosphat (ATP)-Binding Cassette-Transporter
AHDS	Allan-Herndon-Dudley Syndrom
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CH	congenitale Hypothyreose
cpm	counts per minute
Dio1	Dejodase Typ 1
DITPA	3,5-Dijodthyropropionsäure
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation
GlpT	Glycerol-3-Phosphat-Transporter
HEK	humane embryonale Nierenzelllinie
JEG1	humane Chorionkarzinom-Zelllinie
K_D	Bindungskonstante
K_i	Inhibitionskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LAT	humaner L-Typ Aminosäure-Transporter
Lat	muriner L-Typ Aminosäure-Transporter
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie
MCT8	humaner Monocarboxylat-Transporter 8
Mct8	muriner Monocarboxylat-Transporter 8
MDCK1	Madin-Darby Nierenzelllinie aus dem Hund
MFS-Transporter	Major Facilitator Superfamilie-Transporter
min	Minuten
MMI	Methimazol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NTCP	Natrium-Taurocholat-cotransportierendes Peptid
OATP	humaner Organischer Anionen-Transporter
Oatp	muriner Organischer Anionen-Transporter
PDB	protein data bank
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion

rT_3	3,3`,5`-Trijod-L-Thyronin, reverses T_3
SDH	Schilddrüsenhormon
SEM	Standardfehler, Standard Error of the Mean
Slco4a1	solute carrier organic anion transporter family, member 4a1
SSRIs	selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
T_1AM	3-Jodthyronamin
3,3`-T_2	3,3`-Dijod-L-Thyronin
T_3	3,3`,5-Trijod-L-Thyronin
T_4	3,3`,5,5'-Tetrajod-L-Thyronin, Thyroxin
TAM	Thyronamin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TETRAC	3,3`,5,5`-Tetrajodthyroessigsäure
TMH	Transmembranhelix
TRIAC	3,3`,5-Trijodthyroessigsäure
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon, Thyrotropin
TTR	Transthyretin
WT	MCT8 Wildtyp

9. Literaturverzeichnis

Adamson C, Maitra N, Bahl J, Greer K, Klewer S, Hoying J, Morkin E. 2004. Regulation of gene expression in cardiomyocytes by thyroid hormone and thyroid hormone analogs 3,5-diiodothyropropionic acid and CGS 23425 [N-[3,5-dimethyl-4-(4'-hydroxy-3'-isopropylphenoxy)-phenyl]-oxamic acid]. J Pharmacol Exp Ther 311:164-171.

Alkemade A, Friesema EC, Unmehopa UA, Fabriek BO, Kuiper GG, Leonard JL, Wiersinga WM, Swaab DF, Visser TJ, Fliers E. 2005. Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. J Clin Endocrinol Metab 90:4322-4334.

Allan W, Herndon CN, Dudley FC. 1944. Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly. Am J Ment Defic 48:325-334.

Amaral MD. 2006. Therapy through chaperones: sense or antisense? Cystic fibrosis as a model disease. J Inherit Metab Dis 29:477-487.

Bernal J. 2005. The significance of thyroid hormone transporters in the brain. Endocrinology 146:1698-1700.

Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M. 2004. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. Trends Endocrinol Metab 15:222-228.

Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grueters A. 2005. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. Eur J Endocrinol 153:359-366.

Bonifacino JS, Weissman AM. 1998. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. Annu Rev Cell Dev Biol 14:19-57.

Braun D, Kinne A, Brauer AU, Sapin R, Klein MO, Kohrle 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.

Brockmann K, Dumitrescu AM, Best TT, Hanefeld F, Refetoff S. 2005. X-linked paroxysmal dyskinesia and severe global retardation caused by defective MCT8 gene. J Neurol 252:663-666.

Campos-Barros A, Meinhold H, Stula M, Muller F, Kohler R, Eravci M, Putzien O, Baumgartner A. 1994. The influence of desipramine on thyroid hormone metabolism in rat brain. J Pharmacol Exp Ther 268:1143-1152.

Cowen PJ. 2008. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? Trends Pharmacol Sci 29:433-436.

Deupree JD, Montgomery MD, Bylund DB. 2007. Pharmacological properties of the active metabolites of the antidepressants desipramine and citalopram. Eur J Pharmacol 576:55-60.

Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Weiss RE, Refetoff S. 2009. A thyroid hormone analog with reduced dependence on the monocarboxylate transporter 8 for tissue transport. Endocrinology 150:4450-4458.

Duan W, Richardson SJ, Kohrle J, Chang L, Southwell BR, Harms PJ, Brack CM, Pettersson TM, Schreiber G. 1995. Binding of thyroxine to pig transthyretin, its cDNA structure, and other properties. Eur J Biochem 230:977-986.

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.

Eravci M, Pinna G, Meinhold H, Baumgartner A. 2000. Effects of pharmacological and nonpharmacological treatments on thyroid hormone metabolism and concentrations in rat brain. Endocrinology 141:1027-1040.

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.

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, 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, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ. 2008. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. Mol Endocrinol 22:1357-1369.

Friesema EC, Visser WE, Visser TJ. 2010. Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. Mol Cell Endocrinol 322:107-113.

Galton VA, Wood ET, St Germain EA, Withrow CA, Aldrich G, St Germain GM, Clark AS, St Germain DL. 2007. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. Endocrinology 148:3080-3088.

Gekko K, Koga S. 1983. Increased thermal stability of collagen in the presence of sugars and polyols. J Biochem 94:199-205.

Hagenbuch B. 2007. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21:209-221.

Halestrap AP, Price NT. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. Biochem J 343 Pt 2:281-299.

Harris H, Mittwoch U, Robson EB, Warren FL. 1955. Phenotypes and genotypes in cystinuria. Ann Hum Genet 20:57-91.

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. Endocr Rev 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. Horm Res 67:1-6.

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.

Hofmann PJ, Schomburg L, Kohrle J. 2009. Interference of endocrine disrupters with thyroid hormone receptor-dependent transactivation. Toxicol Sci 110:125-137.

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.

Hypothyroidism und Collaborative. 1981. Effects of neonatal screening for hypothyroidism: prevention of mental retardation by treatment before clinical manifestations. New England congenital hypothyroidism collaborative. Lancet 2:1095-1098.

Ianculescu AG, Friesema EC, Visser TJ, Giacomini KM, Scanlan TS. 2010. Transport of thyroid hormones is selectively inhibited by 3-iodothyronamine. Mol Biosyst 6:1403-1410.

Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. 1994. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 91:133-137.

Jansen J, Friesema EC, Kester MH, Milici C, Reeser M, Gruters A, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Wemeau JL, Busi da Silva Canalli MH, Lundgren J, McEntagart ME, Hopper N, Arts WF, Visser TJ. 2007. Functional analysis of monocarboxylate transporter 8 mutations identified in patients with X-linked psychomotor retardation and elevated serum triiodothyronine. J Clin Endocrinol Metab 92:2378-2381.

Jansen J, Friesema EC, Kester MH, Schwartz CE, Visser TJ. 2008. Genotype-phenotype relationship in patients with mutations in thyroid hormone transporter MCT8. Endocrinology 149:2184-2190.

Kalliokoski A, Niemi M. 2009. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. Br J Pharmacol 158:693-705.

Kido Y, Tamai I, Uchino H, Suzuki F, Sai Y, Tsuji A. 2001. Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporters LAT1 and LAT2 and their pharmacological relevance at the blood-brain barrier. J Pharm Pharmacol 53:497-503.

Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H. 2001. Expression cloning of a Na+-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H+/monocarboxylate transporters. J Biol Chem 276:17221-17228.

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.

Kinne A, Roth S, Biebermann H, Kohrle J, Gruters A, Schweizer U. 2009. Surface translocation and tri-iodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. J Mol Endocrinol 43:263-271.

Köhrle J. 1999. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. Mol Cell Endocrinol 151:103-119.

Köhrle J. 2007. Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21:173-191.

Köhrle J, Auf'mkolk M, Rokos H, Hesch RD, Cody V. 1986. Rat liver iodothyronine monodeiodinase. Evaluation of the iodothyronine ligand-binding site. J Biol Chem 261:11613-11622.

Köhrle J, Spanka M, Irmscher K, Hesch RD. 1988. Flavonoid effects on transport, metabolism and action of thyroid hormones. Prog Clin Biol Res 280:323-340.

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.

Law CJ, Maloney PC, Wang DN. 2008. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. Annu Rev Microbiol 62:289-305.

Lemieux MJ. 2007. Eukaryotic major facilitator superfamily transporter modeling based on the prokaryotic GlpT crystal structure. Mol Membr Biol 24:333-341.

Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R. 1998. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. Nat Genet 19:83-86.

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. Mol Membr Biol 23:486-498.

Maranduba CM, Friesema EC, Kok F, Kester MH, Jansen J, Sertie AL, Passos-Bueno MR, Visser TJ. 2006. Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. J Med Genet 43:457-460.

Mendel CM, Cavalieri RR, Kohrle J. 1992. Thyroxine (T4) transport and distribution in rats treated with EMD 21388, a synthetic flavonoid that displaces T4 from transthyretin. Endocrinology 130:1525-1532.

Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. N Engl J Med 347:95-102.

Nascimento AS, Dias SM, Nunes FM, Aparicio R, Ambrosio AL, Bleicher L, Figueira AC, Santos MA, de Oliveira NM, 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.

Nemeroff CB. 1991. Augmentation regimens for depression. J Clin Psychiatry 52 Suppl:21-27.

Nishimura M, Naito S. 2008. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. Drug Metab Pharmacokinet 23:22-44.

Palade G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 189:347-358.

Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. Microbiol Mol Biol Rev 62:1-34.

Papp E, Csermely P. 2006. Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use. Handb Exp Pharmacol:405-416.

Pey AL, Perez B, Desviat LR, Martinez MA, Aguado C, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Thorolfsson M, Ugarte M, Martinez A. 2004. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. Hum Mutat 24:388-399.

Piehl S, Heberer T, Balizs G, Scanlan TS, Smits R, Koksch B, Kohrle J. 2008. Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. Endocrinology 149:3037-3045.

Pinna G, Broedel O, Eravci M, Stoltenburg-Didinger G, Plueckhan H, Fuxius S, Meinhold H, Baumgartner A. 2003. Thyroid hormones in the rat amygdala as common targets for antidepressant drugs, mood stabilizers, and sleep deprivation. Biol Psychiatry 54:1049-1059.

Price NT, Jackson VN, Halestrap AP. 1998. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. Biochem J 329 (Pt 2):321-328.

Rastogi MV, LaFranchi SH. 2010. Congenital hypothyroidism. Orphanet J Rare Dis 5:17.

Ritchie JW, Collingwood CJ, Taylor PM. 2001. Effect of hypothyroidism on pathways for iodothyronine and tryptophan uptake into rat adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 280:E254-E259.

Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, Yan AT, Cwirla SE, Grindstaff KK. 2008a. Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. Neuroscience 155:423-438.

Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N. 2008b. 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.

Rose SR, Brown RS, Foley T, Kaplowitz PB, Kaye CI, Sundararajan S, Varma SK. 2006. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. Pediatrics 117:2290-2303.

Roth S, Kinne A, Schweizer U. 2010. The tricyclic antidepressant desipramine inhibits T3 import into primary neurons. Neurosci Lett 478:5-8.

Samuels HH, Stanley F, Shapiro LE. 1976. Dose-dependent depletion of nuclear receptors by L-triiodothyronine: evidence for a role in induction of growth hormone synthesis in cultured GH1 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 73:3877-3881.

Sanacora G. 2008. New understanding of mechanisms of action of bipolar medications. J Clin Psychiatry 69 Suppl 5:22-27.

Schulz A, Sangkuhl K, Lennert T, Wigger M, Price DA, Nuuja A, Gruters A, Schultz G, Schoneberg T. 2002. Aminoglycoside pretreatment partially restores the function of truncated V(2) vasopressin receptors found in patients with nephrogenic diabetes insipidus. J Clin Endocrinol Metab 87:5247-5257.

Schussler GC. 2000. The thyroxine-binding proteins. Thyroid 10:141-149.

Schwarcz G, Halaris A, Baxter L, Escobar J, Thompson M, Young M. 1984. Normal thyroid function in desipramine nonresponders converted to responders by the addition of L-triiodothyronine. Am J Psychiatry 141:1614-1616.

Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG, Ward J, Sanabria J, Marsa S, Lewis JA, Echeverri R, Lubs HA, Voeller K, Simensen RJ,

Stevenson RE. 2005. Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. Am J Hum Genet 77:41-53.

Schwartz CE, Stevenson RE. 2007. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21:307-321.

Shanker G, Bhat NR, Pieringer RA. 1981. Investigations on myelination in vitro: thyroid hormone receptors in cultures of cells dissociated from embryonic mouse brain. Biosci Rep 1:289-297.

