

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie  
und  
Endokrinologischen Forschungs-Centrum der Charité (EnForCé)  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung hormonregulatorischer Effekte  
von gonadalen Steroiden, TGF- $\beta_1$  und GH  
auf die Promoter- und Enzymaktivität  
der humanen 5'-Deiodase Typ I in  
humanen HepG2-Zellen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Sebastian J. Herbert**  
aus Würzburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle  
2. Prof. Dr. med. J. Seufert  
3. Prof. Dr. med. B. O. Böhm

Datum der Promotion: 09.09.2011

meiner Mutter und meinem Vater



**"ENDOCRINOLOGY IS THE BACKBONE  
OF METABOLISM AND METABOLISM IS  
THE INTERSTITIUM OF MEDICINE."**

Robert H. Williams, MD

1.	EINLEITUNG .....	1
1.1.	Iodstoffwechsel und Schilddrüsenhormonmetabolismus .....	2
1.1.1.	Iod und Schilddrüsenhormone .....	2
1.1.2.	Regulation des Schilddrüsenhormonmetabolismus .....	3
1.2.	Selenmetabolismus .....	4
1.2.1.	Selen und Selenocystein .....	4
1.2.2.	Selenoproteine .....	4
1.2.3.	Iodthyronindeiodasen .....	5
1.3.	Regulation der Schilddrüsenhormonwirkung .....	7
1.3.1.	Schilddrüsenhormonrezeptoren .....	7
1.3.2.	Isoformen der Schilddrüsenhormonrezeptoren .....	8
1.3.3.	Struktur der Schilddrüsenhormonrezeptoren .....	10
1.3.4.	Schilddrüsenhormonresponsive Elemente .....	10
1.3.5.	Koregulatoren der Schilddrüsenhormonrezeptoren .....	11
1.3.6.	Funktion der Schilddrüsenhormonrezeptoren und Interaktion mit Koregulatoren .....	12
1.3.7.	Funktion der Schilddrüsenhormone .....	13
1.4.	Humane 5'-Deiodase Typ I .....	13
1.4.1.	Genlokalisierung und Genstruktur .....	13
1.4.2.	Promoterstruktur .....	14
1.4.3.	Proteincharakterisierung .....	14
1.4.4.	Steroidregulation der 5'DI in Tieren .....	15
1.5.	Steroidhormonstoffwechsel .....	16
1.5.1.	Steroide .....	16
1.5.2.	Primär- und Sekundärantwort nach Aktivierung nukleärer Rezeptoren .....	17
1.5.3.	Estrogen- und Androgenrezeptor .....	17
1.6.	„Low T <sub>3</sub> Syndrome“ und Aktivität der Deiodasen .....	18
1.6.1.	„Low T <sub>3</sub> Syndrome“ .....	18
1.6.2.	TGFβ <sub>1</sub> -Wirkung auf die h5DIII .....	19
1.6.3.	Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die h5'DI .....	19
1.6.4.	TGFβ <sub>1</sub> .....	19
1.6.5.	TGFβ <sub>1</sub> -Wirkung auf Selenoprotein P .....	20
1.7.	Growth Hormone und Schilddrüsenhormonstoffwechsel .....	21
1.7.1.	GH in „Critical Illness“ .....	21
1.7.2.	GH-Substitutionstherapie und Schilddrüsenhormone .....	21
1.7.3.	Growth Hormone .....	22
1.7.4.	Insulin-like growth factors .....	22
1.7.5.	Wirkung von GH und IGF-I .....	23
1.8.	Zielsetzung .....	25
2.	MATERIAL .....	26
2.1.	Geräte .....	26
2.2.	Verbrauchsmaterial .....	26
2.3.	Chemikalien .....	27
2.4.	Puffer und Lösungen .....	27
2.5.	Steroide und Zytokine .....	30
2.6.	Promoterreportergen-Konstrukte und Expressionsplasmide .....	31
2.7.	Zellkulturmedien und Zusätze .....	32
2.8.	Prokaryontische und eukaryontische Organismen .....	33

2.9.	Elektronische Datenverarbeitungsprogramme .....	33
3.	METHODEN.....	34
3.1.	Reportergene und Expressionsplasmide.....	34
3.1.1.	Plasmidpräparation.....	34
3.1.2.	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	34
3.2.	Zellkultur von HepG2-Zellen.....	35
3.2.1.	Zellkulturbedingungen und Passagieren der Zellen.....	35
3.2.2.	Trypanblaufärbetest und Zellzahlbestimmung.....	36
3.2.3.	Kulturbedingungen für den Luciferase- und Deiodase-Assay.....	36
3.2.4.	Steroidhormon-depletiertes Kälberserum (DCC-FCS).....	37
3.2.5.	Estrogenwirkung von Phenolrot.....	37
3.3.	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	37
3.3.1.	Transfektion von Reportergenkonstrukten und Luciferase-Assay.....	38
3.3.2.	Transfektion von AR bzw. ER $\alpha$ und Deiodase-Assay.....	38
3.4.	Hormoninkubation .....	40
3.5.	Luciferase-Assay - Promoteraktivitätsbestimmung der h5'DI.....	42
3.5.1.	Aktivitätsbestimmung der Luciferase .....	42
3.5.2.	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	43
3.6.	Deiodase-Assay - Enzymaktivitätsbestimmung der h5'DI.....	43
3.6.1.	Präparation von Zellhomogenaten .....	44
3.6.2.	Reinigung des Tracers .....	44
3.6.3.	Messung der Deiodaseaktivität .....	45
3.6.4.	Berechnung der spezifischen Enzymaktivität .....	45
3.7.	Statistische Auswertung .....	46
4.	ERGEBNISSE.....	48
4.1.	Wirkung von Steroidhormonen auf die h5'DI in HepG2-Zellen.....	48
4.1.1.	Analyse der Steroidregulation des h5'DI-Promoters im Luciferase-Assay... ..	48
4.1.2.	Analyse der Steroidregulation der h5'DI im Deiodase-Assay.....	49
4.2.	Überprüfung der TGF $\beta$ <sub>1</sub> -Responsivität der h5'DI in HepG2-Zellen.....	53
4.2.1.	Untersuchung der Regulation der h5'DI im Deiodase-Assay durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> ..	53
4.2.2.	Kontrolle von TGF $\beta$ <sub>1</sub> anhand des SePP-Promoters im Luciferase-Assay .....	54
4.3.	Überprüfung möglicher GH-Effekte auf die h5'DI in HepG2.....	55
4.3.1.	Untersuchung der GH-Regulation des h5'DI-Promoters im Luciferase-Assay .....	55
4.3.2.	Untersuchung der GH-Regulation der h5'DI im Deiodase-Assay.....	56
4.3.3.	Analyse der Wirkung von Glutamin, Glucose und Pyruvat auf die h5'DI ....	58
5.	DISKUSSION .....	59
5.1.	Bedeutung der h5'DI und Diskussion der angewandten Methoden.....	59
5.2.	Diskussion der Ergebnisse der Promoter- und Enzymaktivitätsexperimente	66
5.2.1.	Diskussion der Ergebnisse unter Steroidstimulation.....	66
5.2.2.	Alternative Mechanismen der h5'DI-Regulation.....	71
5.2.3.	Geschlechtsspezifische Unterschiede im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone.....	73
5.2.4.	Diskussion der Pathophysiologie des „Low T <sub>3</sub> Syndrome´s“ .....	75
5.2.5.	Diskussion der Ergebnisse der GH-Stimulation.....	78

---

6.	ZUSAMMENFASSUNG .....	83
7.	LITERATURVERZEICHNIS .....	85
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	98
9.	ANHANG.....	105
9.1.	Promotersequenz .....	105
9.2.	Wertetabelle .....	107



## 1. EINLEITUNG

Die Deiodasen bilden als Selenoproteine einen direkten Kreuzungspunkt im Stoffwechsel der essentiellen Spurenelemente Iod und Selen. Iod ist elementarer Bestandteil der Schilddrüsenhormone. Selen hingegen ist kovalent im enzymatisch aktiven Zentrum der Deiodasen gebunden, die die Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone katalysieren. Die 5'-Deiodase Typ I (5'DI) vermag als einzige der Deiodasen Schilddrüsenhormone sowohl am äußeren Ring als auch am inneren Ring zu deiodieren und kann somit zumindest *in vitro* Schilddrüsenhormone nicht nur aktivieren, sondern auch inaktivieren.

Zum einen treten Erkrankungen der Schilddrüse im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung des Menschen gehäuft aufseiten des weiblichen Geschlechts auf. Dementsprechend weist die Inzidenz der sporadischen Struma ein Verhältnis von 7:1 bis 9:1 zwischen weiblichen und männlichen Individuen auf (1). Eine erhöhte Belastung mit Sexualsteroiden und ein dadurch vermehrter Bedarf an Schilddrüsenhormonen während Pubertät, Gravidität und Klimakterium wird als Ursache für diesen Unterschied diskutiert. Möglicherweise ruft aber eine geschlechtsspezifische Regulation der 5'DI diese ungleichmäßige Verteilung hervor. Denn männliche Ratten präsentieren eine Testosteron-bedingte Steigerung der 5'DI-Expression in der Leber, die insofern von Bedeutung sein könnte, da die 5'DI eine Schlüsselposition im Metabolismus der Schilddrüsenhormone innehat.

Zum anderen konnte die Bedeutung der humanen 5'DI (h5'DI) im Zusammenhang mit dem „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ bestätigt werden. Das „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ tritt im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen auf und ist durch erniedrigte T<sub>3</sub>-, erhöhte rT<sub>3</sub>- sowie normale oder erniedrigte TSH- und T<sub>4</sub>-Spiegel im Serum gekennzeichnet. Ursächlich hierfür könnte zum einen eine erhöhte Aktivität der humanen 5-Deiodase Typ III (h5DIII) und zum anderen eine verminderte Aktivität der h5'DI sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der 5DIII durch TGFβ<sub>1</sub> hochreguliert wird. Bislang liegen keine detaillierten Ergebnisse vor, ob die h5'DI in diesem pathophysiologischen Zusammenhang durch TGFβ<sub>1</sub> kontrolliert wird (2) (3). Deshalb stellt sich einerseits die Frage, ob sich im humanen Zellkulturmodell ebenfalls eine geschlechtsabhängige Regulation der h5'DI durch gonadale Steroide nachweisen lässt und welchen Einfluss andererseits Zytokine oder Wachstumsfaktoren wie TGFβ<sub>1</sub> oder GH auf dieses Enzym ausüben, da bei schweren Krankheitsbildern, die eine intensivmedizinische Behandlung nötig machen, nicht nur die thyreotrope, sondern auch die somatotrope Hormonachse pathophysiologisch verändert ist (4) (5).

## 1.1. Iodstoffwechsel und Schilddrüsenhormonmetabolismus

### 1.1.1. Iod und Schilddrüsenhormone

Iod (I) gehört chemisch zur Gruppe der Halogene. Iod ist essentieller Bestandteil der Schilddrüsenhormone (6) (7).

Das Schilddrüsenhormon 3,5,3',5'-Tetraiod-L-Thyronin ( $T_4$ ), auch als L-Thyroxin bezeichnet, wird durch 5'-Deiodierung am äußeren phenolischen Ring (ORD) zum thyromimetisch aktiven Schilddrüsenhormon 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin ( $T_3$ ) (8). Die Rezeptoraffinität von  $T_4$  beträgt nur 10 % derer von  $T_3$ , weshalb  $T_3$  als biologisch aktiver Ligand und  $T_4$  als Prohormon gilt (9).

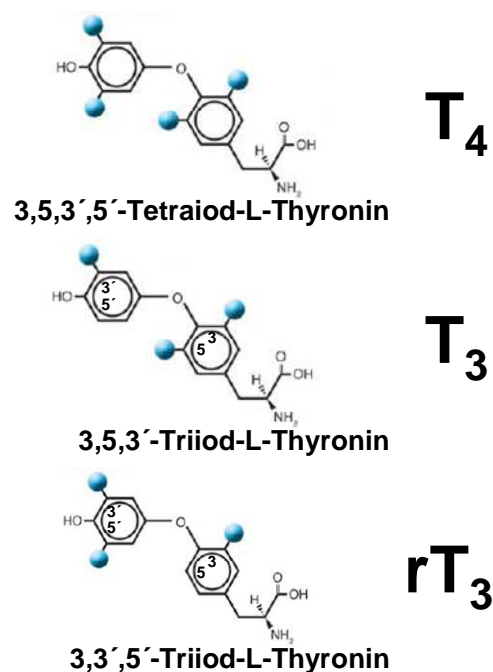


Abb. 1: Schilddrüsenhormone.  
modifiziert nach Bianco A.C. et al. (133).

Neben der 5'-Deiodierung ist auch eine 5-Deiodierung am inneren Tyrosylring (IRD) des Thyroxins möglich, was zur Bildung von 3,3',5'-Triiod-L-Thyronin (reverse  $T_3$ ,  $rT_3$ ), einer biologisch nahezu inaktiven Form, führt. Der weitere Abbau der Schilddrüsenhormone setzt sich wie folgt zusammen: Ein Teil wird durch zusätzliche Monodeiodierung in Diodthyronine und Monoiodthyronine umgewandelt. Ein weiterer Teil wird durch 4'-O-Sulfatierung oder 4'-O-Glukuronidierung in ausscheidungsfähige Form gebracht. Die Phenolsulfotransferasen (PST) erzeugen so unter anderem Triiod-L-Thyroninsulfat ( $T_3S$ ) und Diod-L-Thyroninsulfat ( $T_2S$ ) (6) (10). Der Rest wird durch oxidative Desaminierung und Decarboxylierung der Alanylseitenketten durch Enzyme des Aminosäurestoffwechsels in der

Leber oder den Nieren zu den Acetatanaloga Tetra- und Triiodthyreoacetat abgebaut (11) (12). Nur am Rande soll erwähnt werden, dass die alleinige Decarboxylierung von 3-Monoiodthyronin zur Bildung von 3-Iodthyronamin ( $T_1AM$ ) führt, einem Agonisten am „*Trace amine associated receptor 1*“ (TAAR1). In Tieren ruft  $T_1AM$  Hypothermie, Bradykardie und reduzierte kardiale Auswurfleistung hervor (13).

Die unter formaler Betrachtung denkbare freie Drehbarkeit des inneren sowie des äußeren Rings um die  $C_1-O$ - bzw.  $C_4-O$ -Einfachbindung macht eine Unterscheidung zwischen 3'- und 5'-Deiodierung nicht möglich. Dennoch bleibt zu erwähnen, dass die in 3- und 5- Position der am Tyrosylring iodierten Iodthyronine (ITHs) eine freie Drehbarkeit um diese Einfachbindungen energetisch erschweren.

### 1.1.2. Regulation des Schilddrüsenhormonmetabolismus

Schilddrüsenhormone werden im Menschen ausschließlich in der Glandula thyroidea, der Schilddrüse, gebildet (8) (7) (14).

