

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

DISSERTATION

Charakterisierung von neuronalen Schilddrüsenhormon
Transportproteinen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Horst Roth
aus Bobingen

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle
 2. Prof. Dr. H. Koepsell
 3. Prof. Dr. K. Brix

Datum der Promotion: 03.09.2010

1.	Zusammenfassung.....	4
1.1.	Einleitung.....	5
1.1.1.	Schilddrüsenhormone sind wichtig für die Gehirnentwicklung.....	5
1.1.2.	Mutationen in MCT8 führen zu Allan-Herndon-Dudley Syndrom.....	5
1.1.3.	Therapiemöglichkeiten.....	6
1.1.4.	Mutationen in MCT8.....	6
1.1.5.	Weitere T ₃ Transportproteine.....	7
1.2.	Zielstellung.....	8
1.2.1.	Entwicklung eines definierten Mediensupplements für die serumfreie Neuronkultur.....	8
1.2.2.	Charakterisierung des T ₃ Transports in kortikalen Neuronen.....	8
1.2.3.	Biochemische Charakterisierung von MCT8 anhand von pathogenen Mutationen.....	8
1.3.	Methodik.....	9
1.3.1.	Primäre neuronale Zellkultur.....	9
1.3.2.	Neuronales Mediensupplement.....	10
1.3.3.	Stabile Expression von MCT8 in Zelllinien.....	10
1.3.4.	Radioaktive T ₃ Transportmessungen.....	11
1.3.5.	Vitale Zellzahl und Zytotoxizität.....	11
1.4.	Ergebnisse.....	12
1.4.1.	Das neue Mediensupplement unterstützt die Entwicklung kortikaler Neurone <i>in vitro</i>	12
1.4.2.	Kortikale Neuronen der Maus verfügen über diverse T ₃ Transporter.....	13
1.4.3.	Das Antidepressivum Desipramin inhibiert T ₃ Transport über MCT8.....	13
1.4.4.	Mutationen in MCT8, die den T ₃ Transport nur quantitativ vermindern.....	14
1.5.	Diskussion.....	15
1.6.	Literaturliste.....	21
2.	Anteilerklärung.....	26
3.	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	27
4.	Lebenslauf.....	30
5.	Publikationsliste.....	31
6.	Selbstständigkeitserklärung.....	32
7.	Danksagung.....	33

1. Zusammenfassung

Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) bezeichnet ein lebenslanges Krankheitsbild mit schwerer psychomotorischer Retardation. AHDS basiert auf Mutationen im Gen (SLC16A2) für das Membranprotein Monocarboxylattransporter 8 (MCT8). MCT8 importiert aktives Schilddrüsenhormon T_3 in die Zelle und sein Funktionsverlust führt bei Patienten und Mäusen zu einer hypophysären T_3 Resistenz mit unphysiologisch hohen T_3 Spiegel im Serum. Aufgrund der Schwere der neurologischen Symptomatik, nimmt man an, dass wie im Falle von Kretinismus die vorgeburtlich einsetzende Unterversorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormon von entscheidender Bedeutung ist. Zur Untersuchung von primären Neuronkulturen haben wir ein Mediumsupplement entwickelt, welches das kommerzielle B27 ersetzt und uns erlaubt seine Zusammensetzung beliebig zu variieren. Weiterhin haben wir den T_3 Transport in Neuronen von Wildtyp und $Mct8^{-/y}$ -Mäusen *in vitro* charakterisiert und dabei gezeigt, dass für die T_3 Aufnahme neben Mct8 mindestens noch ein weiterer T_3 Transporter, Lat2, in Mausneuronen aktiv ist. Die Expression eines weiteren Transporters erklärt die ausbleibende neurologische Beeinträchtigung in der $Mct8^{-/y}$ -Maus sowie die auftretenden Anzeichen von Hypo- und Hyperthyreose aus Verhaltenstests. Die stabile Überexpression von pathogenen MCT8-Mutanten in Zelllinien brachte hingegen die Erkenntnis, dass die Mutanten (Ins235V, R271H und L568P) zwar noch hinreichend verbliebene Transportaktivitäten besitzen, diese aber vom verwendeten Zelltyp abhängt. Unsere Ergebnisse bestätigen, warum die AHDS-Symptome in Trägern mancher Mutationen milder ausfallen. Die Detektion von 12 Mutanten an der Zelloberfläche und die Bestimmung deren Restaktivität führten zu der Feststellung einer jeweils unterschiedlich ausfallenden Prozessierung der Mutanten durch die Zelle. Weiterhin zeigen wir erstmalig die Inhibition von MCT8 durch das trizyklische Antidepressivum Desipramin. Dieser Effekt könnte Veränderungen des Schilddrüsenhormonmetabolismus im Gehirn von Desipramin behandelten Ratten erklären. Darüber hinaus stellt Desipramin ein neuartiges Werkzeug für die Forschung an T_3 Transportern dar.

1.1. Einleitung

1.1.1. Schilddrüsenhormone sind wichtig für die Gehirnentwicklung

Die Versorgung des Gehirns mit Schilddrüsenhormonen während der embryonalen und frühen postnatalen Gehirnentwicklung ist von herausragender Wichtigkeit [Zoeller und Rovet 2004]. Schwerer Jodmangel sowie Entwicklungs- und Funktionsdefekte der Schilddrüse können in schwerwiegenden Fällen zu Kretinismus führen, eine weltweit maßgebende Ursache für mentale Retardation. Jod-supplementationsprogramme und Perinatalscreening haben in vielen Ländern der Erde dazu beigetragen, dass diese einstmals verbreitete Erkrankung ihren Schrecken verloren hat und nach Einführung der Supplementation bei uns in nur dreißig Jahren in der Bevölkerung fast in Vergessenheit geraten ist. Die Schilddrüse jodiert proteingebundene Tyrosinringe und koppelt sie zu Thyroxin, T_4 , und 3,3',5-Trijod-L-Thyronin, T_3 , und setzt beide in den Blutkreislauf frei. Nur T_3 aktiviert die nukleären Schilddrüsenhormon-Rezeptoren und moduliert somit die Genaktivität. Schilddrüsenhormone sind beteiligt an der Teilung und Migration von Neuroblasten, an der Reifung von Neuronen, u.a. der Ausbildung von dendritischen Spines und Synapsen, sowie an der Differenzierung von Oligodendrozyten und damit der Myelinisierung [Morreale de Escobar et al. 2004, Nunez et al. 1991].

1.1.2. Mutationen in MCT8 führen zu Allan-Herndon-Dudley Syndrom

Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) ist eine X-gekoppelte mentale Retardation, die erstmals 1944 beschrieben wurde [Allan et al. 1944]. Kürzlich wurde gezeigt, dass Mutationen in der Gensequenz für das Zellmembranprotein Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) mit AHDS ursächlich assoziiert sind [Dumitrescu et al. 2004, Friesema et al. 2004, Schwartz et al. 2005]. Neben neurologischen Störungen finden sich auch eine reduzierte Ausbildung von Muskelmasse sowie Hypotonie, die vermutlich mit dem endokrinen Phänotyp assoziiert sind. Die erhöhten Werte für totales (gebundenes und ungebundenes) T_3 im Serum der Patienten (205 – 440 ng/dl, Normbereich: 90 – 165 ng/dl) legen eine Hyperthyreose nahe, die jedoch mit paradox niedrigem totalem T_4 (2,7 – 8,7 µg/dl, Normbereich: 4,2 – 9,9 µg/dl) und nur leicht erhöhtem Thyreotropin (TSH) einhergehen. Zusammengenommen erkennt man somit das Bild einer atypischen Resistenz gegenüber Schilddrüsenhormon [Dumitrescu et al. 2004, Friesema et al. 2004, Herzovich et al. 2007, Jansen et al. 2007, Maranduba et al. 2006]. Mechanistisch lässt sich das Syndrom teilweise mit einem verminderten Import von T_3 in Zielzellen (z.B. in die Hypophyse) erklären, da MCT8 einen spezifischen und aktiven T_3 Transporter darstellt [Friesema et al. 2003]. Zellen, die über weitere, MCT8 unabhängige T_3 Aufnahmemechanismen verfügen, werden bei den erhöhten T_3 Werten also lokal hyperthyreot sein (wie die Leber), während Zellen, die primär von MCT8 abhängig sind, relativ hypothyreot sind, sodass es bei den Patienten paradoxerweise nicht zu den typischen Anzeichen einer Hyperthyreose, wie vermehrter Schweißbildung und Herzrasen, dagegen aber

durchaus zu einem Verlust von Muskelmasse kommt. Die Erkrankung wird heute oft schon im Säuglingsalter aufgrund von Ernährungsproblemen, ausbleibender Gewichtszunahme und mangelhafter Kopfkontrolle, sowie hohen T₃ Werten im Serum diagnostiziert. Die neuronale Expression von MCT8 bei der Maus legte nahe [Heuer et al. 2005], dass die mentale Retardation auf neuronalen Defekten beruht. Mehrere MRT-Studien an Patienten mit dem Ziel eventuelle Veränderungen im Volumen und der generellen Topologie des Gehirns aufzudecken, ergaben außer einem deutlich verringerten Grad der Myelinisierung nur eine generelle Atrophie sehr geringen Ausmaßes [Gika et al. 2009, Namba et al. 2008, Sijens et al. 2008].