Simpson RB, Kauzmann W. 1953. The Kinetics of Protein Denaturation .1. the Behavior of the Optical Rotation of Ovalbumin in Urea Solutions. Journal of the American Chemical Society 75:5139-5152.

Tatzelt J, Prusiner SB, Welch WJ. 1996. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. EMBO J 15:6363-6373.

Taylor PM, Ritchie JW. 2007. Tissue uptake of thyroid hormone by amino acid transporters. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21:237-251.

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.

van der Deure WM, Peeters RP, Visser TJ. 2010. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. J Mol Endocrinol 44:1-11.

Wemeau JL, Pigeyre M, Proust-Lemoine E, d'Herbomez M, Gottrand F, Jansen J, Visser TJ, Ladsous M. 2008. Beneficial effects of propylthiouracil plus L-thyroxine treatment in a patient with a mutation in MCT8. J Clin Endocrinol Metab 93:2084-2088.

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.

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.

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. J Neuroendocrinol 16:809-818.

Zoeller TR, Dowling AL, Herzig CT, Iannacone EA, Gauger KJ, Bansal R. 2002. Thyroid hormone, brain development, and the environment. Environ Health Perspect 110 Suppl 3:355-361.

Anteilserklärung

Frau Anita Kinne hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

1. Braun D, Kinne A, Bräuer AU, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, Wirth EK, Schweizer U.
   Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and primary brain cells.
   GLIA
   2011, 59 (3): 463-471

   Anteil: 25 Prozent

Die Abbildungen 1B und 2 hat Frau Kinne erstellt und die experimentellen Arbeiten hierfür durchgeführt. Am Manuskript hat sie anteilig mitgewirkt.

2. Kinne A & Kleinau G, Hoefig CS, Köhrle J, Grüters A, Krause G, Schweizer U.
   Identification of molecular determinants for substrate transport and structural implications for the monocarboxylate transporter 8.
   Journal of Biological Chemistry
   2010, 285 (36): 28054–28063

   Anteil: 40 Prozent

Die experimentellen Arbeiten für die Abbildungen 2, 3C, 5A und 5B hat Frau Kinne durchgeführt. Die Abbildungen 2, 3 und 5 hat sie erstellt und am Manuskript anteilig mitgewirkt.

3. Roth S & Kinne A, Schweizer U.
   The tricyclic antidepressant desipramine inhibits T_3 transport into primary neurons.
   Neuroscience Letters
   2010, 478: 5-8

   Anteil: 45 Prozent

Frau Kinne hat zur Hälfte alle experimentellen Arbeiten durchgeführt und die Abbildungen angefertigt. Am Manuskript hat sie anteilig mitgewirkt.

4. Kinne A & Roth S, Biebermann H, Köhrle J, Grüters A, Schweizer U.
   Surface translocation and tri-iodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent.
   Journal of Molecular Endocrinology
   2009, 43: 263-271

   Anteil: 50 Prozent

Die experimentellen Daten für die Abbildung 1 hat Frau Kinne erhoben und zur Abbildung die Hälfte beigetragen. Die experimentellen Arbeiten zur Zellmembranexpression hat sie vollständig und anteilig die Experimente für die Transportstudien der MCT8 Varianten durchgeführt. Zur Abbildung 2 hat sie zur Hälfte beigetragen. Die experimentellen Daten für die Suppl. Abbildungen 1 und 2 hat sie durchgeführt und zur Hälfte die Abbildungen angefertigt. Am Manuskript hat sie anteilig mitgewirkt.

Anita Kinne _____

Prof. Dr. Josef Köhrle _____

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Braun D, **Kinne A**, Bräuer AU, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, Wirth EK, Schweizer U. Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and primary brain cells. **GLIA** 2011, 59 (3): 463-471

Impact Factor: 4,932

http://dx.doi.org/10.1002/glia21116

Kinne A & Kleinau G, Hoefig CS, Köhrle J, Grüters A, Krause G, Schweizer U. Identification of molecular determinants for substrate transport and structural implications for the monocarboxylate transporter 8. **Journal of Biological Chemistry** 2010, 285 (36): 28054–28063

Impact Factor: 5,328

http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.129577

Roth S & **Kinne A**, Schweizer U. The tricyclic antidepressant desipramine inhibits T_3 transport into primary neurons. **Neuroscience Letters** 2010, 478: 5-8