Die Schilddrüse sezerniert  $T_3$  und  $T_4$  unter der Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. Der Hypothalamus kontrolliert diese Achse durch das „*Thyrotropin releasing hormone*“ (TRH) und Somatostatin, wobei ersteres die Hypophyse stimuliert, während letzteres diese inhibiert. Die Hypophyse wiederum fördert Sekretion und Synthese von  $T_4$  und  $T_3$  in der Schilddrüse durch das thyreoideastimulierende Hormon (TSH) (15).  $T_4$  und  $T_3$  hingegen üben eine negative Feedback-Reaktion auf Hypothalamus und Hypophyse aus, indem sie die Sekretion von TRH und TSH hemmen.

In der Schilddrüse entsteht  $T_3$  durch Kopplung von Diiodytyrosin und Monoiodtyrosin und vermutlich auch, indem Deiodasen intrathyroidal  $T_4$  in  $T_3$  umwandeln. Die Schilddrüse sezerniert  $T_3$  aber nur zu einem geringen Teil. Ungefähr 80 % des im Plasma zirkulierenden  $T_3$  werden extrathyroidal mit Hilfe der Deiodasen in der Körperperipherie durch Konversion von  $T_4$  generiert. Die totale Serumkonzentration von  $T_4$  (90 nM) ist ca. 45-fach größer als die von  $T_3$  (2 nM) (6).

$T_4$  und  $T_3$  werden zum Transport im Plasma an verschiedene Trägerproteine gebunden. Hauptvertreter dieser Proteine sind das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), Albumin, Thyroxin-bindendes Lipoprotein und Transthyretin, welches früher als Thyroxin-bindendes Präalbumin bezeichnet wurde (16) (1). Diese Proteinbindung bedingt, dass nur annähernd 0,30 % des gesamten Plasma- $T_3$  bzw. 0,02 % des  $T_4$  ungebunden sind. Nur freies  $T_3$  ( $fT_3$ ) und freies  $T_4$  ( $fT_4$ ) stehen den Zellen zur Verfügung und können ihre biologische Wirkung entfalten (8). Eine Erhöhung der Konzentration an Trägerproteinen sowie eine Zunahme der Bindungssättigung von TBG erhöhen die Bindung von  $T_4$  und  $T_3$  und verringern damit die

Konzentration an  $fT_3$  und  $fT_4$ . Der Plasma-TBG-Spiegel stellt somit einen weiteren wichtigen Parameter des Schilddrüsenhormonhaushalts dar (1) (12).

Der Vollständigkeit halber sei auf die altersabhängige Abnahme der Schilddrüsenfunktion hingewiesen. TSH-Wert und  $T_3/T_4$ -Quotient nehmen bei normaler  $T_4$ -Konzentration in der 8. und 9. Lebensdekade gesunder Menschen ab. Dies führt zu einem um 20 % reduzierten Bedarf an TH in hypothyreoten älteren Patienten. Ob dies als physio- oder pathologisch zu werten ist, bleibt unklar (1).

## 1.2. Selenmetabolismus

### 1.2.1. Selen und Selenocystein

Selen (Se) reiht sich im Periodensystem in die Gruppe der Chalkogene. Selen wird in Form von Selenocystein (Sec) kotranslational in Proteine eingebaut. Sec wird von vielen Autoren deshalb auch als 21. proteinogene Aminosäure bezeichnet (17). Sec entsteht aus einer Seryl-beladenen tRNA ( $tRNA^{[Ser]Sec}$ ; Abk.: SelC) über Selenophosphat (18). In spezifischen mRNAs wird der Einbau von Selenocystein durch das Stop-Codon *UGA* vermittelt (19). Um jedoch *UGA* als Signal für den Selenocysteineinbau zu erkennen, folgt in Eukaryonten im 3'-untranslatierten Bereich des vermeintlichen Stop-Codons eine Nukleotidsequenz, die eine spezifische Sekundärstruktur der mRNA ausbildet. Diese Sekundärstruktur, die den Namen „*selenocysteine insertion sequenz*“ (SECIS-Element) trägt, faltet sich zu einer sogenannten Haarnadelschleifenstruktur („*hairpin*“ oder „*stem-loop structure*“) mit einer terminalen Adenosinschleife oder einem terminalen Adenosinbuckel aus (7) (6). Durch Bindung eines selenospezifischen Elongationsfaktors an das SECIS-Element, wird die Termination verhindert und die Bindung einer Selenocysteintragenden tRNA ermöglicht. Der selenospezifische Elongationsfaktor heißt „*selenoprotein translation factor SelB*“ (SelB) in Prokaryonten und „*SECIS-binding protein 2*“ (SBP2) in Eukaryonten. Das Selenocystein-spezifische Codon wird so von dem normalen Stopcodon *UGA* unterschieden. Die Selenocystein-tRNA-Synthase katalysiert den Einbau von *Sec* in Proteine. Nach der Inkorporation des Selenocysteins in die Polypeptidkette kann die Proteinsynthese bis zum nächsten Stop-Codon fortgesetzt werden (18) (12).

### 1.2.2. Selenoproteine

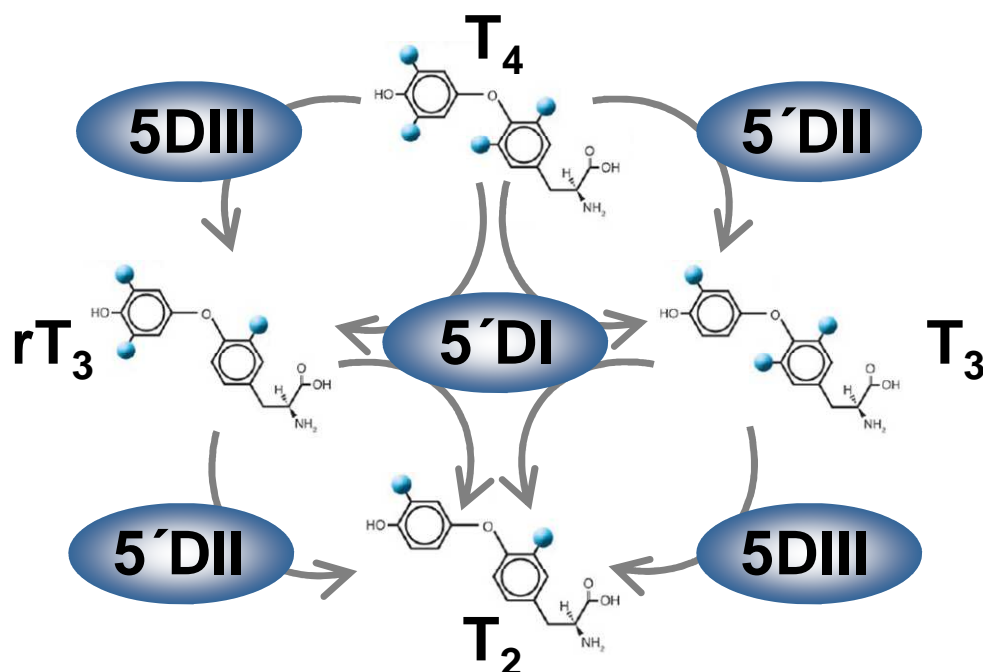
Im Menschen schützen viele dieser Selenoproteine vor oxidativem Stress und Schäden durch freie Radikale. Zu den 25 bisher bekannten humanen Selenoproteinen gehören die Glutathion-Peroxidasen (GPx1-GPx4, GPx6), die Deiodasen (TypI-TypIII), die Thioredoxin-Reduktasen

(TrxR1-TrxR3) und die Selenophosphatsynthase Typ 2 (SPS2). Des Weiteren sind die Selenoproteine H, I, K, M, N, O, P, R, S, T, V und W als solche identifiziert worden, wobei deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist (20). Selenoprotein P (SePP), das mit 10 Selenocysteinresten eines der Proteine mit dem höchsten Selengehalt ist, fungiert als Se-Transportprotein. Es hält mehr als 50 % des Plasma-Se gebunden. Aufgrund seiner TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Suszeptibilität wurde der SePP-Promoter in dieser Arbeit als Kontrolle verwendet (21) (22) (23).

### 1.2.3. Iodthyronindeiodasen

Die Isozymfamilie der Iodthyronindeiodasen besteht aus 5'-Deiodase Typ I (5'DI), 5'-Deiodase Typ II (5'DII) und 5-Deiodase Typ III (5DIII). Eine Übersicht über die Deiodasen ist in Tab. 1 wiedergegeben.

Die 5'DI ist interessanterweise sowohl zur Deiodierung am äußeren Ring als auch am inneren Ring befähigt und kann darum Schilddrüsenhormone nicht nur aktivieren, sondern auch inaktivieren. Die 5'DII indessen übt ihre Wirkung nur am äußeren Ring aus, während die 5DIII nur als Deiodase am inneren Ring fungiert (Abb. 2) (6) (7).



**Abb. 2: Aktivierung und Inaktivierung der Iodthyronine; Reaktionswege der Iodthyronindeiodasen. Pfeile stellen nur formaltheoretische Zusammenhänge dar und haben keinerlei quantitative Eigenschaft. Modifiziert nach Bianco A.C. et al. (133).**

Die 5'DI wird in peripheren Geweben hauptsächlich in Leber und Niere exprimiert. Ihr Nachweis gelang aber auch in Schilddrüse, euthyreoter Hypophyse und mononukleären Zellen. Im zentralen Nervensystem des Menschen ist die h5'DI nicht nachweisbar (24) (25).

Sehr kontrovers wird gegenwärtig die Frage diskutiert, welche Funktion die h5'DI ausübt. Bislang wurde dieses Enzym hauptsächlich für die systemische Versorgung des menschlichen Organismus mit extrathyroidal generiertem T<sub>3</sub> verantwortlich gemacht. Was jedoch die h5'DII anbelangt, so konnte zwischenzeitlich gezeigt werden, dass die h5'DII auch in der Skelettmuskulatur exprimiert wird, womit ein Organsystem in den Vordergrund getreten ist, das den Organismus ebenfalls mit peripher konvertiertem T<sub>3</sub> versorgen kann (26). Hinzu kommen aktuelle Forschungsergebnisse aus Knockout-Experimenten mit Mäusen, die die mutmaßliche Funktion der 5'DI noch stärker in Frage stellen (27) (10). Diese Ergebnisse werden im Diskussionsteil noch eingehend zu erörtern sein. Nur soviel: Der systemische 5'DI-Knockout zeigt in Mäusen erhöhte T<sub>4</sub>- und rT<sub>3</sub>-Werte, aber normale T<sub>3</sub>- und TSH-Konzentrationen, was darauf hindeutet, dass die 5'DI, zumindest in Tieren, nicht essentiell für die Aufrechterhaltung des Plasma-T<sub>3</sub>-Spiegels ist (10).

	<i>h5'DI</i>	<i>h5'DII</i>	<i>h5DIII</i>
Genlokalisierung	1p32-p33	14q24.3	14q32
Molekulargewicht	55.000	200.000	31.500
Untereinheiten	27 kDa	29 kDa	32 kDa
Reaktionskinetik	ping-pong	sequentiell	sequentiell
Substratpräferenz	rT <sub>3</sub> >>T <sub>4</sub> >T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub> >rT <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> >T <sub>4</sub>
Wirkprinzip	Reduktive Deiodierung am Phenolring und Tyrosylring der THs	Reduktive Deiodierung am Phenolring der THs	Reduktive Deiodierung am Tyrosylring der THs
Inhibitoren:			
- Propylthiouracil	++++	-/+	-
- Iopansäure	++++	++++	++++
- Iodacetat	++++	+	?
- Flavonoide	++++	+++	+
- Halog. Aromate	++++	?	?
Gewebeverteilung	Schilddrüse, Niere, Leber, Hypophyse, nicht im ZNS	ZNS, Adenohypophyse, BAT, Plazenta, Skelett-, Herzmuskulatur	ZNS, Plazenta, Haut, nahezu ubiquitär, außer Adenohypophyse
Zelluläre Lokalisation	Leber: ER Niere: basolat. Membran	Plasmamembran; ER	Microsomale Plasmamembran
Hyperthyreose	gesteigerte Aktivität	verminderte Aktivität	gesteigerte Aktivität
Hypothyreose	verminderte Aktivität	gesteigerte Aktivität	verminderte Aktivität
„Low T <sub>3</sub> Syndrome“	verminderte Aktivität	verminderte Aktivität	gesteigerte Aktivität

**Tab. 1: Übersicht der humanen Deiodaseisoenzyme. Abkürzungen: BAT, braunes Fettgewebe; ER, endoplasmatisches Retikulum; rT<sub>3</sub>, 3,3',5'-Triiod-L-Thyronin; T<sub>4</sub>, L-Thyroxin; T<sub>3</sub>, 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin; THs, Schilddrüsenhormone; ZNS, zentrales Nervensystem, modifiziert nach Köhrle J. (7).**

Die 5'DII ist vor allem in Gehirn, Hypophyse, Thyroidea, Herz, Plazenta und Skelettmuskulatur, aber auch zu einem geringeren Teil in Niere und Pankreas lokalisiert. In Tieren lässt sie sich zusätzlich im braunen Fettgewebe (BAT) nachweisen. Sie wurde bislang vor allem für die lokale und intrazelluläre Konversion von  $T_4$  zu  $T_3$  verantwortlich gemacht (6) (8) (26). Mittlerweile verdichten sich Hinweise, dass die 5'DII nicht ganz unerheblich an der systemischen Versorgung mit  $T_3$  beteiligt ist, da der 5'DII-Knockout in Mäusen zwar normale  $T_3$ -Werte, aber erhöhte TSH-Werte aufweist (28).

Die 5DIII wird hauptsächlich in Plazenta, gravidem Uterus, Gehirn, Haut sowie fetaler Leber exprimiert. Bei schwerem Krankheitsverlauf kann die 5DIII außerdem in Skelettmuskulatur und Leber nachgewiesen werden. Sie katalysiert hauptsächlich die Clearance der THs (29) (2) (30).

Damit stehen dem menschliche Körper zwei Quellen für die Versorgung mit  $T_3$  zur Verfügung: Einmal durch die  $T_3$ -Produktion in der Schilddrüse und zum anderen durch die Deiodierung von  $T_4$  in peripherem Gewebe. Welchen Beitrag die h5'DI im Einzelnen dazu leistet, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eruiert werden und bleibt deshalb der Diskussion vorbehalten.

### 1.3. Regulation der Schilddrüsenhormonwirkung

#### 1.3.1. Schilddrüsenhormonrezeptoren

Die hormonelle Wirkung des aktiven Liganden  $T_3$  wird über intrazelluläre Schilddrüsenhormonrezeptoren (TRs) vermittelt. Damit Liganden an den Rezeptor binden können, muss  $T_3$  über Moleküle aus der Klasse der „*Organic anion transporters*“ (OATP1C1, 2 und 3) oder über „*Monocarboxylate transporter 8*“ (MCT8) in die Zelle aufgenommen werden (31). Im Nukleus bindet das Hormon mit hoher Affinität an einen TR. Im allgemeinen benötigen TRs eine Ligandenbindungsstelle (LBD) für das Hormon, eine Bindungsstelle für die DNA und eine Transaktivierungsdomäne, die die Transkription des betreffenden Gens initiiert (8) (12).

TRs gehören zur c-erbA-Familie und sind die Genprodukte von Protoonkogenen, die als zelluläre Homologe („*c-oncogene*“) viraler Onkogene („*v-oncogene*“) gelten und an der Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse beteiligt sind. B. Vennstrom und R. Evans konnten nachweisen, dass TRs die zellulären Homologe des viralen Onkogens v-erbA sind (8) (32). Onkogene sind konstitutiv aktive Mutanten der Gene dieser

wachstumsregulierenden Proteine. Deshalb werden die unmutierten, natürlichen Gene jener wachstumsregulierenden Proteine Protoonkogene genannt.

TRs binden an sogenannte „*Enhancer*“, die im 5'-untranslatierten Bereich eines Gens als Bindungsstellen für Faktoren der Transkriptionsregulation fungieren, wobei die dafür spezifische DNA-Sequenz als Schilddrüsenhormon-responsives Element (TRE) bezeichnet wird. TREs liegen gewöhnlich im Promoterbereich eines Gens, der als Erkennungssequenz für RNA-Polymerasen gilt. Auf diese Weise können TRs die Transkription spezifischer Gene beeinflussen und werden deshalb auch Liganden-regulierbare Transkriptionsfaktoren genannt (33). Darüber hinaus werden TRs den nukleären Hormonrezeptoren zugeordnet, da sie eine hohe Homologie zu den Steroidhormonrezeptoren aufweisen. TRs gehören speziell der Subklasse Typ II an, weil sie auch ohne Liganden an DNA binden können und dadurch die basale Transkription mit Hilfe von Korepressoren aktiv hemmen (34) (8). Die Bindung von Ligand an Rezeptor stellt die Transformation von supprimiertem zu aktiviertem Zustand dar, indem Korepressoren gegen Koaktivatoren ausgetauscht werden. Dabei wirkt die Aktivierung von TR erst sekundär im Sinne einer Transkriptionssteigerung mit Hilfe von Koaktivatoren (Transaktivierung), denn primär hebt  $T_3$  die Suppression, die durch TR ohne Liganden und durch Korepressoren bedingt ist, auf (Derepression). Es handelt sich also hierbei um eine Liganden-unabhängige Supprimierung, gefolgt von einer Liganden-abhängigen Aktivierung (35) (7) (8).

Umgekehrt gibt es aber auch die Liganden-unabhängige Aktivierung in Verbindung mit einer Liganden-abhängigen Hemmung der Genexpression, wie das bei der Expression von TRH und TSH- $\beta$  der Fall ist (36) (37) (38). Viele Gene zeigen indessen aber lediglich eine Liganden-abhängige negative Regulation. Ein Beispiel hierfür ist die Expression der Glutathion-S-Transferase (39). Die Wirkung der Liganden-abhängigen Hemmung wird über sogenannte negative TREs (nTRE) vermittelt (40) (36) (8).

### 1.3.2. Isoformen der Schilddrüsenhormonrezeptoren

Die unterschiedlichen Formen der Schilddrüsenhormonrezeptoren  $\alpha$  and  $\beta$  (TR $\alpha$ , TR $\beta$ ) werden durch zwei verschiedene Gene codiert: TR $\alpha$  auf Chromosom 17q11.2 und TR $\beta$  auf Chromosom 3p24.3 (8). Alternative Promoterutilisation und alternatives Spleissen führen zur Transkription von vier unterschiedlichen mRNAs von jedem der beiden Loci. Daraus resultiert jeweils die Synthese von vier nukleären Rezeptoren TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 und TR $\beta$ 3 sowie den vier Isoformen TR $\alpha$ 2, TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 und TR $\Delta\beta$ 3, die partielle oder gar keine



Rezeptoreigenschaft haben und damit in Transfektionsexperimenten zum Teil inhibitorisch wirken (Abb. 3).



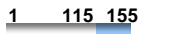
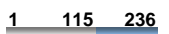





		DNA-Bindung	Ligandenbindung	Nukleäre Lokalisation	Transaktivierung
	TRα1	+	+	+	+
	TRα2	+	-	+	-
	TRΔα1	-	-	-	-
	TRΔα2	-	-	-	-
	p43	+	+	-	+
	TRβ1	+	+	+	+
	TRβ2	+	+	+	+
	TRβ3	+	+	+	+
	TRΔβ3	-	-	-	-

Abb. 3: Isoformen der Schilddrüsenhormonrezeptoren. Dunkelblau: DNA-Bindungsdomäne. Hellblau: Ungleiche Sequenzen zwischen den TRα- bzw. TRβ-Isoformen. Modifiziert nach Flamant F. et al. (34).

TRα2 kann keinen Liganden binden, während TRΔα1, TRΔα2 und TRΔβ3 weder Liganden noch DNA binden können. TRβ3 wurde zwar bisher nur für Ratten beschrieben, wird aber aufgrund homologer Genomsequenzanalysen auch für den Menschen propagiert. Das mitochondriale Protein p43, das die TH-Wirkung in Mitochondrien vermittelt, wird als weiteres zusätzliches Translationsprodukt der TRα1-mRNA erachtet (34).

TRα, speziell TRα1, ist für die postnatale Entwicklung, den basalen Metabolismus und die kardiale Funktion von enormer Wichtigkeit. TRα1 und TRα2 sind nahezu in allen Geweben nachweisbar (41) (34). TRβ vermittelt hauptsächlich die Stoffwechselregulation in der Leber, die Konzentration der Schilddrüsenhormone sowie die Entwicklung von Innenohr und Retina. TRβ1 ist beinahe ubiquitär vorhanden mit einer sehr hohen Expression in Leber, Niere und Gehirn. TRβ2 zeigt sich hauptsächlich in der Hypophyse, dem Hypothalamus und während

der Entwicklung von Innenohr und Retina. TR $\beta$ 3 konnte in Leber, Niere und Lunge nachgewiesen werden (34) (8).

### 1.3.3. Struktur der Schilddrüsenhormonrezeptoren

Die Struktur der Schilddrüsenhormonrezeptoren besteht aus einer N-terminalen A/B-Domäne, einer zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD), einer „*hinge*“-Region (Scharnier-Region) mit dem nukleären Lokalisationssignal und der C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne (LBD). Die zentrale DBD besteht aus zwei Zinkfingern, die über jeweils vier Cysteinreste ein Zinkatom komplexieren. Was TR $\alpha$  betrifft, so übt die C-terminale LBD eine Repressionsfunktion aus, indem dieser Bereich eine Bindung mit Korepressoren eingeht. Gleichwohl besitzt die LBD aber auch die sogenannte „*Activator function 2*“ (Aktivierungselement 2, AF-2), die für die Interaktion mit Koaktivatoren von Bedeutung ist und die Transkription initiiert. Bei TR $\beta$ 2 hingegen liegt die AF-2-Domäne N-terminal, während C-terminal eine zusätzliche AF-1-Domäne zu finden ist, die T<sub>3</sub>-unabhängig aktiviert werden kann (42) (8) (34) (40).

TRs können auch ohne Liganden an DNA binden, da diese im Gegensatz zu anderen intrazellulären Hormonrezeptoren nicht an cytoplasmatische Hitzeschockproteine gebunden sind (8).

### 1.3.4. Schilddrüsenhormonresponsive Elemente

TRs können als Monomere und Homodimere an TREs oder mit RXR als Heterodimere an Retinsäure-responsive Elemente (RAREs) binden. Als Konsensussequenz einer TRE-Halbseite wird ein Hexamer mit folgender Basenfolge postuliert: 5'-(G/A)GGT(C/G)A-3' (8). Es gibt jedoch zahlreiche Varianten der TREs hinsichtlich Nucleotidsequenz sowie Anzahl, Richtung und Abstand der Halbseiten. Die Halbseiten der TREs können als inverses Palindrom [ $\rightarrow\leftarrow$ ], direkte Wiederholung (DR) [ $\rightarrow\rightarrow$ ] oder everses Palindrom [ $\leftarrow\rightarrow$ ] angeordnet sein. Der optimale Abstand zwischen zwei Halbseiten ist für inverse Palindrome 0 Nukleotide, für DRs 4 Nukleotide (DR+4) und für everse Palindrome 6 Nukleotide. Diese Angaben betreffen positiv regulierte Gene (8).

Für negative TRE (nTRE) gilt, dass wohl die Sequenz des nTREs für dessen Funktion entscheidender ist als dessen Lokalisation. Es wird vermutet, dass für eine Liganden-unabhängige Aktivierung Korepressoren notwendig sind, die wiederum über Protein-Protein-Interaktion zu einer solchen Aktivierung führen (8) (40).

### 1.3.5. Koregulatoren der Schilddrüsenhormonrezeptoren

Die Wirkung von TRs wird transkriptional durch Koregulatoren beeinflusst. Die Rolle des Retinoat-X-Rezeptors (RXR) besteht darin, als Koaktivator verschiedener Hormonrezeptoren zu agieren, namentlich TR, Retinsäurerezeptor (RAR), Vitamin D-Rezeptor (VDR) und „*Peroxisome proliferator activated receptor*“ (PPAR). Als Heterodimer bindet RXR zusammen mit TR an sogenannte Retinsäure-responsive Elemente (RAREs). RXRs gehören zur Gruppe der RARs, die ihrerseits wiederum zur Großfamilie der nukleären Hormonrezeptoren gehören. Es besteht eine hohe Homologie zwischen RXR und RAR, wobei ersterer nur durch 9-cis-Retinoat und letzterer auch durch all-trans-Retinoat aktiviert werden kann (12). Zur Subfamilie der RXRs gehören die drei Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Als Konsensussequenz für eine Halbseite gilt: 5'-(G/A)GGTCA-3'.

Neben RXR stehen im Vordergrund der Transaktivierung zwei große Komplexe aus Koaktivatoren. Der eine Komplex setzt sich zusammen aus „*Vitamin D receptor interacting protein*“ und „*TR associated protein*“ (DRIP-TRAP), der mit TRs interagiert, um das RNA-Polymerase-II-Holoenzym zu stabilisieren (43). Der andere Komplex aus „*Steroid receptor coactivator 1*“ (SRC1) rekrutiert und stabilisiert Transkriptionsfaktoren und hat Histon-Acetyltransferase-(HAT)-Aktivität. Durch Acetylierung von Histonen (H3 und H4) kann kondensiertes und Transkriptions-inaktives Chromatin der Genexpression zugänglich gemacht werden (43) (44).

Gene, die TR/RXR-Heterodimere oder TR-Homodimere gebunden halten, sind ohne den entsprechenden Liganden in ihrer Expression aktiv gehemmt. Diese Hemmung wird durch die c-terminale LBD der TRs vermittelt. Dort nämlich können Korepressoren wie „*Nuclear receptor corepressor 1*“ (NCOR1) und „*Silencing mediator of RAR and TR*“ (SMRT, NCOR2) binden. Die primäre Aufgabe von NCOR1 besteht darin, homodimerisierte TRs an der Dissoziation von TREs zu hindern (45). Nebenbei bindet NCOR1 an SIN3, was die Rekrutierung von großen Multiproteinkomplexen mit Histondeacetylase-(HDAC)-Aktivität steuert. Durch Deacetylierung von Histonen und infolge der daraus resultierenden strukturellen Veränderung der Nukleosomen wird die basale Transkription gehemmt (40) (44) (36).

„*Small ubiquitous nuclear corepressor*“ (SUN-CoR) ist ebenfalls ein Korepressor und hemmt die Transkription durch Interaktion mit NCOR1 (8).

### 1.3.6. Funktion der Schilddrüsenhormonrezeptoren und Interaktion mit Koregulatoren

Die Funktion der einzelnen Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) konnte im Tiermodell durch den spezifischen TR-Knockout näher charakterisiert werden.

TR $\beta$  scheint in die T<sub>3</sub>-vermittelte Aktivierung der Genexpression involviert zu sein, da Tiere mit TR $\alpha$ -Knockout (TR $\alpha^{0/0}$ ) eine Hypersensitivität auf T<sub>3</sub>, also eine gesteigerte Expression T<sub>3</sub>-responsiver Gene, zeigen (46). Im Gegensatz dazu gilt aufgrund der im tierexperimentellen TR $\beta$ -Knockout (TR $\beta^{-/-}$ ) vorherrschenden Resistenz auf T<sub>3</sub>, dass insbesondere TR $\alpha 2$  einen dominant negativen Effekt ausübt und damit die Genexpression nach T<sub>3</sub>-Stimulation hemmt (39) (34).

Dieser dominant negative Effekt von TR $\alpha 2$  wird postuliert, da Tiere mit TR $\alpha 2$ -Knockout (TR $\alpha 2^{-/-}$ ) eine vermehrte Sensitivität auf T<sub>3</sub> zeigen und gleichzeitig in Tieren mit TR $\alpha 1$ -Knockout (TR $\alpha 1^{-/-}$ ) keine vermehrte Sensitivität auf T<sub>3</sub> zu beobachten ist. TR $\alpha 2$  kann bekanntermaßen nur DNA, aber keinen Liganden binden, weswegen eine Transaktivierung durch TR $\alpha 2$  nicht möglich ist (39) (34) (40).

Was TR $\alpha 1$  anbelangt, so beruht die Funktion dieses Rezeptors nach Stimulation mit T<sub>3</sub> nicht auf einer alleinigen Aktivierung stummer Zielgene, sondern darauf, dass T<sub>3</sub> die Suppression, die durch TR $\alpha 1$  ausgeübt wird, aufhebt und damit eine basale Transkription ermöglicht (47) (46).

In der Leber haben TR $\alpha 1$  und TR $\beta 1$  ihr eigenes Repertoire an Zielgenen, wobei TR $\beta 1$  die prädominant exprimierte Isoform zu sein scheint. TR $\alpha 2$  kann ubiquitär und vermehrt in Gewebe nachgewiesen werden, in dem T<sub>3</sub> über TR $\beta$  wirkt. Die 5'DI scheint primär unter dem Einfluss von TR $\beta 1$  und folglich auch unter dem von TR $\alpha 2$  zu stehen (39) (46) (48).

Die spezifische Interaktion der TR-Isoformen mit dem Koaktivator SRC1 bezüglich der 5'DI konnte ebenfalls in transgenen Mäusen näher untersucht werden. So ist die T<sub>3</sub>-abhängige Hypersensitivität, die aus dem TR $\alpha$ -Knockout (TR $\alpha^{0/0}$ ) resultiert, SRC1 vermittelt. Der kombinierte TR $\alpha$ - und SRC1-Knockout (TR $\alpha^{0/0}$ /SRC1 $^{-/-}$ ) zeigt nämlich keine solche Hypersensitivität. Als potentielle Ursache der T<sub>3</sub>-abhängigen Hypersensitivität gilt, mehr noch als das Fehlen des Inhibitors TR $\alpha 2$ , die vermehrte Verfügbarkeit von SRC1, da TR $\alpha 2$  nicht mehr um SRC1 konkurrieren kann. Der SRC1-Knockout (SRC1 $^{-/-}$ ) zeigte keine veränderte T<sub>3</sub>-Responsivität der 5'DI. SRC1 scheint somit im TR-kompetenten Modell mehr fakultativ als obligat zu wirken, wobei mit kompensatorischen Effekten von TIF2 und SRC3 argumentiert wird (Abb. 4) (39).

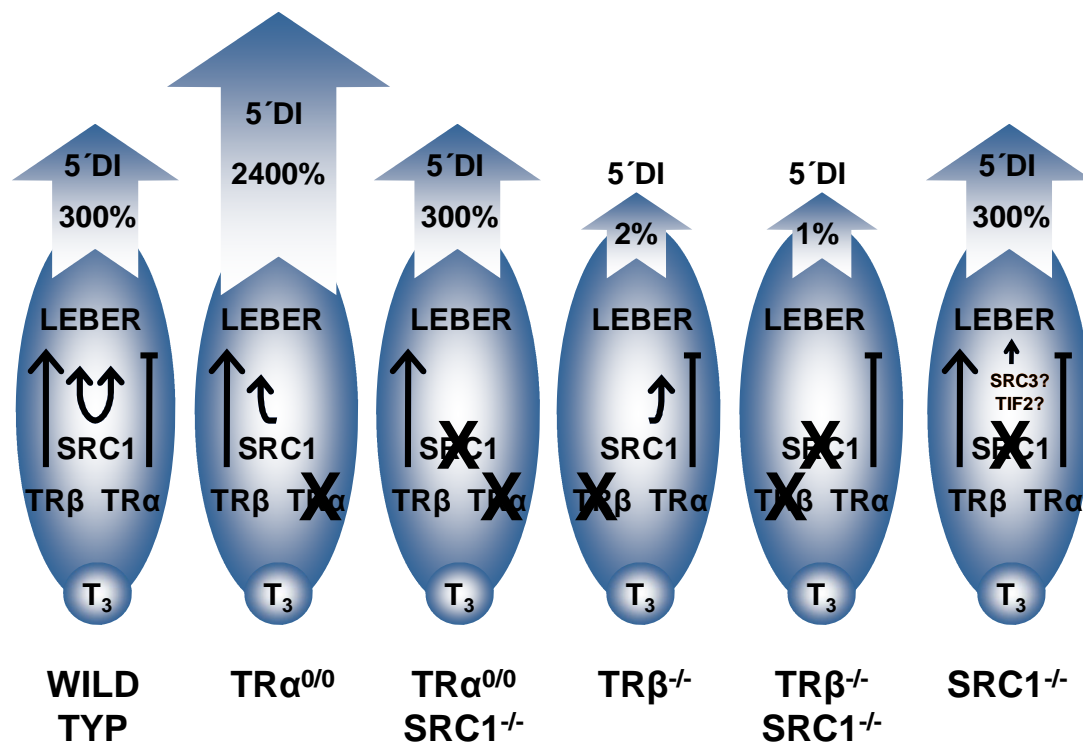


Abb. 4: Funktion der Schilddrüsenhormonrezeptoren im Knockout-Modell und Interaktion mit dem Koaktivator SRC1.

Modifiziert nach Sadow P.M. et al. (39).

Generell muss berücksichtigt werden, dass Gen-spezifische Unterschiede in der Regulation T<sub>3</sub>-responsiver Gene gezeigt werden konnten, die wohl auf einer Promoter-spezifischen Gruppierung von Koaktivatoren und Korepressoren beruhen (49) (50).

### 1.3.7. Funktion der Schilddrüsenhormone

Da sich Betrachtungen zur Wirkung von T<sub>3</sub> auf Wachstum, Differenzierung und Metabolismus seit Einführung der DNA-Mikroarray-Technik in unzähligen Details erschöpfen würden und für diese Arbeit nicht relevant sind, kann hier nur auf weiterführende Literatur und aktuelle Forschungsergebnisse verwiesen werden (8) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57).

## 1.4. Humane 5'-Deiodase Typ I

### 1.4.1. Genlokalisierung und Genstruktur

Das Gen der humanen 5'-Deiodase Typ I (h5'DI, Gensymbol: *Dio1*) ist auf Chromosom 1p32-p33 lokalisiert, besteht aus fast annähernd 17,5 kb und setzt sich aus vier Exons

zusammen (58). Die Transkriptionsstartstelle liegt 23 Nukleotide (Nt) über der Translationsstartstelle am *ATG* Codon. Eine alternative Startstelle befindet sich zumindest in HepG2-Zellen zusätzlich bei Nt -24. Der essentielle Proteinbestandteil Selenocystein wird durch ein *UGA*-Codon in Exon 2 codiert, während die Sequenz für das SECIS-Element in Exon 4 liegt (58) (59). Genetische Defekte der h5'DI sind nicht bekannt. Im 3'-untranslatierten Bereich konnte ein „*Single nucleotide polymorphism*“ (SNP) nachgewiesen werden (60).

### 1.4.2. Promoterstruktur

Der 5'-untranslatierte Bereich des Gens der h5'DI weist keine putative TATA- oder CCAAT-Box auf (7) (59). Jedoch konnten zwei Hormon-responsive Elemente identifiziert werden, die auf transkriptionaler Ebene die Stimulation durch T<sub>3</sub> und Retinoat (RA) vermitteln.

DR4+2 ist ein TRE/RARE an Position -696 bis -673 und besteht aus drei direkt wiederholten Halbelementen mit Abständen von 4 und 2 Basenpaaren. T. Jakobs konnte folgende Basenpaarfolge des DR4+2 bestimmen: 5'-AGGTCAtctgAGGTCAGgAGTTCA-3' (59). Die in dieser Arbeit verwendeten 5'DI-Promoterkonstrukte tragen DR4+2 an Position -699 bis -676. DR12 ist ein TRE/RARE an Position -129 bis -106 und setzt sich zusammen aus der direkten Wiederholung zweier Halbelemente mit einem Abstand von 12 Nt. Es konnte folgende Sequenz ermittelt werden: 5'-TGACCTgactccttccccTGACCC-3' (7) (61) (62).

Aufgrund dieser regulatorischen Elemente korreliert die Expressionsrate der h5'DI mit dem Schilddrüsenhormonstatus, weswegen die Expression der h5'DI bei Hyperthyreose aktiviert und bei Hypothyreose inhibiert ist. DR12 und DR4+2 tragen gleichermaßen zur Enzyminduktion unter T<sub>3</sub>-Stimulation bei (61). Retinoat wirkt über diese Elemente ebenfalls stimulierend auf die h5'DI (63) (64).

### 1.4.3. Proteincharakterisierung

Die h5'DI ist wahrscheinlich ein homodimeres integrales Membranprotein mit einer molekularen Masse von 50-60 kDa. Das Monomer der h5'DI hat eine transmembrane Domäne, die in der Proteinsequenz ungefähr zwischen AS 12 und 36 liegt. Die AS Selenocystein findet sich in Position 126. In der Leber ist die h5'DI hauptsächlich auf der cytosolischen Seite des rauhen und glatten ER lokalisiert (6) (7) (65) (66). In der Niere wurde die Lokalisation der h5'DI auf der inneren Seite der basolateralen Membran der Nierenepithelzellen beschrieben (6) (67). Die h5'DI katalysiert die Deiodierung von THs durch einen Ping-Pong Reaktionsmechanismus (68) (69). Während des Reaktionszyklus wird eine Enzym-Selenenyl-Iodid-(E-Se-I)-Intermediat gebildet, was zu einer Oxidation des

betreffenden Selens führt. *In vitro* kann dieses Intermediat durch Dithiole, wie Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythritol (DTE), wieder reduziert werden. Die physiologischen Kofaktoren sind bislang nicht identifiziert worden, wobei generell vermutet wird, dass *in vivo* die Reduktion des Enzyms weniger wichtig ist als dessen Neusynthese. Das E-Se-I Intermediat kann mit 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) zu einem stabilen Selenenyl-Sulfid-Komplex (E-Se-S-PTU) reagieren, was die h5'DI irreversibel inaktiviert. Die 5'DII bildet kein solches E-Se-I-Intermediat, weshalb diese auch nicht durch PTU gehemmt werden kann. Diese Eigenschaft macht *in vitro* somit eine Unterscheidbarkeit der 5'DI von der 5'DII möglich (7).

#### 1.4.4. Steroidregulation der 5'DI in Tieren

In Tierexperimenten mit sich entwickelnden Wistar-Ratten konnten Y. Ogawa und dessen Mitarbeiter eine alters- und geschlechtsabhängige Regulation der 5'DI sowohl auf Enzymaktivitäts- als auch auf mRNA-Ebene messen (70). Dabei zeigte sich nach Geburt in der Leber eine spontane Zunahme der mRNA-Konzentration und der Enzymaktivität bis zum 20. Tag, die geschlechtsunabhängig war. Bis zum Alter von 7 Wochen fielen die Werte der weiblichen Ratten dann aber auf die Hälfte derer von männlichen Tieren. Nach Orchiektomie im Alter von ca. 27 d wurden in den Lebern adulter männlicher Ratten ähnliche Werte gefunden wie bei weiblichen Tieren. In der Niere hingegen ließ sich aus mRNA und Enzymaktivität keine geschlechtsspezifische Regulation der 5'DI schlussfolgern.

K. Miyashita und dessen Kollegen hatten vorher bereits den Einfluss von Steroiden auf die 5'DI-mRNA in der Leber von Wistar-Ratten untersucht (71). So zeigte sich auch hier ein direkter Zusammenhang zwischen mRNA-Level und Enzymaktivität. Zwei Monate alte männliche und weibliche Ratten wurden thyroidektomiert. Nach zwei Wochen waren signifikant niedrigere Werte sowohl in weiblichen als auch männlichen Ratten gegenüber nicht thyroidektomierten Tieren nachweisbar. Der geschlechtsspezifischen Unterschied von ca. 50 % hatte jedoch weiterhin Bestand. Eine Orchiektomie mit gleichzeitiger Gabe von Testosteron (1 mg/d, s.c.) ergab einen Anstieg von mRNA-Konzentration und Enzymaktivität der 5'DI auf Kontrollwerte, während die Orchiektomie alleine zu dem bereits beschriebenen Abfall der Werte führte. Dass weder die Ovariectomie noch die zusätzliche Gabe von Östradiol (1 mg/d, s.c.) einen Effekt hatte, wurde bereits im Vorfeld gemutmaßt und konnte dadurch bestätigt werden.

Auch in Mäusen zeigt die Expression anderer Selenoproteine wie GPx und TRxR einen signifikanten, geschlechtsspezifischen Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren. Die 5'DI wies in diesen Untersuchungen ebenfalls eine um den Faktor 2 höhere Expression in männlichen Kreaturen auf. Außerdem konnte im Hypophysenvorderlappen von

weiblichen Ratten im Vergleich zu männlichen Tieren eine höhere 5'DI-mRNA-Konzentration und 5'DI-Aktivität beobachtet werden (142). Darüber hinaus sind selenabhängige prä- und posttranskriptionale Regulationsmechanismen für das geschlechtsabhängige Expressionsmuster der 5'DI in Mäusen verantwortlich, die in Kapitel 5.2.1. eingehender diskutiert werden (72).

## 1.5. Steroidhormonstoffwechsel

### 1.5.1. Steroide

Die Gruppe der Steroidhormone besteht aus Glukokortikoiden, Mineralokortikoiden, Sexualhormonen und dem Häutungshormon Ecdyson. Chemisch betrachtet sind Steroide eine Gruppe von Verbindungen, die als Grundgerüst das Cyclopentanoperhydrophenanthren (Gonan, früher Steran) tragen. Dieses Grundgerüst besteht aus drei Sechsringen und einem Fünfring mit insgesamt 18 bis 30 C-Atomen. Das 21 C-Atome zählende Derivat heißt Pregnan, zu dem die Glukokortikoide, die Mineralokortikoide und das Progesteron gehören. Das aus 19 C-Atomen bestehende Molekül lautet Androstan, von dem sich die Androgene ableiten. Die Grundstruktur aus 18 C-Atomen wird Östran genannt und bildet die natürlichen Östrogene.

Cytochrom P<sub>450</sub> bildet das katalytische Zentrum der Monooxygenasen. Durch Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenasen (CYP) werden Squalene unter Verbrauch von NADPH und O<sub>2</sub> hydroxyliert, was primär zur Bildung von Cholesterin und in weiterer Folge zu den Steroidhormonen und Gallensalzen führt (12).

In der Nebennierenrinde wird die Biosynthese und Abgabe von Cortisol unter dem Einfluss von ACTH gesteuert. Durch oxidative Kettenverkürzung entsteht aus Cholesterin über Pregnenolon schließlich Progesteron. Nach dreifacher Hydroxylierung entsteht Cortisol (Hydrocortison). Cortison entsteht durch Oxidation der OH-Gruppe in Position 11. Dexamethason (9-Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon) ist ein halogeniertes Glukokortikoid ohne relevante mineralokortikoide Wirkung, aber mit langer Halbwertszeit.

Androgene werden hauptsächlich unter der Kontrolle von LH in den Leydig-Zellen des Hodens und der Nebennierenrinde gebildet. Ebenfalls aus Pregnenolon und Progesteron entstehen durch Abspaltung der Seitenketten Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Testosteron. In Prostata, Samenbläschen, Talgdrüsen, Nieren, Hoden und Gehirn kann Testosteron durch die 5 $\alpha$ -Reduktase zu Dihydrotestosteron umgewandelt werden, das die zweieinhalbfache biologische Aktivität besitzt. Methyltrienolon (R1881) ist ein synthetisches



Androgen mit langer Halbwertszeit, das äquivalente Eigenschaft zu Testosteronpropionat aufweist und eine Molekularmasse von 284,4 hat.

Androgene sind Prohormone der Östrogene. Der Reaktionsschritt zur Bildung von Östrogenen wird durch den Cytochrom-P<sub>450</sub>-Aromatase-Komplex (Cyp 19) katalysiert. Dabei wird Androstendion in Estron (E<sub>1</sub>) und Testosteron in Estradiol (E<sub>2</sub>; di-ol, zwei Hydroxylgruppen) umgewandelt. Hauptsyntheseort sind die Zellen des Ovars. Der Aromatase-Komplex ist darüber hinaus aber auch in Fettgewebe, Plazenta, Leydig- und Sertolizellen sowie während der Embryogenese im Gehirn nachweisbar (12).

### **1.5.2. Primär- und Sekundärantwort nach Aktivierung nukleärer Rezeptoren**

Die Stimulation intrazellulärer Rezeptoren durch Steroide, Schilddrüsenhormone, Vitamin D und Retinoide wird in der Regel in zwei Stufen beantwortet. Initial wird eine sogenannte frühe Primärantwort ausgelöst, die durch direkte Signaltransduktion die Expression einiger weniger, spezifischer Gene in nicht einmal 30 Minuten induziert. Die Genprodukte aus dieser ersten Reaktion wiederum leiten eine verzögerte Sekundärantwort ein, indem sie weitere regulatorische Gene aktivieren. Ein einfacher hormoneller Auslöser zieht somit weitreichende Veränderungen des Genexpressionsmusters einer Zelle nach sich (33). So zeigt z. B. das Malatenzym ein biphasisches Antwortverhalten auf T<sub>3</sub>-Stimulation. Die Primärantwort tritt nach 4 h ein und die Sekundärantwort durch die Aktivierung anderer Gene erst nach 24 h (8).

### **1.5.3. Estrogen- und Androgenrezeptor**

Estrogenrezeptoren und Androgenrezeptoren sind ebenfalls intrazelluläre Hormonrezeptoren, die der Großfamilie der nukleären Hormonrezeptoren angehören. Bislang konnten zwei Isoformen des Estrogenrezeptors im Menschen nachgewiesen werden. Der Genlocus des humanen Estrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) liegt auf Chromosom 6q25.1. Das Gen des humanen Estrogenrezeptors  $\beta$  (ER $\beta$ ) konnte auf Chromosom 14q lokalisiert werden (73). ERs binden an die Konsensussequenz: 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3'. Für den Androgenrezeptor (AR) gilt hingegen folgende Sequenz: 5'-AGAACAAnnnTGTTCT-3' (74). Das Gen von AR wird durch das Chromosom Xq11-q12 kodiert.

Die Konzeption dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob der im Tiermodell beobachtete Effekt einer Steroid-bedingten Primärantwort der 5'DI auf den Menschen übertragbar ist. Im weitesten Sinne war das Ziel, Indizien zu finden, die gegebenenfalls einen Zusammenhang zwischen einer geschlechtsspezifischen Expression der h5'DI und der

geschlechtsakzentuierten Verteilung endokrinologischer Erkrankungen belegen. Denn, wie bereits erwähnt, weist die Inzidenz der sporadischen Struma ein Verhältnis von 7:1 bis 9:1 zwischen weiblichen und männlichen Individuen auf (1). Ähnlich präsentiert sich die subklinische Hypothyreose, die bei nur 2,8 % der Männer, aber immerhin 7,5 % der Frauen nachweisbar ist (75).

## 1.6. „Low $T_3$ Syndrome“ und Aktivität der Deiodasen

### 1.6.1. „Low $T_3$ Syndrome“

Bei fast allen akuten und chronischen Krankheiten ist eine Veränderung des Schilddrüsenhormonstoffwechsels zu beobachten. Bei leichter bis moderater Krankheit ist  $T_3$  im Serum um 50-90 % reduziert und  $rT_3$  zwei- bis mehrfach erhöht, während bei schweren Krankheitsverläufen  $T_3$  nahezu undetektierbar und  $rT_3$  variabel ist. Nur bei schwer kranken Patienten ist TSH reduziert, sonst sind trotz des erniedrigten  $T_3$ -Wertes normale TSH-Konzentrationen zu beobachten. Im Mittelpunkt dieses Syndroms stehen somit ein erniedrigter  $T_3$ -Spiegel und eine erhöhte  $rT_3$ -Konzentration zusammen mit einem inadäquaten TSH-Wert. Diese Veränderungen werden unter den Begriffen „Low  $T_3$  Syndrome“, „Nonthyroid illness“ oder auch „Sick euthyroid Syndrome“ zusammengefasst (6).

Lange wurde die  $h5'DI$  als alleiniger Verursacher dieses Krankheitsbilds favorisiert, da dieses Enzym sowohl am äußeren als auch am inneren Ring deiodieren kann. Mittlerweile konnten R.B. Peeters und dessen Kollegen in Untersuchungen an schwerkranken Patienten zeigen, dass die Aktivität der  $h5'DI$  in der Leber vermindert, während die der  $h5DIII$  in Leber und Skelettmuskulatur erhöht ist. Normalerweise ist die  $h5DIII$  in Leber und Skelettmuskulatur von gesunden erwachsenen Individuen nicht nachweisbar. Im Einzelnen reduziert die niedrige  $h5'DI$ -Aktivität womöglich die  $T_3$ -Produktion und den  $rT_3$ -Abbau. Umgekehrt steigert die hohe  $h5DIII$ -Aktivität sowohl den  $T_3$ -Abbau als auch die  $rT_3$ -Produktion. Ein Surrogatmarker, der diese Veränderungen am besten abbildet, ist der  $T_3/rT_3$ -Quotient. In Beziehung dazu weist der  $T_3/rT_3$ -Quotient in diesen Patienten eine positive Korrelation mit der  $h5'DI$ -Aktivität ( $p < 0,001$ ) und eine negative Korrelation mit der  $h5DIII$ -Aktivität auf. Die Aktivität der Deiodaseenzyme wiederum verhält sich direkt proportional mit den entsprechenden mRNA-Konzentrationen, weshalb eine Regulation auf Transkriptionsebene wahrscheinlich ist (2).

### 1.6.2. TGF $\beta_1$ -Wirkung auf die h5DIII

S.A. Huang und dessen Mitarbeiter haben demonstriert, dass TGF $\beta_1$  die Transkription der h5DIII über eine Smad- und MAPK-abhängige Signalkaskade in humanen Fibroblasten steigert. Speziell die Kombination von Smad4 mit Smad2 oder Smad3 führte zu einer Transkriptionssteigerung der h5DIII, allerdings nur in Zellen, die ohnehin eine endogene Expression der h5DIII aufwiesen. So konnte in humanen plazentaren Fibroblasten durch 5 ng/ml TGF $\beta_1$  eine Zunahme der h5DIII-Aktivität nach 48 h Stimulationsdauer gemessen werden. Fibroblasten aus der fetalen Lunge zeigten die höchste endogene h5DIII-Aktivität. Die Stimulation dieser Zellen mit 5 ng/ml TGF $\beta_1$  führte zu einer Zunahme der h5DIII-Aktivität von (6,4 +/- 0,4 %) auf (71,7 +/- 0,1 %) über 24 h. In ähnlicher Weise stieg die Promoteraktivität des h5DIII-Promoter-Reportergenkonstrukts nach Kotransfektion von Smad in diesen Zellen an. Ein „*Smad binding element*“ (SBE), 5'-CAGAC-3', konnte im h5DIII-Promoter nicht nachgewiesen werden (3).

### 1.6.3. Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die h5'DI

Im Rahmen des „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ wurde von T. Jakobs *et al.* bereits der Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression und Aktivität der h5'DI untersucht. Im Mittelpunkt der Analysen standen Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 (IL-1) sowie Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ergebnis ihrer Untersuchungen war, dass einzig das Zytokin IL-1 $\beta$  sowohl die Promoteraktivität als auch die Enzymaktivität der h5'DI in HepG2-Zellen hemmt (76). Bislang liegen keine Arbeiten vor, die sich mit der Wirkung von TGF $\beta_1$  auf die humane 5'DI beschäftigen. Im Tiermodell hingegen konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta_1$  in FRTL5-Ratten-Thyreozyten keinen negativen Effekt auf die 5'DI hat (77).

### 1.6.4. TGF $\beta_1$

Der tumortransformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) gehört als Signalpeptid zu den Zytokinen und trägt seinen Namen aufgrund der Eigenschaft, von Tumorzellen sezerniert zu werden und so die Proliferation normaler Zellen zu aktivieren. Darüber hinaus zeigt er immunsuppressive Wirkung durch Inhibition der T-Zellproliferation und Hemmung der Makrophagenaktivierung. T-Lymphozyten, mononukleäre Phagozyten und auch andere Zellen sezernieren TGF $\beta$  (78).

TGF $\beta$  ist ein Peptidhormon, das über eine Disulfidbindung ein homodimeres Protein bildet. Der Faktor liegt in drei nahezu homologen Isoformen vor: TGF $\beta_1$ , - $\beta_2$  und - $\beta_3$ . Die Wirkung der verschiedenen Isoformen wird über einen gemeinsamen Rezeptor vermittelt. Die

Isoformen zeigen unterschiedliche Fähigkeiten das Wachstum sowohl epithelialer und endothelialer als auch hämatopoetischer Zellen zu beeinflussen. Zudem regulieren sie auch die Produktion extrazellulärer Matrix durch mesenchymale Zellen.

Das Gen für TGF $\beta_1$  liegt auf Chromosom 19q13. Die Signalkaskade der TGF $\beta$ -Wirkung wird von sogenannten Smads geleitet, die mit Transkriptionsfaktoren assoziieren und deren Komplexe aktivieren. Nach Bindung von TGF $\beta_1$  an den Rezeptor phosphoryliert der aktivierte Rezeptor die Proteine Smad2 und Smad3. Nach Dimerisierung mit Smad4 wird das jeweilige Heterodimer in den Kern transloziert, wo es die Regulation spezifischer Gene übernimmt. Vermittelt wird die Wirkung über eine sogenannte CAGA-Box, die einem „*Smad binding element*“ (SBE) entspricht. Die Konsensussequenz lautet: 5'-CAGACA-3'.

Normalerweise wird die Genexpression über SBEs gesteigert. Es kann jedoch auch, wie für SePP beschrieben, eine Hemmung auftreten. Die ungefähre Plasmakonzentration von TGF $\beta_1$  liegt bei 5 ng/ml in gesunden Individuen (23) (79) (80).

#### 1.6.5. TGF $\beta_1$ -Wirkung auf Selenoprotein P

Da bei schweren Erkrankungen auch eine Reduktion der Plasma-Se-Konzentration zu messen ist und SePP das Haupttransportprotein dieses Spurenelements ist, hat man untersucht, welchen Einfluss Zytokine auf die Expression von SePP haben.

Der Promoter des humanen SePP Gens enthält ein Interferon- $\gamma$ -(IFN- $\gamma$ )-responsives Element (GAS). Ferner konnte eine Hemmung der Promoteraktivität durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  beobachtet werden (81). Zusätzlich wurde in diesem Promoter an Position -1797 bp ein SBE nachgewiesen. V. Mostert und Mitarbeiter unseres Labors konnten in Transfektionsexperimenten mit HepG2 einen halbmaximalen inhibitorischen Effekt mit 30 pM TGF $\beta_1$  auf die Promoteraktivität des SePP-Luciferase-Konstrukts zeigen. Die gleiche Hemmung der SePP-Promoteraktivität konnte bei Kotransfektion von Smad3 und/oder Smad4 beobachtet werden (23) (22). Wie bereits erwähnt, wurde ein Promoter-Reportergenkonstrukt aus SePP-Promoter und Luciferase, das der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand, genutzt, um sowohl die Responsivität der HepG2-Zellen als auch die biologische Aktivität des eingesetzten TGF $\beta_1$  zu überprüfen.

Aus den Beobachtungen zur Wirkung von TGF $\beta_1$  auf h5DIII leitet sich die Frage ab, welchen Einfluss TGF $\beta_1$  auf die h5'DI ausübt und ob diese Auswirkungen die Veränderungen des Schilddrüsenhormonstoffwechsels im „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ erklären können.

## 1.7. Growth Hormone und Schilddrüsenhormonstoffwechsel

### 1.7.1. GH in „Critical Illness“

Neben den eben beschriebenen Veränderungen im Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel ist die GH-IGF-IGFBP-Achse in Patienten, die aufgrund schwerer Erkrankung intensivmedizinische Behandlung benötigen, ebenso von pathophysiologischen Veränderungen betroffen.

G. Van den Berghe hat näher charakterisiert, in welchem Maß die somatotrope Hormonachse unter intensivmedizinischer Behandlung kompromittiert ist. In der initialen Akute-Phase-Reaktion (h bis d) ist sowohl die pulsatile Freisetzung von GH als auch die interpulsatile GH-Konzentration gesteigert. Zusätzlich ist die GH-Pulsfrequenz erhöht. Diese Veränderungen werden als erworbene periphere GH-Resistenz gedeutet. Hingegen wird in der chronischen Phase schwerer Krankheit (nach 7-10 d) die pulsatile Freisetzung von GH unter intensivmedizinischer Behandlung zunehmend unkoordinierter. Die GH-Konzentration der pulsatilen Freisetzung ist niedriger als in der Akute-Phase-Reaktion, aber höher als unter physiologischen Bedingungen. Die Pulsfrequenz bleibt ebenso erhöht (82).

### 1.7.2. GH-Substitutionstherapie und Schilddrüsenhormone

Die Veränderungen der somatotropen Hormonachse bei schwerer Krankheit könnten für die thyreotrope Hormonachse deshalb von Bedeutung sein, da Studien zur Substitution von GH gezeigt haben, dass dieses Hormon einen Einfluss auf den Metabolismus der Schilddrüsenhormone ausübt.

J. Jørgensen konnte in GH-defizienten adulten Probanden mit zum Teil T<sub>4</sub>-substituierter zentraler Hypothyreose zeigen, dass sich als Folge der Substitution von rekombinantem humanem GH (rhGH) eine Abnahme von T<sub>4</sub> auf zu niedrige und eine Zunahme von T<sub>3</sub> auf normale Werte einstellt. Dieses Verhältnis betrifft die totale genauso wie die freie Hormonkonzentration. Da aufgrund der teilweisen Hypophyseninsuffizienz die TH-Sekretion unverändert blieb, wurde aus diesen Ergebnissen eine vermehrte periphere Konversion von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub> abgeleitet (83).

C. Straßburger untersuchte in einer anderen Studie ebenfalls die Auswirkungen einer Substitution von rhGH auf Erwachsene. Dabei fiel eine Abnahme von fT<sub>4</sub> und fT<sub>3</sub> auf. Da in anderen Untersuchungen im Rahmen der rhGH-Substitution eine Erhöhung von fT<sub>3</sub> gemessen werden konnte, wird vermutet, dass die gleichzeitig gemessene Zunahme der Muskelmasse verantwortlich ist für einen höheren Bedarf an Schilddrüsenhormonen, der jedoch aufgrund des einzuhaltenden Studienprotokolls nicht angepasst werden konnte (84).

Da die Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen gut zu einer vermehrten peripheren Konversion von  $T_4$  zu  $T_3$  passen, wird primär an eine Beteiligung der  $h5'DI$  gedacht. Aufgrund der Veränderungen im Sekretionsmuster von GH war es von Interesse zu klären, ob GH überhaupt einen Einfluss auf die  $h5'DI$  ausübt, und wenn ja, ob dieser stimulatorischer oder inhibitorischer Natur ist.

### 1.7.3. Growth Hormone

„*Growth Hormone*“ (GH), auch als Somatotropin bekannt, gehört als Peptidhormon ebenfalls zu den Zytokinen. Die Sekretion von GH aus den somatotropen Zellen der Hypophyse wird beeinflusst durch „*Growth hormone releasing hormone*“ (GHRH), „*Growth hormone release inhibiting hormone*“ (GHRH, Somatostatin), IGF-I, freie Fettsäuren und Ghrelin. Der Genlocus befindet sich auf Chromosom 17q22-q24. In der Hypophyse wird nur das hGH-Gen1 (17q23.1) exprimiert, während die in 3'-Richtung liegende Genvariante hGH-Gen2 in der Plazenta exprimiert wird. Die Aminosäuresequenz von hGH besteht aus 191 AS, ist etwa 22 kDa groß und wird durch 2 Disulfidbrückenbindungen stabilisiert. Die Signaltransduktion wird initiiert durch Bindung von GH an zwei Rezeptoren (GHR) und nach deren Dimerisierung über die sogenannten Januskinasen (JAK) weitergeleitet. GH wirkt speziell durch JAK2, wodurch wiederum STAT1 und STAT5b („*Signal transducer and activator of transcription*“) aktiviert werden. Nach Homo- oder Heterodimerisierung dieser STATs werden jene in den Kern transloziert, wo sie die Gentranskription initiieren (85) (33). Neben der JAK/STAT-Signalkaskade kann GH auch MAPK, Phosphatidylinositol-3-Kinase und Protein-Kinase-C aktivieren (134).

Die Wirkung von GH beeinflusst zumindest in Kindheit und Pubertät das longitudinale Knochenwachstum. Ungeachtet dessen persistiert die Sekretion von GH auch im Erwachsenenalter, wobei dann die Leber im Mittelpunkt der Hormonwirkung zu stehen scheint. Dort wird der Wachstumsfaktor 1 (IGF-I) induziert, der die Produktion und Sekretion von GH im Hypophysenvorderlappen hemmt (84). GH gilt als Insulinantagonist, da es postprandial nach Glukoseaufnahme zu einer vermehrten Sekretion von GH kommt (85) (1).

### 1.7.4. Insulin-like growth factors

IGF-I (Somatomedin C) und IGF-II (Somatomedin A) gehören zu den Wachstumsfaktoren. Der Genlocus für IGF-I ist 12q22-q24.1, der für IGF-II ist 11p15.5. Sie kontrollieren ebenfalls Wachstum und Metabolismus. IGFs werden in den meisten, wenn auch nicht in allen Geweben, exprimiert und regulieren das Wachstum durch parakrine oder autokrine Signalübermittlung. Die Wirkung von GH wird durch zirkulierendes und lokal produziertes

IGF vermittelt. Der Großteil des zirkulierenden IGF-I ist hepatischen Ursprungs. Die Synthese dort wird durch GH, Insulin und Nährstoffaufnahme reguliert. „Insulinähnlich“ sind diese Faktoren deshalb, weil sie zum einen die Fähigkeit besitzen die Glucoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen zu stimulieren und zum anderen, weil die Proteinstruktur der IGFs große Homologien zu Proinsulin aufweist. Der Unterschied zwischen IGF und Insulin ist die verbleibende C-Kette und eine D-Kettenerweiterung der A-Kette in der Proteinstruktur des IGFs. IGF-I bildet zusammen mit „*IGF-binding-protein 3*“ (IGBP-3) und „*Acid-labile subunit*“ (ALS) einen Komplex, der die biologische Halbwertszeit dieser Proteine wesentlich verlängert. Die Dissoziation von ALS aber macht die Diffusion von IGF-I durch das Endothel von Kapillaren überhaupt erst möglich (85) (86) (5).

### 1.7.5. Wirkung von GH und IGF-I

Patienten mit vollständiger Insuffizienz des Hypophysenvorderlappens zeigen sich trotz adäquater Substitution mit Kortikosteroiden, gonadalen Steroiden und Thyroxin meist adynam und vermindert leistungsfähig. In einem hypophysektomierten Patientenkollektiv konnte gegenüber einem vergleichbaren Kollektiv sogar eine zweifach höhere Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen belegt werden (84) (1).

Obgleich die akute Applikation von GH einen temporären Insulin-ähnlichen Effekt erzielt, führt die langfristige Substitution von GH zu einer Insulinresistenz verbunden mit Hyperinsulinämie. GH steigert die Gluconeogenese und Glykogenolyse und führt so zu einer vermehrten Abgabe von Glucose aus der Leber. In der Peripherie ist die Glucoseutilisation durch Inhibition der Glykogensynthese und der Glucoseoxidation vermindert (87).

Bei Diabetes mellitus sind die GH-Spiegel aufgrund einer vermehrten hypophysären Sekretion zwei- bis dreifach erhöht. So scheint in der Hypophyse die Hemmung der GH-Sekretion durch IGF-I wegzufallen, da die verminderte Insulinkonzentration in der Pfortader die hepatische Bildung von IGF-I beeinträchtigt. Normalerweise kontrolliert IGF-I die GH-IGF-IGBP-Achse durch Hemmung der GH-Sekretion. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von IGF-I bei Diabetes mellitus zu einer verbesserten hepatischen Insulinsensitivität, einem Abfall der Glucoseproduktion in der Leber und einer vermehrten Glucoseaufnahme in der Peripherie führt. Auch in Tieren verursacht die IGF-I-Gabe Hypoglykämie durch vermehrte periphere Glucoseaufnahme, Glykolyse und Glykogensynthese (87).

In transgenen Tieren, die GH überexprimieren, wurde die Entwicklung einer Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und Hypertriglyceridämie beobachtet. Die Zahl der hepatischen Insulinrezeptoren ist auf 50 % reduziert, wobei die verbleibenden Rezeptoren vermehrt phosphoryliert sind. Dies führt bereits im Nüchternzustand zur maximalen

---

Aktivierung der Rezeptoren. Das humane Modell einer vermehrten GH-Sekretion ist die Akromegalie. Menschen mit dieser Krankheit entwickeln ebenfalls eine Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie und ausgeprägter Glucoseintoleranz (88).

Auf der anderen Seite nimmt mit zunehmendem Alter die Sekretionsrate von GH und IGF-1 progredient ab und es kommt zur Reduktion von Proteinsynthese, Knochenmasse sowie fettfreier Körpermasse. Der Anteil des Körperfetts hingegen nimmt stetig zu, was zu zentraler Adipositas führt und als Ätiologie der entstehenden Insulinresistenz erachtet wird, wobei eine zusätzliche altersabhängige Abnahme der Schilddrüsenfunktion, wie in Kapitel 1.1.2. beschrieben, zu berücksichtigen ist (85) (1). Eine GH-Substitution bei adulter GH-Defizienz (GHDA) führt zur Verbesserung der Insulinsensitivität, verbunden mit einer Zunahme der fettfreien Körpermasse und einer Abnahme der Adipositas. Denn GH als anaboles Hormon hat eine positive Stickstoffbilanz, eine gesteigerte Proteinbiosynthese im Muskel und eine Zunahme des Körpergewichts zur Folge. Zudem weist GH lipolytische Effekte in Fett- und Muskelgewebe auf, sodass nach Gabe von GH erhöhte Konzentrationen an freien Fettsäuren und Glycerol messbar werden, offensichtlich durch eine Hemmung der Lipoproteinlipase. Langzeiteffekte von GH sind folglich eine verminderte Fettspeicherung im entsprechenden Gewebe und damit eine erhöhte Fettmobilisation (85).



## 1.8. Zielsetzung

Die 5'DI ist aufgrund ihrer Expression in der Leber und ihrer Eigenschaft, besonderen Einfluss auf die systemische Versorgung des menschlichen Organismus mit extrathyroidal generiertem  $T_3$  auszuüben, ein Kandidatenenzym zur Überprüfung hormoneller Effekte auf den Metabolismus von Schilddrüsenhormonen. Mit der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 steht ein experimentelles Modell zur Verfügung, das sich hervorragend zur Erforschung der h5'DI-Regulation eignet.

Dafür stehen zwei Methoden zur Verfügung. Durch transiente Transfektionen, also der vorübergehenden Etablierung von Fremd-DNA in eukaryonten Zellen, kann die Genregulation, speziell die Regulation der Promoteraktivität, relativ leicht untersucht werden. Dazu wird die Basensequenz des entsprechenden Promotors vor das Gen eines leicht zu detektierenden Enzyms kloniert. Ein solches Reporterenzym ist die Luciferase, welche das Glühwürmchen *Photinus pyralis* zum Leuchten bringt. Nach Transfektion wird die Luciferase in Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Promoter in den entsprechenden Zellen exprimiert.

Die andere Methode misst die Enzymaktivität der h5'DI im Deiodase-Assay direkt. Dabei wird die Enzymaktivität über die Freisetzung von radioaktivem  $^{125}\text{I}$  aus [ $^{125}\text{I}$ ]-markiertem  $rT_3$  durch die h5'DI bestimmt.

Da in Mäusen das geschlechtsabhängige Expressionsmuster der 5'DI durch prä- und posttranskriptionale Regulationsmechanismen selenabhängig gesteuert wird, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit zum einen die Promoteraktivität der h5'DI unter dem Einfluss gonadaler Steroide im Luciferase-Assay zu untersuchen (72). Zum anderen soll geklärt werden, welchen Einfluss gonadale Steroide auf die Enzymaktivität der h5'DI ausüben. Dabei ist außerdem von Interesse, ob durch Kotransfektion der Steroidrezeptoren AR bzw.  $ER\alpha$  mit anschließender Stimulation durch die entsprechenden Steroide eine Veränderung der Enzymaktivität ermittelbar ist.

Um zu klären, ob die beobachteten Veränderungen im „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ durch  $TGF\beta_1$  verursacht sein könnten, soll in diesem Zusammenhang auch die Wirkung von  $TGF\beta_1$  auf die Enzymaktivität der h5'DI in HepG2-Zellen getestet werden.

Zusätzlich war es von Interesse, ob und wenn ja, welchen Einfluss GH auf die Promoter- und Enzymaktivität der h5'DI ausübt, da im Rahmen schwerer Erkrankungen nicht nur die thyrotrope, sondern auch die somatotrope Hormonachse alteriert ist.

## 2. MATERIAL

### 2.1. Geräte

Agarosegelkammer	Minigelkammer, ROTH
Brutschränke	HERAEUS Instruments
$\gamma$ -Counter	Riastar, Canberra PACKARD
Feinwaage	Sartorius Basic, SARTORIUS
Geiger-Müller-Zähler	LB 122, BERTHOLD
Homogenisator	Labsonic U (Sonde: B. Braun 2000), B. BRAUN
Luminometer	EG&G BERTHOLD
pH-Meter	pH 523, WTW
Photometer	Spectrophotometer Ultraspec III, PHARMACIA
Pipetten	10, 100, 1000 $\mu$ l, EPPENDORF
Sicherheitswerkbank	Lamin Air, HB 22448, HERAEUS Instruments
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, HERAEUS Sepatach Sigma 3K-1, SIGMA Laborzentrifugen GmbH J2-HS Centrifuge (Rotor: JA-20, JA-14), BECKMANN Mikro 24-48R / Mikroliter, HETTICH ZENTRIFUGEN

### 2.2. Verbrauchsmaterial

Kunststoffsäule	SARSTEDT
Küvetten	Cuvettes 100, No./REF 67.742, SARSTEDT
Pipetten	Glas: SCHOTT Plastik: Serological pipet, BECTON DICKINSON
Plasmidaufreinigung	QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit, QIAGEN GmbH
Säulenfilter	Filters, 10 $\mu$ m pores, M 2100, MOBITEC
Sephadex LH 20	Adsorptionschromatographie, PHARMACIA
Sterilfilter	Filter: 0,2 $\mu$ m, FP030/3, SCHLEICHER & SCHUELL
Stickstoff	Stickstoff 4.6, MESSER
Zellkulturschalen	Multiwell, 6-/12-well, Falcon, BECTON DICKINSON
Zellkulturflaschen	25/75 cm <sup>2</sup> , Falcon, BECTON DICKINSON

In Gebrauch waren außerdem Materialien und Einwegprodukte der Firmen BECTON DICKINSON, EPPENDORF, FALCON, GREINER und SARSTEDT.

## 2.3. Chemikalien

Aktivkohle	C-9157, SIGMA
Aprotinin	Trasylo <sup>®</sup> , 500000 KIE, BAYER
Aqua Spüllösung	Delta Pharma, BOEHRINGER INGELHEIM
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Protein Assay, BIO-RAD LABORATORIES
DNA-Marker	KiloBase DNA Marker, AMERSHAM PHARMACIA
L-Glutamin (200mM)	L-Glutamin, K0283, BIOCHROM KG
Natriumselenit	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> , S5261, SIGMA
Luciferasereagenz	Luciferase Assay System, E1501, PROMEGA
Lysepuffer	Reporter Lysis 5x Buffer, E3971, PROMEGA
Methyltrienolone	NLP 005, NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS
3,3',5'-[ <sup>125</sup> I]-rT <sub>3</sub>	NEX 109, NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS
3,5,3'-T <sub>3</sub>	Art.-Nr.:13100, Charge: 74, HENNING BERLIN
Transfektionsreagenz	Lipofectamine Reagent, GIBCO LIFETECHNOLOGIES
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA in PBS, BIOCHROM KG

Weitere Chemikalien waren von den Firmen MERCK, PHARMACIA, ROTH und SIGMA bezogen worden.

## 2.4. Puffer und Lösungen

### 2.4.1. Agaroseauftragpuffer:

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

30 % (v/v) Glycerol

### 2.4.2. Agarosegel:

0,8 - 2 % (w/v) Agarose

1x TAE

500 ng/ml Ethidiumbromid

### 2.4.3. Ampicillin-Stammlösung:

Stammlösung 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O; Sterilfiltration mit 0,2 µm Porenfilter und Aliquotierung; als Zusatz zu LB-Medium 50 µg/ml; Lagerung bei -20 °C.

**2.4.4. BSA/PTU-Lösung:**

10 % (w/v)	BSA
10 mM	PTU

**2.4.5. Dowex 50 WX-2:**

Gelöst in 10 % (v/v) Essigsäure; Lagerung bei RT.

**2.4.6. Ethidiumbromid-Stammlösung:**

Stammlösung 500 µg/ml in H<sub>2</sub>O; als Zusatz zu Agarosegel 500 ng/ml.

**2.4.7. Flüssiger Radioaktivabfall:**

Entsorgung des flüssigen Radioaktivabfalls (<sup>125</sup>I) mit 10 ml 1 % (w/v) Natriumdithionit.

**2.4.8. Hanks balanced salt solution (HBSS):**

5 mM	KCl
0,3 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
138 mM	NaCl
4 mM	NaHCO <sub>3</sub>
0,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5,6 mM	D-Glucose

Eingestellt auf pH 7,4; Lagerung bei 4 °C.

**2.4.9. Homogenisationspuffer:**

250 mM	D(+)-Saccherose
20 mM	HEPES
1 mM	EDTA
1 mM	DTT, erst direkt vor Gebrauch des Puffers zugegeben.

Lagerung bei 4 °C.

**2.4.10. Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8):**

1 M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	EDTA

Um einen 1 M Kaliumphosphatpuffer auf pH 6,8 einzustellen, müssen einerseits 43,55 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,93 g EDTA in einem Endvolumen von

250 ml H<sub>2</sub>O und andererseits 34,03 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,93 g EDTA in einem Endvolumen von 250 ml H<sub>2</sub>O gelöst werden. Die basische K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (pH 9,04) wird anschließend mit der sauren KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 4,4) auf pH 6,8 titriert. Lagerung bei RT.

#### 2.4.11. Luria Bertani (LB) Medium:

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Yeast Extrakt
10 g	NaCl
500 µl	Ampicillin (50 mg/ml)

Endvolumen von 1 l H<sub>2</sub>O; eingestellt auf pH 7,0; Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin nach dem Autoklavieren; Lagerung bei 4 °C.

#### 2.4.12. Natriumselenit:

10 mM	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
-------	----------------------------------

Gelöst in HBSS; Lagerung bei -20 °C.

#### 2.4.13. Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7,4):

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,47 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Eingestellt auf pH 7,4; Lagerung bei RT.

#### 2.4.14. rT<sub>3</sub>-Stammlösung:

40 mM	3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
-------	---------------------------

Gelöst in NaOH; Lagerung bei -20 °C.

#### 2.4.15. T<sub>3</sub>-Stammlösung:

40 mM	3,5,3'-Triiod-L-Thyronin
-------	--------------------------

Gelöst in NaOH; Lagerung bei -20 °C; Photometrische Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 322 nm:

$$T_3 \text{ [M]} = \frac{E_{322} \cdot \text{Verdünnung}}{4660}$$

**2.4.16. 50x TAE-Puffer:**

242 g	Trisacetat
50 ml	EDTA (0,5 M, pH 8)
23,6 ml	Essigsäure (100 %)
Endvolumen von 500 ml H <sub>2</sub> O.	

**2.4.17. Trypanblau-Lösung:**

0,5 % (w/v)	Trypanblaufarbstoff
Gelöst in PBS; Lagerung bei RT.	

**2.5. Steroide und Zytokine**

Dexamethason (Dex)	SIGMA
5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT)	SIGMA
17 $\beta$ -Estradiol (E <sub>2</sub> )	SIGMA
Methyltrienolon (R1881)	NLP-005, NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS
Progesteron (P)	SIGMA
Testosteron (T)	SIGMA

Die Steroidhormone wurden in 96 %-igem Ethanol mit einer Konzentration von 50  $\mu$ M gelöst. Die Lagerung erfolgte als Trockensubstanz lichtgeschützt bei RT und in gelöstem Zustand lichtgeschützt bei -20 °C.

Bei Methionyl-rhGH (Genotropin<sup>®</sup> Miniquick; 1,8 I.E.; 0,6 mg) handelte es sich um ein Arzneimittel der Firma PHARMACIA & UPJOHN. GH wurde nach Anleitung in H<sub>2</sub>O mit einer Konzentration von 2,4 mg/ml gelöst und bei -20 °C gelagert.

Rekombinantes humanes TGF $\beta$ <sub>1</sub> (Lot. P031S88) war von der Firma STRATHMANN BIOTECH. Die Rekonstitution von TGF $\beta$ <sub>1</sub> in H<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml nach Anleitung ergab eine 1mM Natriumzitat-Puffer-Lösung (pH 3,5). Die weitere Verdünnung erfolgt mit PBS + 2 mg/ml BSA. Gelagert wurde die gelöste Form bei -20 °C.

## 2.6. Promoterreportergen-Konstrukte und Expressionsplasmide

pGL2 basic	PROMEGA
pGL2 control	PROMEGA
pBluescript II SK +/- (pBS)	STRATAGENE
pGL2h5´DIpr	Geschenk von C. Wagner und B. Mentrup
pSG5HEO	Geschenk von S. Green
pSVAR0	Geschenk von A.O. Brinkmann
pBK15SePPpr-1800	Geschenk von T. C. Jakobs und I. Dreher

### 2.6.1. h5´DI-Promoter-Reportergen-Konstrukte (pGL2h5´DIpr)

Zur Verfügung standen verschiedene h5´DI-Promoter-Reportergen-Konstrukte. Grundstruktur ist das Plasmid pGL2basic, in das unterschiedlich lange Fragmente des 5´-untranslatierten Bereichs der h5´DI über *KpnI*- und *HindIII*-Schnittstellen inkloniert worden waren. Das längste dieser Fragmente besteht aus 2467 bp, während sich die kürzeren aus 1480 bp, 739 bp, 428 bp und 105 bp zusammensetzen. Diese Konstrukte standen aufgrund früherer Arbeiten von T. C. Jakobs, I. Dreher, C. Wagner und B. Mentrup zur Verfügung (58).

### 2.6.2. SePP-Promoter-Reportergen-Konstrukt (pBK15SePPpr-1800)

pBK15SePPpr-1800 ist ein Konstrukt aus SePP-Promoter und dem Luciferase-Reportergen. I. Dreher und T. C. Jakobs hatten 1800 bp des SePP-Promoters sowie 50 bp des pBluescript-Vektors in den pGL2-Vektor kloniert. Die Mutante, die letztlich gewählt wurde, trug den Namen pBK15 (81).

### 2.6.3. Androgenrezeptor-Expressionsplasmid pSVAR0

A. O. Brinkmann hat den humanen Androgenrezeptor (AR) in das pSV-Plasmid kloniert (89). Das Expressionsplasmid pSVAR0 besteht aus 7219 bp. Dieses Plasmid enthält den „*early SV40 Promoter*“, der als Enhancer der Expression *in vivo* fungiert, und das „*rabbit  $\beta$ -globin poly-A-signal*“, das die Polyadenylierung der RNA vermittelt, was die Stabilität des Transkripts erhöht. Das *ORI-Element* ist für die Replikation des Plasmids in *E. coli* verantwortlich, da an dieser Stelle (*origin*) die Replikation startet, während das *Amp-Gen* die transformierten Bakterien gegen Ampicillin resistent macht. Das pSVAR0-Plasmid wurde von A. O. Brinkmann (Erasmus Universität Rotterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

### 2.6.4. Estrogenrezeptor-Expressionsplasmid (pSG5HEO)

Der pSG5-Vektor ist eine Kombination des pBS-Vektors von Stratagene mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pKCR2. Dieser Kombinationsvektor enthält ebenfalls den „*early SV40 Promoter*“ sowie das „*rabbit  $\beta$ -globin poly-A-signal*“. S. Green hat die cDNA des humanen Estrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) über eine EcoRI-Schnittstelle in pSG5 inkloniert, deshalb der Name: pSG5HEO (Ref.Nr. II A5). Die Größe des Plasmids beträgt 1800 bp (90).

### 2.7. Zellkulturmedien und Zusätze

Standardmedium war „*Dulbecco's modified Eagle's medium*“ (DMEM) mit Zusatz von „*Ham's nutrient mixture F12*“ (NUT MIX F12). Den Medien wurde fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Standardwaschpuffer war „*Hank's balanced salt solution*“ (HBSS). Die Zellkulturmedien bestanden aus folgenden käuflich erworbenen Produkten:

DMEM/NUT MIX F12 (DMEM F12)	42400-010, GIBCO BRL Lifetechnologies
DMEM/NUT MIX F12 ohne Phenolrot	D-2906, SIGMA
DMEM mit 4500mg/l D-Glucose	52100-013, GIBCO BRL Lifetechnologies
FCS (Lot 40G7382K)	10270-106, GIBCO BRL Lifetechnologies
HBSS	14175-046, GIBCO BRL Lifetechnologies

Hergestellt wurden die Medien nach Anleitung. Nach Einstellung auf pH 7,2 wurden sie mittels Vakuumfiltration durch 0,2  $\mu$ m Porenfilter sterilfiltriert. Gelagert wurden sie bei 4 °C. Die Medien wurden wie folgt modifiziert:

DMEM F12 + 10 % (v/v) FCS + 100 nM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
DMEM F12 + 100 nM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
DMEM F12 ohne Phenolrot + 100 nM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
DMEM 4500 mg/l D-Glucose + 100 nM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> + 1 mM Pyruvat + 2 mM Glutamin + 1 % (v/v) Aprotinin + 0,1 % (w/v) BSA



## 2.8. Prokaryontische und eukaryontische Organismen

E. coli JM 109

PHARMACIA

Escherichia coli JM 109-Zellen waren mit den Promoter-Reporter-Gen-Konstrukten sowie mit den Expressionsplasmiden transformiert worden. Sie standen der Arbeitsgruppe aufgrund der früheren Arbeit von C. Wagner und aufgrund der Experimente von B. Mentrup zur Verfügung.

HepG2-Zellen

HB 8065, ATCC

Die Versuche wurden an der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 durchgeführt. Die Zelllinie war 1975 aus dem hepatozellulären Karzinomgewebe eines 15 Jahre alten argentinischen Jungen etabliert worden. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von  $-196\text{ °C}$  in DMEM F12 plus 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO konserviert.

## 2.9. Elektronische Datenverarbeitungsprogramme

Datenverarbeitung	Quattro Pro, Version 5.00, BORLAND INTERNATIONAL
Datenverarbeitung	Office Excel 97, MICROSOFT
	Office Excel 2003, MICROSOFT
Statistikporgramm	Sigma Plot, Version 4.0, SPSS
Statistikporgramm	Superior Performing Software Systems (SPSS), SPSS
Textverarbeitung	Office Word 97, MICROSOFT
	Office Word 2003, MICROSOFT

### 3. METHODEN

#### 3.1. Reportergene und Expressionsplasmide

##### 3.1.1. Plasmidpräparation

Kompetente *E. coli* JM 109-Zellen waren von C. Wagner und B. Mentrup mit den entsprechenden Plasmiden transformiert worden und standen als Glycerolstocks zur Verfügung. Die Glycerolstocks setzen sich aus 700 µl Bakteriensuspension und 300 µl 50 % (v/v) Glycerol zusammen und wurden bei -80 °C aufbewahrt. Zur Präparation von Plasmid-DNA mussten die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten *E. coli*-Zellen in LB-Medium vermehrt werden. Damit stets die richtigen Bakterienstämme zur Vermehrung kommen, enthalten die Plasmide ein Ampicillin-Resistenzgen. Dadurch können sie mittels eines ampicillinhaltigen Nährmediums selektioniert werden. Hierzu wurden 200 ml LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin mit 200 µl transformierten *E. coli*-JM-109-Zellen aus Glycerolstocks angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Rüttler bei 225 rpm inkubiert. Für die Aufreinigung der Plasmide wurde der Qiafilter™ Plasmid Maxi Kit nach Anleitung verwendet. Prinzip dieses Kits ist eine alkalische Lyse der Zellen mit anschließender Reinigung des Lysats mittels des Qiafilters™. Anschließend wird das Lysat über eine Säule gegeben, in der die negativ geladenen Phosphat-Verbindungen der Plasmid-DNA mit den positiv geladenen Diethylaminoethanol-(DEAE)-Gruppen des Anionenaustauschharzes der Säulen interagieren können. Durch die unterschiedliche Salzkonzentrationen der verwendeten Puffer bleibt die DNA bei niedriger Salzkonzentration an die Säule gebunden, bei hoher wird diese eluiert. Die Proben wurden durch Isopropanol- und Ethanol-fällung gereinigt, mit Hilfe der *Speed-Vac* getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der Proben wurde, wie folgt, im Photometer bestimmt.

##### 3.1.2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, aufgrund dessen die Nukleinsäurekonzentration im Photometer bestimmt werden kann. Eine Extinktion oder optische Dichte (OD) bei 260 nm mit dem Wert 1 entspricht einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml. Proteine hingegen haben aufgrund der aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt somit den Grad der Reinheit der Probe wieder und sollte ungefähr

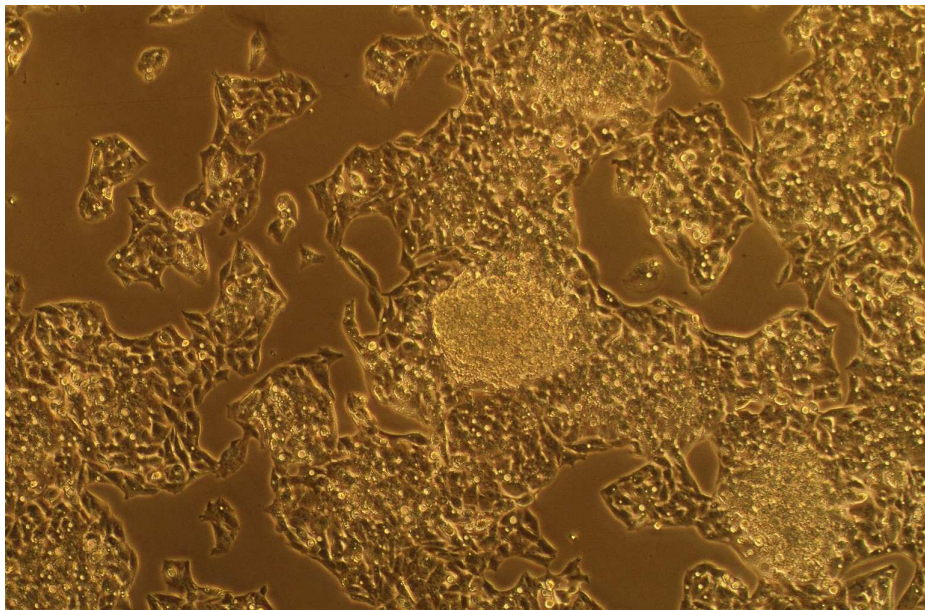
bei 2 liegen (91). Die Konzentration der aus der Plasmidpräparation gewonnenen DNA kann anhand folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\frac{OD_{260} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 50}{\text{Eingesetzte DNA } [\mu\text{l}]} = \text{DNA } [\mu\text{g/ml}]$$

## 3.2. Zellkultur von HepG2-Zellen

### 3.2.1. Zellkulturbedingungen und Passagieren der Zellen

Kultiviert wurden die Zellen in DMEM F12 + 10 % (v/v) FCS + 100 nM Natriumselenit. Inkubiert wurden die Zellen in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Kultur eines adhärenenten Monolayers war nur bedingt möglich, da ein Teil der Zellen adhärenente Zell-Cluster bildete.



**Abb. 5: HepG2-Zellen.**

**Ausgesät für Deiodase-Assay; Photoaufnahme nach 48 h Inkubation und 48 h Hormonstimulation;**

**100-fache Vergrößerung im Umkehrmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung.**

HepG2-Zellen sind charakterisiert durch schnelles Wachstum. Deshalb war es nötig die Zellen wöchentlich zu passagieren. Die Zellen mussten also unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues überführt werden. Zum Passagieren wurden die Zellen zweimal mit je 8 ml HBSS (37 °C) gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA und Inkubation für 5 min bei 37 °C wurden die Zellen von der Kulturflasche gelöst. Die so gewonnene

Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 8 ml DMEM F12 + 10 % (v/v) FCS + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 8 ml DMEM F12 + 10 % (v/v) FCS + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> resuspendiert und die Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vereinzelt. Ein Teil der Zellen wurde anschließend in DMEM F12 + 10 % (v/v) FCS + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3-4 d erhielten die Zellen frisches Medium. Die Zellen wurden zwischen Passage 4 bis 35 verwandt.

### 3.2.2. Trypanblaufärbetest und Zellzahlbestimmung

Um die Vitalität der Zellen zu bestimmen, wurden diese einem Färbetest mit Trypanblau unterzogen. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension und 300 µl PBS mit 500 µl 0,5 % (w/v) Trypanblaulösung vermischt. Lebende Zellen dürfen unter mikroskopischer Betrachtung keine Färbung zeigen, während tote Zellen durchgängig blau angefärbt sind. Bei Bestimmung der Zellzahl wurden nur lebende Zellen berücksichtigt. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Nach Reinigung der Zählkammer und Fixierung des Deckglases wurden pro Kammer 20 µl der gefärbten Zellen aufgetragen. Jede Kammer enthält ein quadratisches Zählnetz aus je neun Quadraten. In jeder Kammer wurden die vier großen Eckquadrate sowie das mittlere Quadrat ausgezählt. Da jedes Quadrat eine Seitenlänge von 1 mm und das Deckglass einen Abstand von 0,1 mm hat, ergibt sich durch Addition der Zellzahl aus 10 Quadraten die Zellzahl in 1 mm<sup>3</sup> (µl). Durch Multiplikation mit dem Faktor 1000 und zusätzlicher Multiplikation mit dem Faktor 9, da die Zellsuspension durch die Trypanblaufärbung im Verhältnis 1÷9 verdünnt wurde, erhält man die Anzahl der Zellen in 1 cm<sup>3</sup> (ml).