1.1.3. Therapiemöglichkeiten

Das klinische Bild beim AHDS hat also zwei Aspekte: Einerseits gibt es Zellen und Gewebe mit einem Schilddrüsenhormonmangel, der entweder akut besteht oder schon während der Entwicklung zu Defekten geführt hat. Andererseits leiden die Patienten unter einer Hyperthyreose, die zum Abbau von Muskelmasse führt [Herzovich et al. 2007]. Deshalb muss eine Therapie beide Aspekte bedenken. Entsprechend gibt es zwei experimentelle Therapieansätze. Wemeau et al., haben die Schilddrüsenüberfunktion durch Gabe von PTU als Thyreostatikum zusammen mit einer Ersatzdosierung an T₄ behandelt und immerhin den weiteren Gewichtsverlust des Patienten verhindert [Wemeau et al. 2008]. Offensichtlich kann diese Behandlung den (angenommenen) Mangel an Schilddrüsenhormonen im Gehirn nicht beheben. Ein früher Therapieversuch mit hohen T₄ Dosen hat keine klinische Besserung der neurologischen Symptome gebracht [Biebermann et al. 2005]. Kürzlich haben Refetoff und Kollegen im Mausmodell einen alternativen Ansatz gewählt: DITPA (3,5-Dijod-Thyropropionsäure) wirkt am T₃ Rezeptor als Agonist und kann im Tiermodell TSH auch in *Mct8*-defizienten Tieren supprimieren, also *Mct8*-unabhängig in Hypophysenzellen aufgenommen werden [Di Cosmo et al. 2009]. Die Gruppe ermittelt im Moment, ob DITPA auch beim Menschen als T₃ Analogon bei MCT8-Defizienz die Gehirnentwicklung voranbringen kann. Erste Ergebnisse zum Einsatz dieses Analogons sind ermutigend, allerdings müssen weitere Studien klären, ob schon Föten mit diagnostizierten MCT8 Mutationen davon profitieren können

1.1.4. Mutationen in MCT8

Der humane MCT8 ist 613 Aminosäuren lang. Hydrophobizitätsanalysen prognostizieren 12 Transmembrandomänen. Die N- und C-Termini des Proteins liegen nach diesen Modellen intrazellulär. Damit gehört MCT8 wie viele Aminosäuren-, Zucker- oder Vitamintransporter zur „Major facilitator“ Superfamilie der energieunabhängigen Membrantransporter. Bis heute sind bei AHDS Patienten über 20 verschiedene Mutationen von MCT8 beschrieben worden und sie finden sich in nahezu allen Domänen des Proteins [Friesema et al. 2010]. Wie bei vielen Krankheiten mit genetischer Ursache findet sich auch bei AHDS das gesamte Spektrum von möglichen Mutationen wieder: Hauptsächlich Punktmutationen, aber

auch Deletionen/Insertionen einzelner Basen oder ganzer Codons, sowie Deletionen von Exons. Ausnahmslos alle AHDS Patienten leiden unter den typischen Symptomen, jedoch sind auch Fälle publiziert, deren Phänotyp weniger stark ausgeprägt ist. So sind einzelne Patienten in der Lage sich begrenzt zu artikulieren und können sogar leichte Tätigkeiten verrichten [Jansen et al. 2008, Schwartz et al. 2005]. Man nimmt an, dass diese MCT8 Moleküle wohl eingeschränkt in der Lage sind T_3 zu transportieren.

1.1.5. Weitere T_3 Transportproteine

Mit 49% Aminosäureidentität ist MCT10 das nächstverwandte Protein zu MCT8. MCT10, auch als TAT1 (T-Typ Aminosäuretransporter 1) bezeichnet, transportiert neben aromatischen Aminosäuren ebenso T_3 , allerdings mit abweichendem Gewebeexpressionsprofil und geminderter Translokationskapazität für T_4 [Friesema et al. 2008]. Neben MCT10 sind noch weitere Proteine identifiziert worden die als T_3 Transporter fungieren können. Manche dieser Transporter tragen nicht unerhebliche Aufgaben für die Versorgung des Gehirns mit verschiedenen Substraten an der Blut-Hirn-Schranke oder sie sind beteiligt an der Resorption von Substanzen aus dem Primärharn in der Niere. Wichtig zu nennen sind hierbei der in Mikrokapillaren des Gehirns nachgewiesene Transporter OATP14 (organic anion transporting polypeptide 14, Slco1c1) und die beiden Isoformen LAT1 (large neutral amino acid transporter 1, Slc7a5) und LAT2 (large neutral amino acid transporter 2, Slc7a8) mit jeweils ähnlicher Substratspezifität für ungeladene Aminosäuren. Diese 3 Proteine haben, ebenso wie MCT10, in Expressions- und Transportstudien mittels mRNA-Injektion in Oozyten oder transfizierten Zelllinien gezeigt, dass sie neben verschiedenen Aminosäuren (-derivaten) auch Schilddrüsenhormon in die Zelle überführen [Friesema et al. 2001, Rossier et al. 1999, Sugiyama et al. 2003]. Welche dieser Akteure im Neuron aktiv sind und wie Schilddrüsenhormon letztendlich dorthin gelangt ist in weiten Teilen noch unbekannt. Die Gruppe um Juan Bernal postulierte erstmalig ein Modell (Abb. 1) in dem Astrozyten und Tanyzyten T_4 aus den Ventrikeln und Blutgefäßen aufnehmen, mittels des Enzyms Dejodase 2 (Dio2) in T_3 wandeln und dieses dann über MCT8-vermittelten Transport in Neurone gelangt [Bernal 2005, Guadano-Ferraz et al. 1997]. Der Konversionsschritt erscheint zwingend, da Astro- und Tanyzyten die höchsten Aktivitäten von Dejodase 2 im Gehirn aufweisen und dieses Enzym im Hirngewebe von $Mct8^{-/-}$ Mäusen induziert ist [Trajkovic et al. 2007].

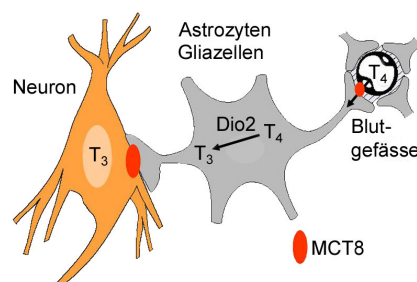


Abb. 1: Modell der Versorgung von neuronalen Zellen mit Schilddrüsenhormon. Modifiziert nach [Bernal 2005]

1.2. Zielstellung

Der Mechanismus der neuronalen T_3 Aufnahme sollte in primären kortikalen Neuronen untersucht und molekular charakterisiert werden. Dazu sollten die Kulturbedingungen für Neurone angepasst werden, die Rolle von Mct8 und anderen Transportern für den neuronalen T_3 Import abgeschätzt, und pathogene Mutationen in *MCT8* molekular charakterisiert werden.

1.2.1. Entwicklung eines definierten Mediensupplements für die serumfreie Neuronkultur

Um die biologische Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf Neurone untersuchen zu können, braucht man Kulturbedingungen, die die freie Wahl bezüglich Konzentration und Identität von Schilddrüsenhormonen erlauben. Standard für die serumfreie Kultur ist die Verwendung von B27 Supplement (Invitrogen), welches allerdings bereits T_3 in unbekannter Konzentration enthält. Weiterhin gibt es in der Literatur Hinweise auf nichtgenomische Wirkungen von T_4 und rT_3 auf das neuronale Zytoskelett. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Ersatz für B27 entwickelt werden, der volle Freiheit bei der Wahl der Zusätze erlaubt.

1.2.2. Charakterisierung des T_3 Transports in kortikalen Neuronen

Durch Vergleich des T_3 Imports in Neuronkulturen aus Wildtyp und *Mct8*-defizienten Tieren sollte der Anteil von Mct8 an der neuronalen T_3 -Aufnahme bestimmt werden. Hierzu musste ein Verfahren etabliert werden, welches die Isolation und andauernde Kultivierung von primären Neuronen in großer zelltypspezifischer Reinheit garantiert. Weiterhin müssen Prozeduren entwickelt werden, um die T_3 Zuführung in den beiden Genotypen quantifizier- und somit vergleichbar zu machen. Dazu sollten die Transportuntersuchungen mit radioaktiv markiertem $^{125}\text{Jod-}T_3$ durchgeführt werden, um die zellulär aufgenommene Radioaktivität zu messen. Auf dieser Basis soll durch den Einsatz von Inhibitoren der T_3 Transport in Neuronen pharmakologisch charakterisiert werden.

1.2.3. Biochemische Charakterisierung von MCT8 anhand von pathogenen Mutationen

Da es sich bei MCT8 um ein Membranprotein handelt, sollte herausgefunden werden, welche Mutationen die Expression und Membrantranslokation beeinträchtigen und welche den T_3 Aufnahmemechanismus betreffen. Gleichzeitig galt es zu überprüfen, ob es geno- und phänotypische Beziehungen gibt bezüglich pathogener Mutanten aus Patienten mit minderschwere AHDS Symptomatik.

1.3. Methodik

1.3.1. Primäre neuronale Zellkultur

Die Kultur von Neuronen des zentralen Nervensystems erfordert die Präparation von Hirngewebe zu einem Entwicklungszeitpunkt, der große Zellausbeute als auch ein frühes Stadium in der zellulären Differenzierung gewährleistet. Voraussetzung hierfür ist die Verwendung von Embryonen am Schwangerschaftstag 15 (E15) aus der trächtigen Maus [Brewer et al. 1993]. Nach der Öffnung des Bauchraumes werden die Embryonen dem Gebärmutter Schlauch der Mutter entnommen und dekapitiert. Nach dem Freilegen des Gehirns, wird das gesamte Organ in eine Schale mit eisgekühlter Nährlösung (Neurobasalmedium, NBM) transferiert. Die Hemisphären werden getrennt und jeweils die Hirnhäute (Meningen) entfernt. Der Kortex wird präpariert und in ein verschließbares Sammelgefäß überführt, das ebenfalls mit eiskaltem NBM gefüllt wurde. Nach Präparation aller Tiere wird die Einzelzellisolation eingeleitet durch Zugabe einer Trypsinlösung (Biochrom, Berlin) im Volumenverhältnis 1:10 und der Inkubation unter leichtem Schütteln bei 37°C. Nach 10minütigem Verdau werden die Gewebestücke gesammelt und der trypsinhaltige Überstand verworfen. Nun wird Medium zugesetzt, welches neben 10% fötalem Kälberserum zur Inhibition des Trypsins noch Glukose und Insulin enthält, um die Zellen während des Prozesses mit Energie zu versorgen. Durch mehrmaliges Pipettieren (Trituration) der Gewebe mittels einer, zur Kantenglättung an der Spitze abgeflamnten (feuerpolierten) Glaspipette werden die Zellen nun vereinzelt. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgt durch Auszählung vitaler Zellen aus einer Probe des Isolats in einer Neubauer-Zählkammer. Die jeweils ausgesäte Zellzahl richtete sich nach der Art des Versuches und bewegte sich zwischen 1,5 bis 3×10^5 Zellen/ cm^2 . Niedrige Dichten eignen sich gut für spätere immunzytochemische Untersuchungen da hier die Morphologie einzelner Neurone gut ersichtlich ist. Die serumfreie Kulturphase bei 37°C im Inkubator beginnt unter Verwendung des basalen Neuronmediums (NBM), dem in den ersten drei Tagen ein Supplement (B27) aus essentiellen Bestandteilen zugefügt wird [Brewer et al. 1993]. In dieser Startphase wird zusätzlich exzitatorisch wirkendes Glutamat dem Medium zugegeben, da eine basale Erregung nötig ist, um die Reifung der Neurone zu initiieren. Nach 7-9 Tagen in Kultur sind die Zellen voll entwickelt, festzustellen durch ein dichtes, dendritisches Netzwerk unter lichtmikroskopischer Betrachtung. Medienwechsel erfolgten zu 50% Volumenanteil alle 3 Tage. Wichtig für die Adhäsion der Neurone ist die Beschichtung der jeweiligen Oberfläche (Plastik, Glas) vor Aussaat. Hierzu wird die Kulturschale für mindestens 24 Stunden mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei 4°C überschichtet und vor Zellaussaat zusätzlich für 1 Stunde in NBM mit 10% FCS und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen G inkubiert.

1.3.2. Neuronales Mediensupplement

Da die genauen Zusammensetzungen und Mengen der Inhaltsstoffe kommerzieller Mediumssupplemente für Neurone vom Hersteller geschützt werden und es unmöglich ist einzelne Bestandteile daraus zu entfernen, wurde eine eigene Mischung entwickelt die ein breites Spektrum an Experimenten erst ermöglicht. Basierend auf publizierten Daten über B27 [Brewer et al. 1993] und seinen Vorgänger B18 [Brewer und Cotman 1989] entstand eine umfangreiche Rezeptur die *in puncto* Reifung und Vitalität von Neuronen keine detektierbaren Nachteile aufzeigt. In unserer Publikation „**Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival.**“ werden alle nötigen Inhaltsstoffe, deren Löslichkeiten und die Endkonzentrationen detailliert aufgeführt [Roth et al. 2010]. Neben Untersuchungen zu Neuronen aus *Mct8^{-/-}*-Mäusen [Wirth et al. 2009a] kam das beliebig variierbare Supplement auch Projekten aus anderen Themenfeldern zugute und ist nun fester Bestandteil zukünftiger Studien [Seiler et al. 2008, Wirth et al. 2009b].

1.3.3. Stabile Expression von MCT8 in Zelllinien

Um die Charakteristiken des membranassoziierten Proteins MCT8 ergründen zu können bietet die Methodik der stabilen Überexpression in Zelllinien hohe Flexibilität und nahezu unerschöpfliche Ressourcen an Zellmaterial für die Durchführung von Studien. Zelllinien für die Expression von MCT8 wurden ausgewählt anhand geringer T₃ Aufnahmerate und fehlender MCT8 Expression (Nachweis durch Western Blot mit polyklonalem Antiserum). Zu Beginn wurde der offene Leserahmen des humanen MCT8s in einen Expressionsvektor (pcDNA3, Invitrogen) kloniert. Dieser Vektor enthält neben einer Promoterregion des Zytomegalie-Virus (CMV) welcher hohe basale Aktivität aufweist auch eine Gensequenz zur Resistenz gegen das Antibiotikum G418 (Geneticin). Dieses Selektionsantibiotikum erlaubt nach Transfektion des Vektors und Aussaat der Zelllinie das Überleben jener Zellen, die das Plasmid ins Genom integriert haben. Dieser Selektionsprozess findet über mehrere Wochen unter Verwendung von G418 im Kulturmedium statt. Überlebende Zellen bilden kleine Kolonien die dann getrennt voneinander weiterkultiviert werden bis eine ausreichende Zellmasse für Tests zur Verfügung steht. Die somit erhaltenen Klone wurden auf ihre Expressionsstärke durch den Einsatz eines Antikörpers gegen MCT8 im Immunblot überprüft. Klone mit hoher Expression dienten im Anschluss zur Charakterisierung des Transporters. Neben der nativen Sequenz von humanem *MCT8* wurden Punktmutationen durch PCR eingeführt, welche in AHDS Patienten gefunden wurden. Auch mit diesen Vektoren wurden stabil exprimierende Zellklone geschaffen. Diese Mutanten waren dann Gegenstand von Untersuchungen zur jeweiligen Transportcharakteristik. Die Kulturphase erfolgte unter Standardbedingungen mit Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) und 10% fötalem Kälberserum.

1.3.4. Radioaktive T₃ Transportmessungen

Durch die Bestimmung von intrazellulär aufgenommenem T₃ aus Neuronen unterschiedlichen Genotyps lassen sich die biochemischen Eigenschaften der Translokation erfassen. Diese Methode ist auch an Zelllinien anwendbar, die einzelne Transporter stabil überexprimieren. Um die Aufnahme schließlich bestimmen zu können wird T₃ verwendet, dessen Jodatome vorher durch chemische Reaktion teilweise durch radioaktives ¹²⁵I-Jod ausgetauscht wurden. Das auf diese Weise markierte ¹²⁵I-T₃ kann dann über die davon ausgehende Strahlung in einem Gammazähler quantifiziert werden. Um die zelluläre Aufnahme unter verschiedenen Bedingungen zu messen werden die Kulturen zunächst über einen definierten Zeitraum mit ¹²⁵I-T₃-haltigem, FCS-freiem Medium oder mit einer Pufferlösung inkubiert und danach sofort mit eiskaltem Salzpuffer einmalig gewaschen um die unerwünschte, extrazelluläre Radioaktivität zu minimieren. Nach dem zeitnahen Entfernen des Waschpuffers wird durch die Zugabe von 10mM NaOH eine vollständige Lyse der Zellen herbeigeführt, wobei das intrazellulär vorliegende radioaktive T₃ in das Lysat übergeht. Das Lysat wird vollständig in Messgefäße überführt und daraus die radioaktiven Zerfälle gemessen. Bei dieser Methodik ist es möglich Michaeliskonstanten (K_m) zwischen dem Liganden und dem Transporter zu bestimmen, was wiederum Vergleiche der Aufnahmeeffizienzen auch zwischen Mutanten zulässt. K_m-Werte erhält man durch lineare Regression der gemessenen Radioaktivitäten bei ansteigenden Konzentrationen des im Test eingesetzten Liganden. Bei den Untersuchungen wurden auch Inhibitoren parallel mit ¹²⁵I-T₃ eingesetzt. Zum Einsatz kamen Substanzen, deren transporthemmende Wirkung für verschiedene T₃ Transporter beschrieben worden ist [Broer et al. 2007, Friesema et al. 2003, Tohyama et al. 2004]. Es galt zu erfahren, welche dieser Proteine am Neuron inhibierbar sind und somit an der Gesamtaufnahme teilhaben. Vor dem Einsatz dieser Substanzen an neuronalen Kulturen mussten aber zunächst unerwünschte Wirkungen auf MCT8 überprüft werden. Dies geschah durch vorausgehende Tests an stabil exprimierenden Zelllinien für humanes MCT8.

1.3.5. Vitale Zellzahl und Zytotoxizität

Die Inkubation der Zellen mit dem wasserlöslichen Substrat 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) und die anschließende photometrische Bestimmung dessen Oxidationsgrades ist eine einfache Methode zur Vitalitätsbestimmung, die seit vielen Jahren angewandt wird. Dieser Test basiert auf einem Farbumschlag, sowie einer Veränderung der Löslichkeit des Substrats in lebenden Zellen. Die Oxidation von MTT geschieht im endoplasmatischen Retikulum sowie in Mitochondrien und spiegelt den Vitalzustand der Zelle wieder [Berridge et al. 2005].

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) ist Bestandteil nahezu aller Zellen und vermittelt die Reduktion von Pyruvat zu Laktat unter Oxidation von NADH zu NAD⁺. Dieses Enzym wird bei Zell- und Gewebeschädigung vermehrt ins Serum freigesetzt

und die Bestimmung seiner Aktivität dient der Diagnose vieler akuter und chronischer Erkrankungen wie Leberversagen oder Herzinfarkt. Da NADH Licht mit der Wellenlänge 340 nm absorbiert lässt sich die Enzymaktivität im Kulturmedium durch die Abnahme der Absorption durch NADH indirekt bestimmen. Steigt also die Aktivität während eines Experiments an, so steht dieser Wert für die Ausprägung des induzierten Zelltodes [Decker und Lohmann-Matthes 1988, Koh und Choi 1987].

1.4. Ergebnisse

1.4.1. Das neue Mediensupplement unterstützt die Entwicklung kortikaler Neurone *in vitro*

Grosse zelltypspezifische Reinheit sowie hohe Vitalität der Kultur von primären Neuronen ist unabdingbare Voraussetzung um neuronalen Schilddrüsenhormontransport analysieren zu können. Die Prozedur der Zellisolation und Kultur erzeugt mechanischen, enzymatischen und oxidativen Stress der sich in der Vitalität und Anzahl der Neurone in Kultur niederschlägt. Dabei spielt auch das verwendete Kulturmedium eine entscheidende Rolle. Vergleichstests zwischen Kulturen mit dem kommerziellen Mediumsupplement B27 und unserer eigenen Rezeptur ergaben keine nachteiligen Effekte aus der Verwendung unserer Mixtur. Die Kulturen waren auch nach 14 Tagen ab Aussaat von guter Qualität und wiesen sämtliche untersuchten, neuronalen Subpopulationen auf [Roth et al., Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2010, Abb. 2].

Weiterhin testeten wir mittels unseres frei konfigurierbaren Mediums, ob der *Mct8*^{-/-} Genotyp Einfluss auf die Vitalität der Zellen unter 14tägiger Kultur bei verschiedenen T₃ Konzentrationen (0-6 nM) des Mediums hat. Es bestand die Möglichkeit, dass sich Wachstums- und Differenzierungsbedingungen ändern und Ergebnisse damit verfälscht wären. In dieser Untersuchung waren keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen durch den Mangel an MCT8-Aktivität festzustellen. MTT-Oxidations- und LDH-Aktivitäts-Tests ergaben keine Unterschiede zu gleich behandelten Neuronen des Wildtyps (Abb. 2).

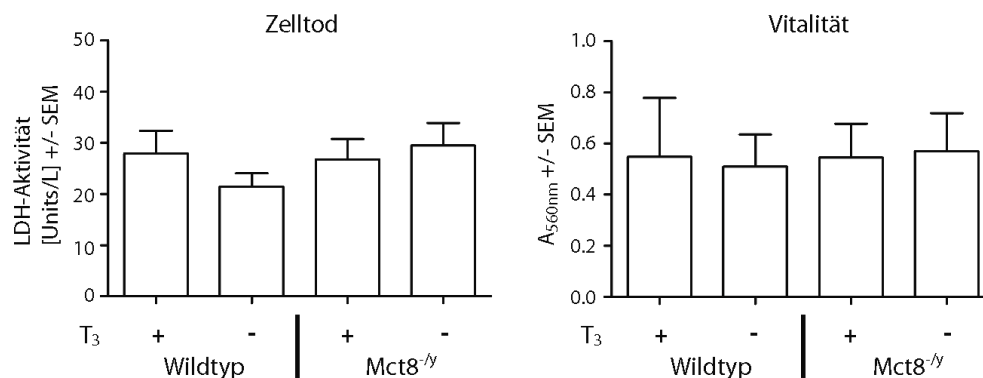


Abb. 2: Keine abweichenden Effekte von T₃ auf Mct8^{-/-}-Neurone. Der Mediumüberstand (LDH-Test) und die Zellen (MTT-Test) wurden am neunten Tag nach Aussaat vermessen. Die eingesetzte T₃-Konzentration im Medium betrug 3 nM über 6 Kulturtage.

1.4.2. Kortikale Neuronen der Maus verfügen über diverse T₃ Transporter

Mit Hilfe der Neuronkultur erfolgten nun Untersuchungen zur Transportaktivität in wildtyp- und *Mct8*^{-/-}-Neuronen. Wie vermutet zeigte sich, dass der T₃ Transport in *Mct8*-defizienten Neuronen der Maus stark erniedrigt ist [Wirth, Roth et al., Journal of Neuroscience 2009, Abb. 4]. Die pharmakologische Untersuchung der T₃ Aufnahme in primären kortikalen Mausneuronen legte nahe, dass auch L-Typ Aminosäuretransporter (LAT) und OATP-Typ Transporter am T₃ Import beteiligt sind. BCH (ein spezifischer LAT Inhibitor) und Probenecid (ein bekannter OATP Inhibitor) konnten den T₃ Import auch in *Mct8*-defizienten Neuronen weiter erniedrigen [Wirth, Roth et al., Journal of Neuroscience 2009, Abb. 4D]. Dieser Schluss konnte weiter untermauert werden, indem wir zeigten, dass weder BCH noch Probenecid MCT8 inhibieren [Wirth, Roth et al., Journal of Neuroscience 2009, Abb. 4E]. Dazu verwendeten wir MCT8-exprimierende MDCK-1 Zellen. Der bekannte MCT8-Inhibitor BSP (Bromosulphthalein) diente als Positivkontrolle [Friesema et al. 2003]. Eva Wirth bestätigte schließlich per quantitativer PCR, dass diese Transporter tatsächlich in den kultivierten Neuronen transkribiert werden und konnte für Lat2 auch das Protein nachweisen, was in humanen Gewebeschnitten des Gehirns nur an Mikrogliazellen möglich war [Wirth, Roth et al., Journal of Neuroscience 2009, Abb. 5].

1.4.3. Das Antidepressivum Desipramin inhibiert T₃ Transport über MCT8

Bei der Literaturrecherche zu Hinweisen auf möglicherweise inhibierte T₃ Verfügbarkeit aus dem Bereich der Humanmedizin wurde deutlich, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen der Behandlung von schwerer Depression mit Antidepressiva und einer Veränderung von Schilddrüsenhormonwerten im Serum der Patienten besteht [Hall 1983]. Weiterhin gibt es Ergebnisse aus Studien welche zeigen, dass häufiger Behandlungserfolge erzielt werden, wenn T₄ oder T₃ gleichzeitig oder im Vorfeld zur Therapie mit Antidepressiva verabreicht werden [Nemeroff 1991, Schwarcz et al. 1984]. Zwar sind diese Umstände schon länger bekannt, die Gründe für diese Wirkungen blieben jedoch ungeklärt. Die Gabe des trizyklischen Antidepressivums Desipramin (DMI) führt zur Erniedrigung der kortikalen T₃ Spiegel und Induktion der Dejodase 2 im Gehirn [Campos-Barros et al. 1994]. Wir vermuteten, dass dieser Effekt auf einer Inhibition des T₃ Transports durch Antidepressiva beruhen könnte. Unsere Daten aus Versuchen mit primären Neuronen bescheinigen deutliche inhibitorische Effekte auf die T₃ Aufnahme durch DMI [Roth et al., submitted, Neuroscience Letters, 2010, Abb. 1]. Diese Wirkung war ebenfalls an Kulturen der Zelllinie MDCK-1 mit stabiler Überexpression von MCT8 zu sehen [Roth et al., submitted, Neuroscience Letters, 2010, Abb. 2]. Durch die Transformation unserer Daten aus den radioaktiven Aufnahmeuntersuchungen in ein Eadie-Hofstee Diagramm und Variation der DMI Konzentration, gelang es schließlich den Modus der Inhibition von DMI an MCT8 zu bestimmen. Dieser ist

nicht kompetitiv. Das bedeutet, dass DMI zwar die Transportgeschwindigkeit senkt, jedoch auf die Affinität zwischen T_3 und MCT8 keinen Einfluß hat [Roth et al., submitted, Neuroscience Letters, 2010, Abb. 3]. Der MCT8 nah verwandte Transporter MCT10 wird ebenfalls durch DMI gehemmt (Abb. 3).

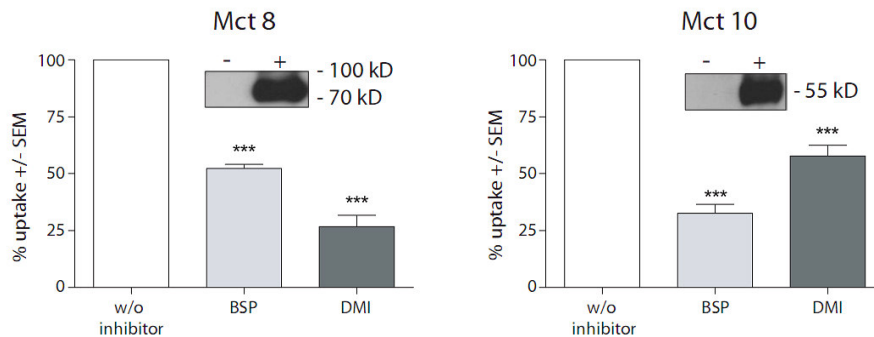


Abb. 3: Hemmung der Transportfunktion für T_3 von Mct8 und Mct10 durch 1 mM Desipramin (DMI). Beide Transporter wurden in MDCK-1 Zellen überexprimiert und Protein nachgewiesen. Der bekannte MCT8-Inhibitor Bromsulphthalein (BSP) diente 1 mM als Kontrolle. Aus [Roth et al., submitted, Neuroscience Letters, 2010].

1.4.4. Mutationen in MCT8, die den T_3 Transport nur quantitativ vermindern

Die aus Patienten mit Allan-Herndon-Dudley Syndrom stammenden MCT8-Mutanten ins235V, R271H und L568P zeigten in der Zelllinie MDCK-1 (R271H auch in JEG-1 Zellen) überraschend gute Zufuhraten und wurden daher eingehender untersucht [Kinne, Roth et al., Journal of Molecular Endocrinology 2009, Abb. 2]. Durch den Einsatz ansteigender ^{125}I - T_3 -Konzentrationen in Transporttests konnten K_m -Werte bestimmt werden, um die Affinität dieser Varianten zum Liganden vergleichen zu können. Aus den Sättigungskurven und der Transformation nach Eadie-Hofstee des konzentrationsabhängigen T_3 Transports ist zu erkennen, dass L568P einen zum Wildtyp sehr ähnlichen Verlauf der Regressionslinien verursacht, wenn auch auf gemindertem Radioaktivitätsniveau. Dieses Ergebnis spiegelt auch den Umstand wider, dass der K_m -Wert für beide Formen des Membranproteins gleich ist (K_m^{wt} 0,86 μ M; K_m^{L568P} 0,87 μ M). Ins235V und R271H besitzen hingegen geringere Affinitäten zu T_3 , was sich durch höhere K_m -Werte im Vergleich zum Wildtyp ausdrückt ($K_m^{ins235V}$ 3,2 μ M; K_m^{R271H} 1,9 μ M) [Kinne, Roth et al., Journal of Molecular Endocrinology 2009, Abb. 3]. Diese beiden Mutationen haben vermutlich Auswirkungen auf die dreidimensionale Struktur des Proteins, ohne dabei die Transportfähigkeit aufzuheben.

Der Versuch, die Proteinfaltung bei Mutanten mit nur geringer Transportaktivität, durch Behandlung mit chemischen und pharmakologischen Chaperonen positiv zu beeinflussen [Bernier et al. 2004, Brown et al. 1996], muss als gescheitert angesehen werden. Keine der eingesetzten Substanzen mit nachgewiesener Wirkung aus anderen Studien war in der Lage die Aufnahme zu erhöhen [Kinne, Roth et al., Journal of Molecular Endocrinology 2009, Abb. 4A]. Ähnlich

verhielt es sich beim vermehrten Einsatz von T_3 als natürlichen Liganden im Versuch Fehlfaltungen einzudämmen. Trotz Präinkubation vor dem radioaktiven Aufnahmetest, ließ sich nur bei der Mutante G558D eine signifikante Verbesserung feststellen, aber auf bescheidenem Niveau [Kinne, Roth et al., Journal of Molecular Endocrinology 2009, Abb. 4B].

1.5. Diskussion

Das klinische Bild von Patienten mit AHDS ähnelt in mancher Hinsicht den Symptomen der angeborenen Hypothyreose, die durch fehlende Ausbildung der Schilddrüse oder Störungen der Schilddrüsenhormonsynthese bzw. deren Regulation ausgelöst wird [Macchia et al. 1998, Moreno et al. 2002]. So leiden beide Patientengruppen an schwachen Reflexen und Wachstumsdefiziten. Jedoch hinsichtlich der Psychomotorik und der Intelligenzentwicklung unterscheiden sich beide Krankheitsbilder erheblich. So sind die Einschränkungen bei AHDS wesentlich schwerwiegender. Der Intelligenzquotient (Stanford-Binet Methode) im Falle von AHDS liegt zumeist unter 30 während unbehandelte, kongenitale Hypothyreose (CH) im Durchschnitt zu einem Niveau von 76 führt [Hypothyroidism und Collaborative 1981, Schwartz et al. 2005]. Weiterhin ist der überwiegende Teil von Patienten mit diagnostizierter Mutation in MCT8 nur zu sehr eingeschränkter Muskelkontrolle in der Lage, ein Umstand der für CH nur in Einzelfällen zutrifft. Außerdem besitzen Patienten mit CH kaum oder kein Schilddrüsenhormon, was ganz im Gegensatz zu den hohen T_3 -Hormonwerten bei AHDS steht. Trotzdem ist die Prognose für kongenitale Hypothyreose wesentlich besser, zumal sie durch frühzeitige Therapie mit Schilddrüsenhormon sehr gut behandelt werden kann [Rose et al. 2006]. Allerdings gibt es auch unter AHDS Patienten Einzelfälle mit abgeschwächter Symptomatik trotz ausbleibender Behandlungsmöglichkeiten [Bialer et al. 1992, Stevenson et al. 1990].

Die schweren psychomotorischen und kognitiven Beeinträchtigungen bei AHDS bedingen nun Untersuchungen über die Auswirkungen von MCT8-Mutationen auf neuronaler Ebene. Hierzu war die Entwicklung eines neuronalen Mediums im Zusammenhang mit der Etablierung und Optimierung der primären Neuronkultur ein wichtiger Baustein. Wie sich zeigte, war unser Medium hinsichtlich der Qualität und des Überlebens von primären Neuronen *in vitro* absolut gleichwertig zum kommerziellen Produkt B27, bei allerdings voller Flexibilität bezüglich der Inhaltsstoffe. Hiermit war es erstmalig möglich die Bedeutung des Spurenelements Selen und des Vitamin E für die Stressbewältigung und somit das Überleben erfahren. So fand dieses Medium Verwendung für eine Publikation, welche die Vitamin E-Abhängigkeit für Neurone zeigte, denen das antioxidativ wirksame Selenoprotein Glutathion-Peroxidase 4 (GPx4) fehlt [Seiler et al. 2008]. Die selbe Abhängigkeit war auch im Zusammenhang mit Neuronen zu sehen die keinerlei Selenoproteinsynthese besitzen [Wirth et al. 2009b]. In einer weiteren Publikation zeigten wir dann, dass die Selenkonzentration im Medium die Kapazität der

neuronalen Abwehr von oxidativen Substanzen *in vitro* bestimmt, sowie, dass die toxische Lipidoxidation durch diese Substanzen auch durch alleinige Gabe von Vitamin E in der Kultur nicht zu verhindern ist [Roth et al. 2010].

Bezüglich der Relevanz von MCT8 für die neuronale Funktion und Entwicklung hatte dieses Medium ebenfalls großen Wert. Interessant war hierbei die Feststellung, dass der Wegfall von T₃ keine Auswirkungen auf die Morphologie und das Überleben der Zellen in Kultur hatte. Auch der Verlust von Mct8 in Mausneuronen spielte hierfür in den Untersuchungen keine Rolle. Wir fanden auch - entgegen der Beobachtung in zerebellären Körnerzellen [Leonard 2008] - keine Effekte von Jodothyroninen auf die F-Aktin-Polymerisierung in kortikalen Neuronen. Möglicherweise könnten hier elektrophysiologische Untersuchungen weiterhelfen, um funktionelle Unterschiede zwischen Mct8-knockout und Wildtypen auszumachen. An dieser Stelle ist auch zu erwähnen, dass durch die Beigabe von Kreatin, Cholesterin und Östrogen eine kommerzielle Weiterentwicklung von B27 stattgefunden hat, welche höhere Synapsendichten und somit verbesserte Bedingungen für elektrophysiologische Tests verspricht [Brewer et al. 2008]. Diese neuerliche Veränderung der originären Rezeptur fand aus zeitlichen Gründen keinen Eingang mehr in unser Medium.

Die Feststellung, dass die Mct8^{-/-}-Maus keine offensichtlich neurologischen und psychomotorischen Beeinträchtigungen aufweist, lässt nun vermuten dass der Verlust von Mct8 in der Maus - im Unterschied zum Menschen - kompensiert wird [Dumitrescu et al. 2006]. Basierend auf der erfolgreichen Kultivierung von primären, kortikalen Neuronen der Maus haben wir erstmalig gezeigt, dass MCT8 in Neuronen aktiv ist und dort sogar eine zentrale Rolle für die T₃ Aufnahme übernimmt. Heuer und Kollegen belegten zunächst die Expression von Mct8 im Gehirn der Maus durch den ersten Nachweis des Transkripts im zerebralen Kortex und Hippocampus mittels *in situ* Hybridisierung [Heuer et al. 2005]. Eine andere Studie über Mct8-defiziente Mäuse beschrieb ebenso die Expression von Mct8 in weiten Teilen des Gehirns, Untersuchungen zur Funktion in isolierten Neuronen erfolgten aber an Purkinje-Zellen (Körnerzellen) des Kleinhirns. Ein Resultat dieser Untersuchung war der Nachweis der T₃-Abhängigkeit der Entwicklung dieser Zellen, dies jedoch losgelöst von der Anwesenheit von Mct8 [Trajkovic et al. 2007]. Wir wiesen indes nach, dass Mausneurone auch andere prominente T₃Transporter synthetisieren. Dies gelang einerseits meiner Kollegin Eva Wirth mit der Methode der quantitativen Realtime-PCR mit mRNA von Neuronen aus der Kultur, als auch mir durch den Einsatz von Inhibitor-Substanzen für OATP-14 und LAT1+2 unter Verwendung radioaktiv markiertem T₃. Die durchgeführten Transport-Tests zeigen, dass in unserem Modell ein erheblicher Teil (> 50 %) der Gesamtaufnahme von T₃ über MCT8 vermittelt wird. Offensichtlich ist trotz der massiven Minderung der Versorgung von Mct8^{-/-}-Neuronen keine Kompensation über Expressionsregulation anderer Transporter vonnöten, da die Importfähigkeit von Neuronen des Wildtyps unter Behandlung mit dem Mct8-Inhibitor Bromsulphthalein (BSP) und bei Mct8-Defizienz gleich beeinträchtigt ist.

Die Erkenntnis, dass weitere T_3 Transporter in Neuronen der Maus aktiv sind, sowie der immunhistochemische Nachweis von Lat2-Protein ausschließlich in der Maus *in vivo* und *in vitro*, lassen den Schluss zu, dass die Entwicklung und Funktion von Mausneuronen wohl mit wesentlich geringeren T_3 -Konzentrationen im Gehirn gesichert bleibt. Dies gilt bei gleichzeitiger Verfügbarkeit mindestens eines alternativen Aufnahmeweges [Wirth et al. 2009a]. Aus intensiven Verhaltenstests mit $Mct8^{-/y}$ -Mäusen in der „German Mouse Clinic“ traten schließlich phänotypische Merkmale hervor. So gab es Veränderungen im Angstempfinden oder in den zeitlichen Abständen der regelmäßigen Fellpflege im Vergleich zum Wildtyp. Die gefundenen Unterschiede zeichnen aber ein undeutliches Bild, da sie auf Zustände der Hypothyreose als auch der Hyperthyreose hindeuten. Wir haben die Hypothese verfolgt, dass Neurone aus unterschiedlichen Arealen jeweils bestimmte Kombinationen aus Transportern synthetisieren. So bleiben Neurone, trotz der hohen T_3 -Werte im Serum von $Mct8^{-/y}$ -Tieren, unterversorgt wenn sie ausschließlich über MCT8 verfügen. Neurone die hingegen noch weitere Transporter besitzen, erhalten aus der T_3 -reichen Umgebung dann einen Überschuss (Abb. 4). Weiterhin sollten auch Gliazellen MCT8-abhängig T_4 aufnehmen und T_3 abgeben, da nur sie Deiodase2 in Gehirn synthetisieren und die Aktivität in $Mct8^{-/y}$ -Mäusen erhöht ist, ein sicheres Indiz für Hypothyreose [Dumitrescu et al. 2006]. Da diese nun für die Versorgung von Neuronen mit Substraten aus der Blut-Hirn-Schranke und den Ventrikeln verantwortlich zeichnen wäre im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Verhaltenstests nur phänotypische Merkmale einer generellen Unterversorgung zu erwarten gewesen.

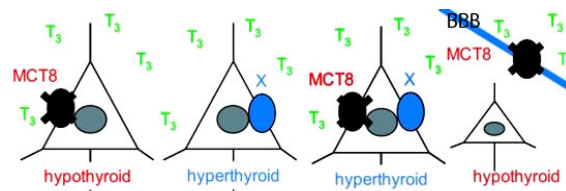


Abb. 4: Die neuronale Expression alternativer T_3 Transporterproteine in $Mct8^{-/y}$ -Mäusen führt aufgrund hoher T_3 -Werte im Serum zur lokalen Hyperthyreose von Neuronpopulationen, während $Mct8$ -abhängige Zellen jedoch unterversorgt sind. Modifiziert nach Supplement-Material aus [Wirth, Roth et al., Journal of Neuroscience 2009]

Die Feststellung, dass das trizyklische Antidepressivum Desipramin die Importfunktion von MCT8 hemmt, eröffnet eine neue Sichtweise auf den Zusammenhang zwischen veränderten Schilddrüsenhormonwerten und der Behandlung von schwerer Depression durch Psychopharmaka. Zwar ist bis heute der genaue Wirkmechanismus von Antidepressiva ungeklärt [Cowen 2008, Sanacora 2008], jedoch ist mehrfach gezeigt worden, dass erfolgreich verlaufende Therapien von einer Senkung von gebundenem sowie freiem T_4 im Serum begleitet werden [Baumgartner 2000]. In Anbetracht der Tatsache, dass DMI in der Schilddrüse akkumuliert [Rousseau et al. 1998], sollten somit zukünftige Untersuchungen klären ob MCT8 für die Freisetzung von T_4 aus der Schilddrüse mitverantwortlich ist.

Außerdem ist es bemerkenswert, dass Patienten unter der Behandlung von Antidepressiva problemlos hohe Dosen Schilddrüsenhormon verabreicht bekommen können und sie häufig davon profitieren [Bauer et al. 2009, Joffe et al. 1993]. Dies könnte nun ein Hinweis auf eine gestörte Verteilung oder Freisetzung von Schilddrüsenhormon bei der täglichen Einnahme von Antidepressiva sein. Trotz dieses neuen Aspekts in der Depressionsforschung bleibt unklar, ob die veränderten Schilddrüsenhormonwerte nun einen Wirkungsmechanismus oder lediglich eine Folge einer erfolgreichen Therapie mit Antidepressiva darstellen.

Für die Schwere der AHDS-Erkrankung ist scheinbar die Mutation entscheidend. Anfang der neunziger Jahre wurden zwei Familien ausführlich studiert in denen männliche Nachkommen über mehrere Generationen hinweg an AHDS erkrankt waren (Mutanten L568P und L434W), aber relativ milde klinische Befunde aufwiesen [Bialer et al. 1992, Stevenson et al. 1990]. Es gibt nun eine Vielzahl von biochemischen Vorgängen, die in jedem Zelltyp oder für jede Mutante anders ablaufen oder gestört sein können. So kann zunächst die Expression an sich (wie im Falle der Mutante G558D) durch frühzeitige Degradierung des Proteins unterbunden oder trotz erfolgreicher Synthese die nachfolgende Translokation an die Zellmembran gestört sein (Mutanten Δ F230, L471P). Aber auch wenn dies nachweislich geschieht, so bleibt die Frage nach der Transportkapazität des mutierten Proteins. So fanden wir Mutanten, die kaum Transport zeigten (Mutanten A224V, Ins189I) oder aber gute verbliebene Aktivität aufwiesen (Mutanten R271H, Ins235V, L568P). Eine übersichtliche Interpretation der erhaltenen Ergebnisse ist in Abbildung 5 gezeigt.

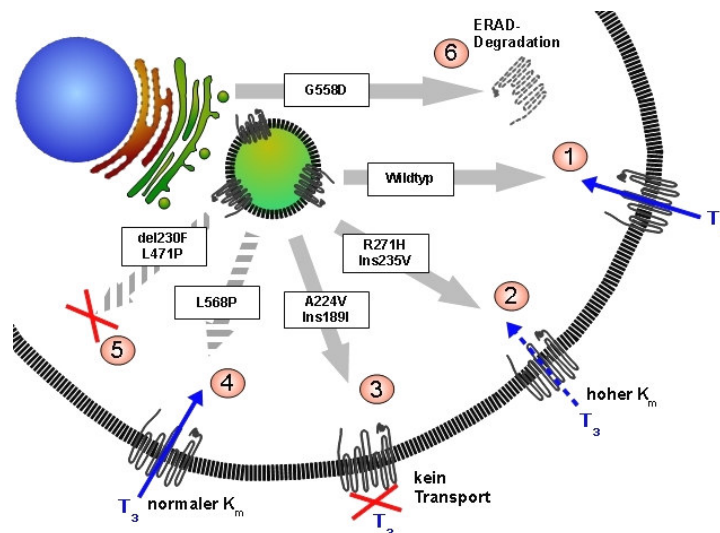


Abb. 5: Interpretation der Ergebnisse über die zellinterne Prozessierung pathogener MCT8 Mutanten. Die Synthese des Wildtyps verläuft störungsfrei und die Transportaktivität ist normal (1). R271H und Ins235V sind nachweisbar in der Zellmembran, der Transport ist aber eingeschränkt (2). Der T_3 Import durch A224V und Ins189I bleibt aus, trotz normaler Prozessierung zur Oberfläche (3). Ursächlich für minderschwere AHDS Symptome ist die Mutante L568P mit wildtyp-ähnlichen Eigenschaften (4). Δ F230, L471P und G558D werden zu unterschiedlichen Stadien der Proteinreifung abgebaut und erreichen die Zellmembran nicht (5)(6). ERAD: Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation. Grafik modifiziert aus [Kinne, Roth et al., Journal of Molecular Endocrinology 2009].

Da die Mutante L568P (aus einer Familie mit mildem AHDS) eine gute Transportrate und den gleichen K_m -Wert wie das Wildtyp-Protein aufweist, stützt dies weiter die Idee des Zusammenhangs zwischen Geno- und Phänotyp [Jansen et al. 2008]. Unklar ist allerdings, warum die Mutanten R271H und ins235V in unseren Tests ebenfalls gute Transportaktivitäten aufwiesen, die betroffenen Patienten aber in der Schwere der Symptomatik nicht ähnlich profitieren wie es für L568P der Fall ist. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert das abweichende Verhalten der untersuchten Mutanten in Abhängigkeit des Zelltyps. Es ist denkbar, dass sich R271H und ins235V in Neuronen völlig anders verhalten oder prozessiert werden als in MDCK-1 oder JEG-1. Auch muss in diesem Zusammenhang erörtert werden, ob es sich beim T_3 Import durch MCT8 um einen Vorgang nach Michaelis-Menten Kriterien handelt und der Begriff K_m -Wert hier richtig aufgefasst wird. Strenggenommen ist dies nur korrekt, solange sich keine Rückreaktion (Efflux) ereignet und eventuelle Zwischenschritte nach erfolgter Bindung nicht bestimmend für die Geschwindigkeit des gesamten Vorganges sind. Auch wenn die überwiegende Zahl von enzymatischen und Transportprozessen dieser Art den Bedingungen für Michaelis-Menten nicht entsprechen, so herrscht doch allgemein Konsens darüber, Transporter durch die Ermittlung von K_m -Werten zu charakterisieren und somit Vergleichen zu können. Die Tatsache, dass wohl jede Mutation spezifische Charakteristika besitzt, kann zukünftige Unternehmungen zur therapeutischen Behandlung erschweren. Es ist möglich, dass manche Mutanten AHDS auslösen im Zuge von Akkumulation in der Zelle oder sie nur in bestimmten Gewebetypen aktiv sind. Somit kann eine hochdosierte Behandlung mit Schilddrüsenhormon oder -analoga, je nach Mutation zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen führen und örtlich sogar schädliche Wirkungen entfalten, demonstriert durch die geringe Muskelmasse und Tachykardie bei AHDS aufgrund hoher T_3 Serumwerte [Herzovich et al. 2007, Wemeau et al. 2008]. Die Verwendung chemischer und pharmakologischer Chaperone hat das Ziel die korrekte Faltung einer Mutante und somit die Oberflächentranslokation zu verbessern [Brown et al. 1996]. Sind die für den Transportmechanismus verantwortlichen Domänen jedoch gestört, bleiben Therapieansätze mit diesen Substanzen *a priori* fruchtlos. Der Versuch, drei bisher kaum detektierbare Mutanten (L471P, L512P und G558D in MDCK-1 Zellen) durch chemische Chaperonbehandlung an die Zelloberfläche, bzw. in Funktion zu bringen, muss als gescheitert angesehen werden. Ebenso konnte die, einem Test vorausgehende, Inkubation mit dem natürlichen Liganden T_3 im Sinne eines pharmakologischen Chaperons keine Reaktivierung der Funktion herbeiführen [Kinne et al. 2009].

In der Summe bilden die hier diskutierten Untersuchungen über den Transport von T_3 in neuronalen Strukturen sowie den Punktmutanten des wohl wichtigsten Vertreters dieser Transporter - MCT8 - wichtige Bausteine für zukünftige Versuche mit dem Ziel die Situation für Patienten mit AHDS zu verbessern. Gleichzeitig ist es die Grundlage für ein tieferes Verständnis des Mechanismus des T_3 Transports durch MCT8.

Derzeitige und zukünftige Versuche (mit weiteren eigens generierten Mutanten), sollen nun Bereiche oder einzelne Aminosäuren enthüllen, die für die Funktion des Proteins MCT8 von hoher Wichtigkeit sind. Letzten Endes geht es um die genaue Identifikation der Interaktionspartner für T_3 in der Peptidkette. Dieses Wissen erleichtert dann wiederum die Emulation einer 3D-Struktur von MCT8 und könnte es ermöglichen neue Schilddrüsenhormonanaloga, wirksame Chaperone oder weitere spezifische Inhibitoren zu finden.

Strenggenommen entspricht die Symptomatik bei AHDS nur sehr eingeschränkt den Auswirkungen von (auf Schilddrüsenhormonmangel basierenden) kongenitalem Kretinismus. Die schwere motorische Einschränkung und das Ausbleiben jeglichen Intellekts wird bei Kretinismus nur selten festgestellt, ist bei AHDS aber in fast allen Fällen obligatorisch. Möglicherweise tritt hier eine irreparable Schädigung des Fetus zu einem sehr frühen Entwicklungszeitpunkt auf, begründet durch frühzeitige Resistenz gegen schon mütterliches Schilddrüsenhormon. In diesem Zusammenhang sollte in Zukunft näher untersucht werden welches Spektrum an Substanzen von MCT8 transportiert wird. Auch wenn der endokrinologische Phänotyp bei AHDS Patienten und der $Mct8^{-/y}$ -Maus auf den verminderten T_3 Transport als Ursache für die neurologischen Probleme hindeutet, ist bisher nicht auszuschließen, dass ein neuronaler Mangel einer anderen (eventuell strukturähnlichen) Substanz AHDS auslöst oder daran Anteil hat.

1.6. Literaturliste

- Allan W, Herndon CN, Dudley FC. Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly. *American Journal of Mental Deficiency* 1944;48:325-334.
- Bauer M, Berman SM, Schlagenhaut F, Voytek B, Rasgon N, Mandelkern MA, Whybrow PC, London ED. Regional cerebral glucose metabolism and anxiety symptoms in bipolar depression: effects of levothyroxine. *Psychiatry Research* 2009;181:71-76.
- Baumgartner A. Thyroxine and the treatment of affective disorders: an overview of the results of basic and clinical research. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2000;3:149-165.
- Bernal J. The significance of thyroid hormone transporters in the brain. *Endocrinology* 2005;146:1698-1700.
- Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2004;15:222-228.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 2005;11:127-152.
- Bialer MG, Lawrence L, Stevenson RE, Silverberg G, Williams MK, Arena JF, Lubs HA, Schwartz CE. Allan-Herndon-Dudley syndrome: clinical and linkage studies on a second family. *American Journal of Human Genetics* 1992;43:491-497.
- Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grueters A. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *European Journal of Endocrinology* 2005;153:359-366.
- Brewer GJ, Cotman CW. Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Research* 1989;494:65-74.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research* 1993;35:567-576.
- Brewer GJ, Boehler MD, Jones TT, Wheeler BC. NbActiv4 medium improvement to Neurobasal/B27 increases neuron synapse densities and network spike rates on multielectrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods* 2008;170:181-187.
- Broer S, Broer A, Hansen JT, Bubb WA, Balcar VJ, Nasrallah FA, Garner B, Rae C. Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain. *Journal of Neurochemistry* 2007;102:1758-1770.
- Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ. Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress & Chaperones* 1996;1:117-125.
- Campos-Barros A, Meinhold H, Stula M, Muller F, Kohler R, Eravci M, Putzien O, Baumgartner A. The influence of desipramine on thyroid hormone metabolism in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994;268:1143-1152.
- Cowen PJ. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? *Trends in Pharmacological Sciences* 2008;29:433-436.

- Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 1988;115:61-69.
- Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Weiss RE, Refetoff S. A thyroid hormone analog with reduced dependence on the monocarboxylate transporter 8 for tissue transport. *Endocrinology* 2009;150:4450-4458.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *American Journal of Human Genetics* 2004;74:168-175.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* 2006;147:4036-4043.
- Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Verrey F, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ. Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology* 2001;142:4339-4348.
- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:40128-40135.
- Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 2004;364:1435-1437.
- Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Molecular Endocrinology* 2008;22:1357-1369.
- Friesema EC, Visser WE, Visser TJ. Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010;[in press].
- Gika AD, Siddiqui A, Hulse AJ, Edward S, Fallon P, McEntagart ME, Jan W, Josifova D, Lerman-Sagie T, Drummond J, Thompson E, Refetoff S, Bonnemann CG, Jungbluth H. White matter abnormalities and dystonic motor disorder associated with mutations in the SLC16A2 gene. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2009;[in press].
- Guadano-Ferraz A, Obregon MJ, St Germain DL, Bernal J. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997;94:10391-10396.
- Hall RC. Psychiatric effects of thyroid hormone disturbance. *Psychosomatics* 1983;24:7-11, 15-18.
- Herzovich V, Vaiani E, Marino R, Dratler G, Lazzati JM, Tilitzky S, Ramirez P, Iorcansky S, Rivarola MA, Belgorosky A. Unexpected peripheral markers of thyroid function in a patient with a novel mutation of the MCT8 thyroid hormone transporter gene. *Hormone Research* 2007;67:1-6.
- Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema ECH, Visser TJ, Bauer K. The Monocarboxylate Transporter 8 Linked to Human Psychomotor Retardation Is Highly Expressed in Thyroid Hormone-Sensitive Neuron Populations. *Endocrinology* 2005;146:1701-1706.
- Hypothyroidism NEC, Collaborative. Effects of neonatal screening for hypothyroidism: prevention of mental retardation by treatment before clinical manifestations. *New England congenital hypothyroidism collaborative. Lancet* 1981;2:1095-1098.

- Jansen J, Friesema ECH, Kester MHA, Milici C, Reeser M, Gruters A, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Wemeau J-L, Busi da Silva Canalli MH, Lundgren J, McEntagart ME, Hopper N, Arts WF, Visser TJ. Functional Analysis of Monocarboxylate Transporter 8 Mutations Identified in Patients with X-Linked Psychomotor Retardation and Elevated Serum Triiodothyronine. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;92:2378-2381.
- Jansen J, Friesema EC, Kester MH, Schwartz CE, Visser TJ. Genotype-phenotype relationship in patients with mutations in thyroid hormone transporter MCT8. *Endocrinology* 2008;149:2184-2190.
- Joffe RT, Singer W, Levitt AJ, MacDonald C. A placebo-controlled comparison of lithium and triiodothyronine augmentation of tricyclic antidepressants in unipolar refractory depression. *Archives of General Psychiatry* 1993;50:387-393.
- Kinne A, Roth S, Biebermann H, Koehle J, Gruters A, Schweizer U. Surface translocation and T3 uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. *Journal of Molecular Endocrinology* 2009;[in press].
- Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods* 1987;20:83-90.
- Leonard JL. Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development. *Steroids* 2008;73:1008-1012.
- 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. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nature Genetics* 1998;19:83-86.
- Maranduba CM, Friesema EC, Kok F, Kester MH, Jansen J, Sertie AL, Passos-Bueno MR, Visser TJ. Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *Journal of Medical Genetics* 2006;43:457-460.
- Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *New England Journal of Medicine* 2002;347:95-102.
- Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development. *European Journal of Endocrinology* 2004;151 Suppl 3:U25-37.
- Namba N, Etani Y, Kitaoka T, Nakamoto Y, Nakacho M, Bessho K, Miyoshi Y, Mushiake S, Mohri I, Arai H, Taniike M, Ozono K. Clinical phenotype and endocrinological investigations in a patient with a mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *European Journal of Pediatrics* 2008;167:785-791.
- Nemeroff CB. Augmentation regimens for depression. *Journal of Clinical Psychiatry* 1991;52 Suppl:21-27.
- Nunez J, Couchie D, Aniello F, Bridoux AM. Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. *Neurochemical Research* 1991;16:975-982.
- Rose SR, Brown RS, Foley T, Kaplowitz PB, Kaye CI, Sundararajan S, Varma SK. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 2006;117:2290-2303.
- Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:34948-34954.

- Roth S, Zhang S, Chiu-Ugalde J, Wirth EK, Schweizer U. Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2010;[accepted January 14th].
- Rousseau A, Marquet P, Lagorce JF, Sauvage MF, Buxeraud J, Lachatre G, Raby C. Thyroid accumulation and adverse effects of imipramine and desipramine in rats after long-term administration. *Pharmacology* 1998;57:242-248.
- Sanacora G. New understanding of mechanisms of action of bipolar medications. *Journal of Clinical Psychiatry* 2008;69 Suppl 5:22-27.
- Schwarcz G, Halaris A, Baxter L, Escobar J, Thompson M, Young M. Normal thyroid function in desipramine nonresponders converted to responders by the addition of L-triiodothyronine. *American Journal of Psychiatry* 1984;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. Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *American Journal of Human Genetics* 2005;77:41-53.
- Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metabolism* 2008;8:237-248.
- Sijens PE, Rodiger LA, Meiners LC, Lunsing RJ. ¹H magnetic resonance spectroscopy in monocarboxylate transporter 8 gene deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008;93:1854-1859.
- Stevenson RE, Goodman HO, Schwartz CE, Simensen RJ, McLean WT, Jr., Herndon CN. Allan-Herndon syndrome. I. Clinical studies. *American Journal of Human Genetics* 1990;47:446-453.
- Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:43489-43495.
- Tohyama K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 2004;145:4384-4391.
- Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, Raivich G, Bauer K, Heuer H. Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:627-635.
- Wemeau JL, Pigeyre M, Proust-Lemoine E, d'Herbomez M, Gottrand F, Jansen J, Visser TJ, Ladsous M. Beneficial effects of propylthiouracil plus L-thyroxine treatment in a patient with a mutation in MCT8. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008;93:2084-2088.
- 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. 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. *Journal of Neuroscience* 2009a;29:9439-9449.

Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, Schmitz D, Bornkamm GW, Coppola V, Tessarollo L, Schomburg L, Kohrle J, Hatfield DL, Schweizer U. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *Faseb Journal* 2009b;[Published online before print].

Zoeller RT, Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *Journal of Neuroendocrinology* 2004;16:809-818.

2. Anteilserklärung

Herr Stephan Roth hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

- 1 S. Roth, S. Zhang, J. Chiu, EK. Wirth, U. Schweizer.
Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival.
Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.
(accepted January 14, 2010)

75 Prozent

Herr Roth erhob nahezu sämtliche Daten und führte die statistische Auswertung durch. Alle Abbildungen wurden von ihm erstellt, sowie der überwiegende Teil des Manuskriptes.

- 2 A. Kinne & S. Roth, H. Biebermann, J. Köhrle, A. Grüters, U. Schweizer.
Surface translocation and T3 uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent.
Journal of Molecular Endocrinology
2009, 43: 263-271

30 Prozent

Herr Roth hatte 40%igen Anteil an den experimentellen Arbeiten. Die Abbildung 2 hat er zur Hälfte beigetragen. Die Abbildungen 3, 4 und 5 wurden gänzlich von Herrn Roth erstellt. Auch alle statistischen Auswertungen wurden von ihm durchgeführt. Am Manuskript hat er anteilig mitgewirkt.

- 3 EK. Wirth & S. Roth, C. Blechschmidt, SM. Hölter, L. Becker, I. Racz, A. Zimmer, T. Klopstock, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, W. Wurst, T. Naumann, A. Bräuer, M. Hrabé de Angelis, J. Köhrle, A. Grüters, U. Schweizer.
Neuronal T₃ uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T₃ transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome.
Journal of Neuroscience
2009, 29(30): 9439-9449

20 Prozent

Die Abbildungen 4D, 4E und 4F hat Herr Roth erstellt und zusätzlich die experimentellen Arbeiten sowie die statistische Auswertung hierfür durchgeführt. Weiterhin war er an allen Experimenten beteiligt, die die Kultur und Behandlung von Neuronen erforderten (Abbildungen 4A, 4B, 5A, 5B). Am Manuskript hat er anteilig mitgewirkt.

Stephan Roth

Prof. Dr. J. Köhrle

3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

S. Roth, S. Zhang, J. Chiu, EK. Wirth, U. Schweizer. Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. (accepted January 14, 2010)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.007>

A. Kinne & **S. Roth**, H. Biebermann, J. Köhrle, A. Grüters, U. Schweizer. Surface translocation and T3 uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. **Journal of Molecular Endocrinology** 2009, 43: 263-271

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

EK. Wirth & **S. Roth**, C. Blechschmidt, SM. Hölder, L. Becker, I. Racz, A. Zimmer, T. Klopstock, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, W. Wurst, T. Naumann, A. Bräuer, M. Hrabé de Angelis, J. Köhrle, A. Grüters, U. Schweizer. Neuronal T₃ uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T₃ transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. **Journal of Neuroscience** 2009, 29(30): 9439-9449

<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6055-08.2009>

4. Lebenslauf

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

5. Publikationsliste

S. Roth, S. Zhang, J. Chiu, EK. Wirth, U. Schweizer. Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. (accepted January 14, 2010)

EK. Wirth, M. Conrad, J. Winterer, C. Wozny, BA. Carlson, **S. Roth**, D. Schmitz, GW. Bornkamm, V. Coppola, L. Tessarollo, L. Schomburg, J. Köhrle, DL. Hatfield, U. Schweizer. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. **FASEB Journal**. (Published online November 4, 2009.)

A. Kinne & **S. Roth**, H. Biebermann, J. Köhrle, A. Grüters, U. Schweizer. Surface translocation and T₃ uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent. **Journal of Molecular Endocrinology** 2009, 43: 263-271

EK. Wirth & **S. Roth**, C. Blechschmidt, SM. Hölter, L. Becker, I. Racz, A. Zimmer, T. Klopstock, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, W. Wurst, T. Naumann, A. Bräuer, M. Hrabé de Angelis, J. Köhrle, A. Grüters, U. Schweizer. Neuronal T₃ uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T₃ transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. **Journal of Neuroscience** 2009, 29(30): 9439-9449

A. Seiler, M. Schneider, H. Förster, **S. Roth**, E.K. Wirth, C. Culmsee, N. Plesnila, E. Kremmer, O. Rådmark, W. Wurst, G. W. Bornkamm, U. Schweizer and M. Conrad. Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress Into 12/15-Lipoxygenase Dependent and AIF-Mediated Cell Death. **Cell Metabolism** 2008, 8: 237-48

P.P.C. Poyck, G. Pless, R. Hoekstra, **S. Roth**, A.C.W.A. van Wijk, R. Schwartlander, T.M. van Gulik, I.M. Sauer, R.A.F.M. Chamuleau. First in vitro comparison of two bioartificial liver support systems: MELS CellModule and AMC-BAL. **International Journal of Artificial Organs** 2007, 30: 183-191

G. Pless, I. Steffen, K. Zeilinger, I.M. Sauer, E. Katenz, D.C. Kehr, **S. Roth**, T. Mieder, R. Schwartlander, Ch. Müller, B. Wegner, M. S. Hout, P. Neuhaus, J.C. Gerlach. Evaluation of primary human liver cells in bioreactor cultures for extracorporeal liver support on the basis of urea production. **Artificial Organs** 2006, 30: 686-694

I.M. Sauer, K. Zeilinger, N. Obermayer, G. Pless, A. Pascher, T. Mieder, **S. Roth**, M. Goetz, D. Kardassis, A. Mas, P. Neuhaus, J.C. Gerlach. Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support – a preliminary report. **International Journal of Artificial Organs** 2002, 25: 1001-1005

Mao L, Zeilinger K, **Roth S**, Gerlach JC, Neuhaus P. Gleichzeitige Isolierung von Hepatozyten, Itozellen und Sinusendothelzellen der Leber aus demselben Organ. **Z.Gastroenterol.** 2000; 39:94.

6. Selbstständigkeitserklärung

Erklärung

„Ich, Stephan Roth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung von Schilddrüsenhormon Transportproteinen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 13.07.2010

Stephan Roth

7. Danksagung

Die Jahre der Promotion sind eine spannende Zeit. Ein Promovend entdeckt viele ungekannte Facetten an seiner Person, einerseits ausgelöst durch lang anhaltende Beschäftigung mit einem Themengebiet als auch der wiederholt auftretenden Konfrontation mit dem Versagen der eigenen Theorien. Ich war jedoch nicht alleine auf diesem Weg. Viele Begleiter gesellten sich, dauerhaft oder zeitweilig hinzu und halfen mir in vielerlei Hinsicht. An erster Stelle steht hier mein Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Dr. Ulrich Schweizer. Er ist eine stete Quelle für neue Forschungsansätze und spannende Experimente. Betonen möchte ich die vielen Situationen mit Ulrich in denen Erkenntnisgewinn daraus bestand die Sichtweise zu ändern und gewohntes aufzugeben. Anerkennung gilt auch den beiden Kolleginnen und Eva Wirth und Anita Kinne, die beide eng mit mir zusammen arbeiteten und viel Ausdauer bewiesen haben. Es entstanden auch Freundschaften zu weiteren Kollegen wie Jazmin Chiu-Ugalde, Jennifer Merz, Julia Drebes und Carolin Sieland. Der persönliche Kontakt und Erfahrungsaustausch mit ihnen war wichtig und half dabei in den eigenen Bemühungen nicht nachzulassen.

Die vielen weiteren Forscher des Instituts für experimentelle Endokrinologie bilden eine ungewöhnlich positiv gesinnte Gemeinschaft. Zu Verdanken ist dies dem offenen und kollegialen Geist, getragen von Prof. Dr. Lutz Schomburg und dem Leiter des Instituts, Prof. Dr. Josef Köhrle. Sie und die Vielzahl von Doktoranden, technischen Assistenten und Praktikanten sind allesamt auf einem guten und erfolgreichen Weg.

Neben der beruflichen Unterstützung erhielt ich auch viel Rückenwind von privater Seite. Die Geburt meiner Tochter während der Promotion hat zwar vieles nicht eben einfacher gemacht, aber ihre Lebensfreude hat stets alle Sorgen vertrieben und immer wieder Kraft gegeben. Meiner Lebensgefährtin Beate Plötz gebührt in diesem Sinn besondere Wertschätzung. Das Leben mit einem Doktoranden ist oft kompliziert und die gemeinsame Zeit meist ein rares Gut. Ich danke dir für die Geduld mit mir und deine fortwährende Zuversicht.