Impact Factor: 1,925

http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.055

Kinne A & Roth S, Biebermann H, Köhrle J, Grüters A, Schweizer U. Surface translocation and tri-iodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. **Journal of Molecular Endocrinology** 2009, 43: 263-271

Impact Factor: 3,221

http://dx.doi.org/10.1677/JME-09-0043

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Kinne A, Schülein R, Krause G. Molecular level of primary and secondary thyroid hormone transporters. **Thyroid Research** (submitted)

Kleinau G, Schweizer U, **Kinne A**, Köhrle J, Grüters A, Krude H, Biebermann H. Molecular insights into mechanisms of the human monocarboxylate transporter 8 by combining functional with structural information. **Thyroid Research** (submitted)

Braun D, **Kinne A**, Bräuer AU, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, Wirth EK, Schweizer U. Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and primary brain cells. **GLIA** 2011, 59 (3): 463-471

Kinne A & Kleinau G, Hoefig CS, Grüters A, Köhrle J, Krause G, Schweizer U. Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for the monocarboxylate transporter 8. **Journal of Biological Chemistry** 2010, 285 (36): 28054–28063

Roth S & **Kinne A**, Schweizer U. The tricyclic antidepressant desipramine inhibits T_3 transport into primary neurons. **Neuroscience Letters** 2010, 478: 5-8

Kinne A & Roth S, Biebermann H, Köhrle J, Grüters A, Schweizer U. Surface translocation and tri-iodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. **Journal of Molecular Endocrinology** 2009, 43: 263-271

Kurzvorträge

Point mutations of the T_3 transporter MCT8. 24. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), 04.-06. Dezember 2008, Berlin, Deutschland.

Studies of molecular determinants of Thyroid hormone (TH) transport at MCT8 and other TH transporters. 26. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), 02.-04. Dezember 2010, Halle, Deutschland.

Posterpräsentationen

Characterization of mutations in the T_3 transporter MCT8. Bregenz Summer School on Endocrinology, 27.-31. Juli 2008, Bregenz, Österreich.

Surface translocation and T_3 uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent *in vitro* – Interpretation of clinical phenotypes and therapeutic implications. 52. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 04.-07. März 2009, Gießen, Deutschland.

Surface translocation and T_3 uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent *in vitro*. Therapeutic implications. 11th European Congress of Endocrinology (ECE), 25.-29. April 2009, Istanbul, Türkei.

Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8 (MCT8). 14th International Thyroid Congress (ITC), 11.-16. September 2010, Paris, Frankreich.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Anita Kinne, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Studien zum Transport von Schilddrüsenhormonen durch Membrantransporter der MCT- und LAT-Familie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum Unterschrift

Danksagung

Für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und die fortwährende Unterstützung und Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Ulrich Schweizer und Prof. Dr. Josef Köhrle bedanken.

Dr. Gunnar Kleinau und Dr. Gerd Krause vom Leibniz-Institut für Molekulare Pharmaklogie (FMP) danke ich vor allem für die Erstellung des MCT8 Strukturmodells und die angenehme Zusammenarbeit sowie für die dadurch entstandene Kooperation.

Für die konstruktive Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Herrn Stephan Roth und im Besonderen danke ich Carolin Höfig für die Durchführung der LC-MS/MS-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Lutz Schomburg danke ich insbesondere für die Durchsicht meiner Arbeit und Herrn Prof. Dr. Heiko Krude für die Unterstützung in der Endphase meiner Doktorarbeit.

PD Dr. Heike Biebermann startete in ihrem Labor mit der Klonierung von MCT8 und war mir stets mit konstruktiven Ideen eine große Hilfe – dafür herzlichsten Dank.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Endokrinologie, insbesondere Mette Stoedter, Carolin Höfig, Doreen Braun, Antonia Hög, Carola Geiler, Kostja Renko, Peter Hofmann und Marten Michaelis. Bei technischen Fragestellungen haben sie mich immer unterstützt und damit einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit geleistet.

Ganz besonderer Dank geht an meine Freunde Katrin Huhne, Daniela Kurzbuch, Kathrin Laurier, Katja Schneider und meiner Lola, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern auch für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Meiner Schwester Duschka, ihrem Jan und ihrer Tochter Marlene, meiner Mama sowie meinen Großeltern danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung.