

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

DISSERTATION

Etablierung und Validierung einer neuartigen nicht-radioaktiven Methode zur Analyse
der Funktionalität von spezifischen Schilddrüsenhormon-Transportermolekülen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Roopa Jayarama Naidu

aus Berlin

Datum der Promotion 10. März 2017

„The greatest *E*nemy of knowledge is not ignorance,
it is the *I*llusion of knowledge.“

INHALTSVERZEICHNIS

A. Abstract	2
A.1 Establishment and Validation of a novel Nonradioactive Uptake Assay for Analysis of Thyroid Hormone Transporter Function	2
A.2 Etablierung und Validierung einer neuartigen nicht-radioaktiven Methode zur Analyse der Funktionalität von spezifischen Schilddrüsenhormon-Transportermolekülen	4
B. Eidesstattliche Erklärung	6
C. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	7
D. Auszug aus ISI Web of Knowledge	9
E. Druckexemplar der Publikation	10
F. Lebenslauf	18
G. Publikationsliste	19
H. Danksagung	20

A. ABSTRACT

A.1 Establishment and Validation of a novel Nonradioactive Uptake Assay for Analysis of Thyroid Hormone Transporter Function

Thyroid hormones (TH) are prime molecular switches of endocrine pathways regulating cell metabolism, proliferation and differentiation. After entering the cell through TH-specific trans-membrane transporters (THTT), THs bind to their respective nuclear TH-receptor to alter the gene-expression pattern accordingly. Structural and mechanistic disparities in THTTs impede essential endocrine mechanisms, e.g. patients with inherited dysfunctional THTTs suffer from differently pronounced psychomotor retardation and muscular hypotonia (Allan-Herndon-Dudley syndrome). Likewise, it is crucial to disclose substances with effects on the functionality of THTTs (i.e. endocrine disruptors). These endocrine disruptors might impair the complex Hypothalamus-Hypophysis-Thyroid Axis, as observed with cancer patients who were treated with tyrosine kinase inhibitors, e.g. Dasatinib.

Currently, techniques used to study the functionality of THTTs employ radioactively labeled substrates that require special expertise and lab facilities with higher safety standards. Further, corresponding regulatory and disposal issues delay the experimental planning extensively. These drawbacks are not encountered with the newly introduced nonradioactive approach that implements the chemical reaction described by Izaak Kolthoff and Ernest Sandell in the 1930s. Precisely because iodides catalyze this reaction, the uptake of any iodine-containing THTT substrate can be quantified by a colorimetric read-out, thus facilitates label-independent iodine-detection. For the validation of the non-radiometric method, we monitored the Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8)-mediated T3 uptake in a physiological (primary murine astrocytes) and genetically modified cell model (MCT8-(overexpressing) MDCK-1 cells), subsequently re-evaluating these setups with the radiometric method.

In parallel, we elucidated the kinetics of the transporter-specific inhibitor Bromosulphthalein and confirmed the MCT8-specific substrate spectrum in MCT8-MDCK-1 cells. Successively, all experimental setups underlined that the new methodology holds a great capability to deliver consistent and reproducible data that additionally aligned to radiometric assay results. Despite we observed assay sensitivity being finite, it is yet sufficient for an initial and simple functional testing of THTTs. The

initial data obtained can then be verified in follow-up experiments applying orthogonal methods, e.g. LC-MS/MS.

In summary, this work introduces a label-independent non-radiometric methodology that assists in characterizing essential aspects of THTTs. The recyclable reaction educts and technical advantages of the assay improved experimental handling, and extensively reduced workload, laboratory and material costs. Hence, this methodology encourages fast, initial functional testing of further THTTs, particularly in laboratories with restricted finances, expertise and facilities.

By having minimized the non-radioactive assay format onto 96-wells microtiter plates, the next goal is to explore its applicability in high-throughput screenings of compound libraries for THTT-specific endocrine disruptors.

A.2 Etablierung und Validierung einer neuartigen nicht-radioaktiven Methode zur Analyse der Funktionalität von spezifischen Schilddrüsenhormon-Transportermolekülen

Schilddrüsenhormone (SH) sind wichtige Regulatoren endokriner Signalwege, die den Stoffwechsel, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen kontrollieren. SH gelangen über spezifische Transmembran Transporter (TT) in die Zelle und binden an die im Zellkern vorliegenden SH-Rezeptoren, um die Aktivitätsmuster von spezifischen Genabschnitten zu ändern. Das klinische Bild von Patienten mit defekten TT zeigt eine individuell ausgeprägte psychomotorische Minderentwicklung und eine muskuläre Hypotonie (Allan-Herndon-Dudley Syndrom). Ferner ist es wichtig, Substanzen (endokrine Disruptoren) zu identifizieren, welche die Funktionalität der TT beeinflussen können. In dieser Hinsicht, könnten diese endokrinen Disruptoren den Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse stören, wie dies bei Krebspatienten unter der Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Dasatinib) zu beobachten war.

Zurzeit werden zur Charakterisierung von TT Methoden mit radioaktiv markierten Substraten verwendet. Diese Assays setzen jedoch geschulte Experimentatoren und spezielle Laboreinrichtungen mit höheren Sicherheitsvorkehrungen voraus. Der damit verbundene, große organisatorische Aufwand und die strengen Entsorgungsrichtlinien beeinträchtigen nicht selten die experimentelle Planung und Ausführung. Diese Einschränkungen können mit der neuen nicht-radioaktiven Detektionsmethode, welche die chemische Reaktion nach Izaak Kolthoff und Ernest Sandell aus den 1930-ern implementiert, umgangen werden. Diese Reaktion beruht auf den katalytischen Effekt von freien Iodid-Molekülen. Folglich kann diese Methode die TT-vermittelte Aufnahme von beliebigen, iodid-haltigen Substraten direkt über eine Farbreaktion quantifizieren und benötigt somit keine speziellen Moleküle zur Detektion.

Um die neuartige Methode zu validieren, untersuchten wir den vom Monocarboxylat Transporter 8 (MCT8)-vermittelten T3 Transport in einem physiologischen (primäre murine Astrozyten) und einem genetisch modifizierten Zellsystem (MCT8-überexprimierende MDCK-1 Zellen), und verglichen diese Ergebnisse mit den radiometrisch ermittelten Daten. Parallel dazu ermittelten wir in MCT8-überexprimierenden MDCK-1 Zellen die T3 Aufnahme in Anwesenheit des transporter-spezifischen Inhibitors Bromosulphthalein und charakterisierten das MCT8-spezifische Substratspektrum. Die nicht-radioaktive Methode lieferte stets konsistente und

reproduzierbare Daten, welche mit den radiometrisch erhobenen Ergebnissen unmittelbar vergleichbar waren. Trotz der eingeschränkten Sensitivität des neuartigen Assays, ist die nicht-radioaktive Methode durchaus ausreichend für einleitende und schnelle, funktionelle Untersuchungen von TT. Die ermittelten Daten können anschließend mit orthogonalen Methoden, wie bspw. der LC-MS/MS verifiziert werden. Zusammenfassend ermöglicht die nicht-radioaktive Iodid-Detektionsmethode, essentielle Charakteristika von TT schnell und zuverlässig zu erfassen. Die vielen technischen Vorteile, wie die vereinfachte experimentelle Handhabung, verkürzte Arbeitszeit und verringerten Materialkosten ebnet den Weg, sowohl grundlegende als auch schwerpunktmäßige Untersuchungen von weiteren TT durchzuführen. Besonders ist dies für Arbeitsgruppen mit begrenzten Ressourcen attraktiv.

Mit der erfolgreichen Miniaturisierung des Assay-Formats auf 96-well Mikrotiterplatten wird der nicht-radioaktive Assay in Hochdurchsatz-Screenings von Substanzbibliotheken eingesetzt werden, um potenzielle endokrine Disruptoren zu identifizieren.

B. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Roopa Jayarama Naidu, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Etablierung und Validierung einer neuartigen nicht-radioaktiven Methode zur Analyse der Funktionalität von spezifischen Schilddrüsenhormon-Transportermolekülen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „*Uniform Requirements for Manuscripts (URM)*“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

C. AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION**Publikation 1: TOP Journal**

Autoren: Roopa Jayarama-Naidu*, Jörg Johannes, Franziska Meyer, Eva Kathrin Wirth, Lutz Schomburg, Josef Köhrle und Kostja Renko.

*Erstautorin

Titel: A Nonradioactive Uptake Assay for Rapid Analysis of Thyroid Hormone Transporter Function, *Endocrinology*, July 2015

Impact Faktor 4,5 (Stand: Februar 2016), Rank 28 von 128 Journals des Fachbereichs *Endocrinology and Metabolism*

Beitrag im Einzelnen der Promovendin:

1. Allgemeiner Aufbau und Vorbereitung der nicht radio-aktiven Quantifizierungsmethode von Iodid (Vorarbeit):
 - a. Charakterisierung von Störfaktoren in der Reaktionslösung des Assays und im Kulturmedium für MDCK1 Zellen und verwendeten Lösungsmitteln
 - b. *in vitro* Kultivierung von MDCK1 Zellen in 96-well Mikrotiterplatten für die Durchführung der zell-basierten Assays, Präparation der MDCK1 Zellen aus Kulturflaschen (175cm²), Bestimmung und Verteilung einer festgesetzten Zellzahl pro well in der Assay Platte, Konfluenzbestimmung
 - c. Optimierung der Arbeitsschritte in Bezug auf Dichte und Kultivierung der MDCK1 Zellen in der Assay Platte, Inkubationszeit während der Substrat-Aufnahme und des oxidativen Aufschlusses der Zellen
 - d. Beurteilung eines geeigneten Verdünnungsfaktors der oxidativ verdauten Reaktion zur Quantifizierung der Iodid-Aufnahme
 - e. Präparation der Reagenzien zur Inkubation der Aufnahmereaktion, Lösung des Inhibitors (BSP)

 2. Validierung der nicht-radioaktiven Quantifizierungsmethode von Iodid
 - a. experimentelle Planung, Vorbereitung und Durchführung der zeitlich
-

-
- abhängigen Aufnahme von T3 in MDCK1 Zellen (Fig. 1)
 - b. experimentelle Planung, Vorbereitung und Durchführung zur Erstellung des Substrat-Profils von MCT8 in MDCK1 Zellen (Fig. 2A)
 - c. experimentelle Planung, Vorbereitung und Durchführung der zeitlich abhängigen Aufnahme von T3 \pm BSP als Inhibitor in MDCK1 Zellen (Fig. 2B)
 - d. experimentelle Planung, Vorbereitung und Durchführung der zeitlich abhängigen T3 Aufnahme in primären murinen Astrozyten (Fig. 3A)
3. Vorbereitung und Planung der experimentellen Durchführung mit der radioaktiven Methode:
 - a. Bereitstellung von Reagenzien und MDCK1 Zellen
 - b. ausführliche statistische Auswertung der Ergebnisse in Fig. 2D
4. Anfertigung des Manuskripts
 - a. ausführliche Formulierung des Methodenteils außer „*Isolation und cultivation of primary astrocytes*“
 - b. Erstellung von Grafiken Fig. 1 und Fig. 2 des Ergebnisteils und Supp. Fig.3 (Arbeitsablauf des Assays, S. 20)
 - c. ausführliche statistische Auswertung und Formulierung des Ergebnisteils zu Fig. 1, Fig. 2 und Fig. 3A
 - d. ausführliche statistische Auswertung der Assay Performance in Tab. 1
 - e. Mitwirkung an der Erstellung und Ergänzung des Abstracts, der Einleitung, des Diskussionsteils und die Zuweisung von Literaturquellen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

D. AUSZUG AUS ISI WEB OF KNOWLEDGE

ISI Web of KnowledgeSM

2014 JCR Science Edition
Journal Title Changes

Journal Citation Reports®

Journal Summary List
Journals from: **subject categories ENDOCRINOLOGY & METABOLISM** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Ranking is based on your journal and sort selections.

Navigation: < [1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7] >

Page 2 of 7

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to Journal Information)	ISSN	Total Cites	JCR Data (j)			Eigenfactor® Metrics (j)			
					Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
-	21	REV ENDOCR METAB DIS	1389-9155	1433	4.892	4.435	1.033	30	6.0	0.00318	1.299
-	22	BIOL SEX DIFFER	2042-6410	321	4.837		0.389	18	2.4	0.00161	
-	23	ENDOCR-RELAT CANCER	1351-0088	5382	4.805	5.217	1.078	128	5.9	0.01267	1.602
-	24	HORM BEHAV	0018-506X	9250	4.632	4.441	0.610	146	7.1	0.01935	1.419
-	25	BEST PRACT RES CLIN	1521-690X	2984	4.602	5.026	1.000	66	5.1	0.00875	1.611
-	26	BIOFACTORS	0951-6433	2788	4.592	4.226	0.678	59	6.6	0.00505	1.074
-	27	J MAMMARY GLAND BIOL	1083-3021	2267	4.526	6.077	0.684	19	7.7	0.00433	1.905
-	28	ENDOCRINOLOGY	0013-7227	45093	4.503	4.622	0.927	437	9.9	0.06062	1.447
-	29	THYROID	1050-7256	8834	4.493	5.282	1.010	196	5.8	0.02011	1.478
-	30	MOL CELL ENDOCRINOL	0303-7207	12922	4.405	4.105	1.153	287	5.7	0.03148	1.251
-	31	NEUROENDOCRINOLOGY	0028-3835	4204	4.373	3.615	0.260	50	>10.0	0.00582	1.068
-	32	EXP DIABETES RES	1687-5214	1258	4.325	3.908		0	2.9	0.00465	1.078
-	33	OSTEOPOROSIS INT	0937-941X	13679	4.169	4.242	0.840	306	6.6	0.02904	1.284
-	34	EUR J ENDOCRINOL	0804-4643	11140	4.069	3.936	0.732	231	6.6	0.02369	1.194
-	35	MOL ENDOCRINOL	0888-8809	13685	4.022	4.453	0.719	153	9.1	0.02063	1.514
-	36	CARDIOVASC DIABETOL	1475-2840	2813	4.015	3.659	0.830	159	2.9	0.00806	0.841
-	37	CURR OPIN CLIN NUTR	1363-1950	3923	3.989	4.385	1.105	76	5.7	0.00919	1.266
-	38	BONE	8756-3282	18954	3.973	4.312	0.774	310	7.5	0.03560	1.333
-	39	METABOLISM	0026-0495	11256	3.894	3.069	1.174	172	9.3	0.01540	0.831
-	40	ENDOCRINE	1355-008X	3687	3.878	2.842	0.749	251	4.4	0.00767	0.676

Journals 21 - 40 (of 128)

Navigation: < [1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7] >

Page 2 of 7

E. DRUCKEXEMPLAR DER PUBLIKATION

Autoren: R Jayarama-Naidu, J Johannes, F Meyer, EK Wirth, L Schomburg,
J Köhrle, K Renko.

Titel: *A Nonradioactive Uptake Assay for Rapid Analysis of Thyroid Hormone
Transporter Function*

Journal: *Endocrinology*, Juli 2015

DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2015-1016>

PMID: 25910050

F. LEBENSLAUF

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

G. PUBLIKATIONSLISTE

Publikation 1:

Roopa Jayarama-Naidu*, Jörg Johannes, Franziska Meyer, Eva Katrin Wirth, Lutz Schomburg, Josef Köhrle und Kostja Renko.

(*Erstautorin)

*A Nonradioactive Uptake Assay for Rapid Analysis of
Thyroid Hormone Transporter Function, Endocrinology, Juli 2015*

Publikation 2:

Jörg Johannes*, Roopa Jayarama-Naidu*, Franziska Meyer, Eva Katrin Wirth, Ulrich Schweizer, Lutz Schomburg, Josef Köhrle und Kostja Renko.

(*geteilte Erstautorenschaft mit gleichwertigem Beitrag)

*Silychristin, a flavanolignan derived from the milk thistle is a potent inhibitor of
the thyroid hormone transporter MCT8, Endocrinology, März 2016*

H. DANKSAGUNG

Mein herzliches Dankeschön möchte ich an die Mitarbeiter des Instituts für experimentelle Endokrinologie am Virchow Klinikum der Charité richten. Vielen Dank für die schöne Zeit auch außerhalb des Labors, beim gemeinsamen, berühmt berüchtigten Grillen im „Garten“.

Besonders Herrn Prof. Josef Köhrle danke ich für das sich wunderbar entwickelte und zukunftsweisende Promotionsthema. Ich schätzte, seine unzähligen, fachlich erläuternden Gespräche, welche mir viele Wege zu dem großen Erfolg dieser Dissertation aufzeigten. Außerdem danke ich ihm, für das unterstützende Mentoring für meine studienrelevanten Vorhaben, auch im Ausland.

Herrn Dr. rer. nat. Kostja Renko möchte ich ebenfalls für sein wertvolles, stetig motivierendes Feedback und seinen wegweisenden Input, seine Geduld und wertvolle Zeit danken. Der regelmäßige Austausch und seine unausschöpfbare Initiative haben dieser Arbeit und den beiden Publikationen in dem Journal *Endocrinology* zum Erfolg verholfen. Es war wieder sehr spannend und herausfordernd zugleich die „Welt“ der Assay-Entwicklung zu erleben.

Ohne die parallel laufenden Experimente von Herrn Dr. rer. nat. Jörg Johannes wäre es weitaus umständlicher gewesen, die Wichtigkeit der Ergebnisse von dieser Arbeit hervorzuheben. Trotz seines strengen Zeitplans, verschafften sein großer Enthusiasmus und seine stetige Motivation eine stabile Basis für diese Arbeit und die wichtigen Publikationen. Dadurch ist es mit unserer neuartigen Methode gelungen, das zuvor stark einseitige Methodenspektrum zur Quantifizierung von Iodid in Zellsystemen um eine aussichtsreiche nicht-radioaktive Alternative zu erweitern.

Ferner danke ich Frau Dr. rer. nat. Eva K. Wirth und Frau Dr. rer. nat. Franziska Meyer für ihren wertvollen Beitrag und Einsatz, uns die murinen Zellsysteme und genetisch modifizierten MDCK-1 Zellen bereitzustellen.

Für die labortechnischen Hilfestellungen danke ich herzlich Frau Kristin Fischer, Frau Carola Geiler und Frau Katja Schreiber. Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Lutz Schomburg für das wertvolle Feedback und die Erläuterung vieler, neuer Sichtweisen bedanken.

कुटुंब बाधव
परंपरागतपद्धती: खंडय नवजगंत्युन्मज्जंतं चि