### 3.2.3. Kulturbedingungen für den Luciferase- und Deiodase-Assay

Für den Luciferase-Assay wurden die Zellen in 12-„well“ Platten kultiviert. In jede der Vertiefungen wurden  $3,5 \cdot 10^5$  Zellen in einem Volumen von 1 ml DMEM F12 + 10 % (v/v) DCC-FCS + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ausgesät und anschließend für 24 h bis zur Transfektion bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Stimulationsdauer im Luciferase-Assay betrug 24 h.

Für den Deiodase-Assay wurden die Zellen in 6-„well“ Platten ausgesät. Pro Vertiefung wurden hier  $7 \cdot 10^5$  Zellen in einem Volumen von 2 ml DMEM F12 + 10 % (v/v) DCC-FCS + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> kultiviert. Danach wurden die Zellen 48 h kultiviert und anschließend 48 h stimuliert. Bei zusätzlicher Transfektion von Hormonrezeptoren wurden die Zellen nur 24 h kultiviert, dann 24 h transfiziert und im Anschluss daran 48 h lang stimuliert, bevor es zur Auswertung im Deiodase-Assay kam.

Die Ansätze für die entsprechenden Hormone waren immer als Triplikate konzipiert. Die Fallzahl, also die Wiederholung des Experiments, war variabel und wurde unter anderem von der Zahl der zur Verfügung stehenden Zellen abhängig gemacht.

#### **3.2.4. Steroidhormon-depletiertes Kälberserum (DCC-FCS)**

Um Steroidhormone in der Zellkultur testen zu können, sollte das FCS, mit dem die Zellen vor der Transfektion kultiviert werden, möglichst frei von Steroiden sein. Die im FCS enthaltenen Steroide können an Aktivkohle adsorbiert werden.

Zur Herstellung von steroid-depletiertem FCS, „*Dextran-Charcoal-FCS*“ (DCC-FCS), wurden 500 ml FCS bei 4 °C über 1-2 d aufgetaut. Parallel wurden 2 g Aktivkohle und 2,5 g Dextran mit 200 ml TRIS (10 mM; pH 7,4) für 12 h bei 4 °C gerührt. Die Aktivkohle wurde bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Ein Teil der Aktivkohle wurde dann für 2 h bei 4 °C mit dem FCS gerührt, mit 5000 rpm für 10 min bei 4 °C wieder abzentrifugiert und verworfen. Der andere Teil der Aktivkohle wurde ebenfalls für 2 h bei 4 °C mit dem FCS gerührt, schließlich mit 12500 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert und verworfen. Hinterher wurde das FCS nochmals mit 15000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, durch Vakuumfiltration sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

In der Hormonbestimmung bei W. Weidemann (Universität Ulm) wies unbehandeltes FCS eine Testosteronkonzentration von 6,559 ng/dl, entsprechend einer Konzentration von 0,2 nM, auf. Die Testosteronkonzentration von DCC-FCS war jedoch unterhalb der Nachweisgrenze. Die Nachweisgrenze für Testosteron lag bei 3 ng/dl. Bei Untersuchung des Einflusses von gonadalen Steroiden auf die h5'DI wurden die Zellen mit DMEM F12 + 10 % (v/v) DCC-FCS + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> kultiviert.

#### **3.2.5. Estrogenwirkung von Phenolrot**

Da in der Literatur eine estrogenähnliche Wirkung von Phenolrot beschrieben worden ist, wurde bei Transfektion von ER $\alpha$  oder Stimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol auf den Zusatz von Phenolrot im Zellkulturmedium verzichtet und die Zellen entsprechend mit DMEM F12 ohne Phenolrot inkubiert (92).

### **3.3. Transfektion eukaryontischer Zellen**

Unter Transfektion versteht man die Einbringung von DNA in eukaryonte Zellen. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion führt die transiente Transfektion nicht zur dauerhaften Etablierung von Fremd-DNA in diesen Zellen. Die Genregulation, speziell die Regulation der Promoteraktivität eines bestimmten Gens, lässt sich mit Hilfe einer solchen Transfektion

relativ einfach untersuchen. Dazu wird die Basensequenz des entsprechenden Promotors vor das Gen eines leicht zu detektierenden Enzyms kloniert. Ein solches Reporterenzym ist die Luciferase, welche das Glühwürmchen *Photinus pyralis* zum Leuchten bringt. Durch Transfektion wird die Luciferase, in Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Promoter, in den entsprechenden Zellen exprimiert. Aufgrund der leichten Detektierbarkeit dieses Enzyms kann so die Promoteraktivität bestimmt werden.

Für die Transfektion von HepG2 wurde eine chemische Methode gewählt, welche die Plasmid-DNA komplexiert und deren Wechselwirkung mit der Zellmembran verstärkt. Das Lipofectamine™ Reagenz ist eine Mischung aus dem polykationischen Lipidmolekül DOSPA und dem neutralen Lipidmolekül DOPE (Verhältnis 3÷1). Die positiv geladenen Lipide können mit den negativ geladenen Phosphatomen der DNA interagieren, was die Ausbildung von Liposomen-DNA-Komplexen fördert. Liposomen sind Partikel, die von einer meist mehrschichtigen Lipidmembran umgeben sind. Diese Liposomen-DNA-Komplexe wiederum können leicht mit der Zellmembran interagieren und so in die Zelle aufgenommen werden.

### **3.3.1. Transfektion von Reportergenkonstrukten und Luciferase-Assay**

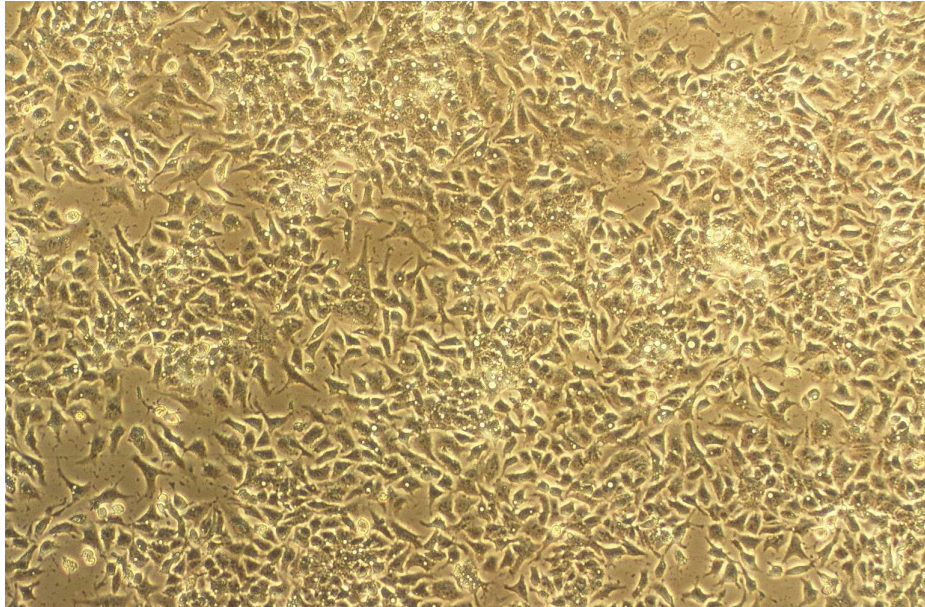
Im Detail wurde mit Triplikaten, also der dreifachen parallelen Ausführung der jeweiligen Ansätze, gearbeitet. Jeder Ansatz, sprich Triplikat, entsprach 1,5 µg Reportergenkonstrukt in einem Volumen von 15 µl H<sub>2</sub>O. Jedes dieser Triplikate wurden mit 150 µl DMEM F12 verdünnt und mit 150 µl DMEM F12 + 10 % (v/v) *Lipofectamin reagent*™ für die Transfektion vorbereitet. Nach 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Volumen der DNA-Lipofectamine-Mischung durch Zugabe von 1,3 ml DMEM F12 auf 1,6 ml ergänzt. Davon wurden, nachdem zuvor das Inkubationsmedium der Zellen abgesaugt worden war, 0,5 ml pro „well“ als Triplikat auspipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Transfektion durch Mediumwechsel beendet und die Zellen mit den entsprechenden Liganden stimuliert. Die Stimulationsdauer betrug 24 h, bevor letztlich die Zellen geerntet wurden. Zur Kontrolle wurde der leere Luciferasevektor pGL2basic transfiziert. Ausgewertet wurde eine solche Transfektion im Luciferase-Assay.

### **3.3.2. Transfektion von AR bzw. ER $\alpha$ und Deiodase-Assay**

Bei transienter Transfektion des Androgen- und Östrogenrezeptors handelte es sich nicht um die Transfektion von Promoter-Reportergen-Konstrukten sondern um die Transfektion von Expressionsplasmiden, auf denen die entsprechenden nukleären Hormonrezeptoren kodiert



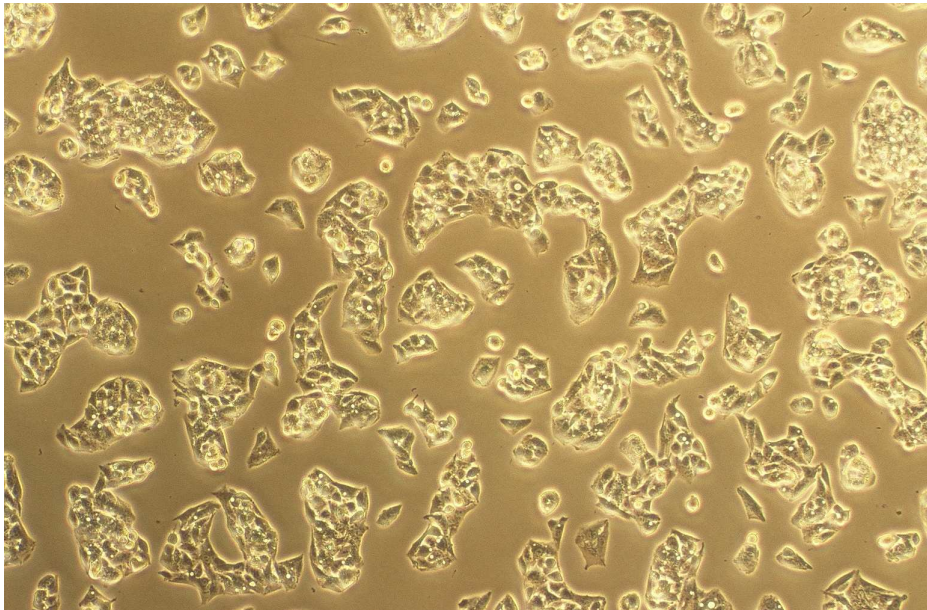
sind. Damit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Transfektion von AR bzw. ER auf die Enzymaktivität der h5'DI unter dem Einfluss von R1881 bzw. 17 $\beta$ -Estradiol in HepG2-Zellen hat. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pBS transfiziert.



**Abb. 6: HepG2-Zellen nach Transfektion.**

**Ausgesät für Deiodase-Assay; Photoaufnahme nach 24 h Inkubation und 24 h Transfektion mit pSG5HEO vor Stimulation mit Hormonen; 100-fache Vergrößerung im Umkehrmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung.**

Hierzu wurden, wie oben beschrieben, 6-„well“-Platten verwendet. Ausgesät worden waren  $7 \cdot 10^5$  Zellen in einem Volumen von 2 ml DMEM F12 + 10 % (v/v) DCC-FCS. Bei Transfektion von ER $\alpha$  wurde DMEM F12 ohne Phenolrot als Transfektions- und Stimulationsmedium verwendet. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit AR bzw ER $\alpha$  transfiziert. Für jeden Triplikatansatz wurden 3  $\mu$ g Reportergenkonstrukt in einem Volumen von 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O vorgelegt. Diese Ansätze wurden mit je 300  $\mu$ l DMEM F12 verdünnt und mit je 300  $\mu$ l DMEM F12 + 10 % (v/v) *Lipofectamin reagent*<sup>TM</sup> für die Transfektion vorbereitet. Nach 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Volumen der Liposom-DNA-Komplex-Lösung durch Zugabe von 2,6 ml DMEM F12 auf 3,2 ml ergänzt. Davon wurde pro Ansatz 1 ml pro „well“ als Triplikat auspipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Transfektion durch Mediumwechsel beendet und die Zellen mit den entsprechenden Liganden R1881 (50 nM) und 17 $\beta$ -Östradiol (50 nM), wie im nächsten Kapitel genauer beschrieben, stimuliert. Die Stimulationsdauer betrug 48 h, bei zeitabhängiger Stimulation 24 - 72 h. Danach wurden die Zellen für den Deiodase-Assay geerntet.



**Abb. 7: untransfizierte HepG2-Zellen.**

Die gleichen Zellen wie in Abb. 6, ausgesät für Deiodase-Assay ohne Transfektion; Photoaufnahme nach 48 h Inkubation unmittelbar vor Stimulation mit Hormonen; 100-fache Vergrößerung im Umkehrmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung.

### **3.4. Hormoninkubation**

#### **3.4.1. Stimulation mit gonadalen Steroiden - Luciferase-Assay**

Nach Transfektion mit pGL2h5'DIpr-1480 wurde für die Stimulation mit Steroiden das Medium gewechselt und die Zellen mit den entsprechenden Hormonen inkubiert. Testosteron (T), Methyltrienolon (R1881), 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT), 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>), Progesteron (P) und Dexamethason (Dex) wurden in einer Konzentration von 50 nM mit DMEM F12 ohne Phenolrot gemischt und die Zellen mit je 1 ml pro „well“ stimuliert. Zur Messung des Basalwertes wurde zu den Zellen die entsprechende Menge 96 %-iges Ethanol ohne Hormonzusatz gegeben. Die Inkubationszeit betrug 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Hormonstimulationen, auch die im Weiteren aufgeführten, wurden immer als Triplikatansätze durchgeführt.

#### **3.4.2. Stimulation mit gonadalen Steroiden - Deiodase-Assay**

Stimuliert wurden die Zellen mit Testosteron (T), Methyltrienolon (R1881), 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT), 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>), Progesteron (P) und Dexamethason (Dex) in einer Konzentration von 50 nM mit je 2 ml pro „well“ DMEM F12 ohne Phenolrot und ohne Selen. Die Steroidstimulation wurde ebenso unter Selengabe mit je 2 ml pro „well“ DMEM F12 ohne Phenolrot + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> durchgeführt. Bei Kostimulation mit T<sub>3</sub>



betrug dessen Konzentration 3 nM. Stimuliert wurden die Zellen für 48 h, für eine zeitabhängige Stimulation 24 - 36 h, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Messung des Basalwertes wurde die entsprechende Menge 96 %-iges Ethanol ohne Hormonzusatz verwendet.

### 3.4.3. Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> - Luciferase-Assay

Nach 24 h Transfektion von pBK15SePPpr-1800 wurden die Zellen für 24 h mit 4 pM und 100 pM TGFβ<sub>1</sub> stimuliert. Pro „well“ wurde 1 ml DMEM F12 ausplattiert. Zur Messung des Basalwertes wurde eine äquivalente Verdünnung an 1 mM Natriumzitat sowie PBS + 2 mg/ml BSA ohne Hormonzusatz mit DMEM F12 versetzt und ebenfalls je 1 ml pro „well“ zu den Zellen pipettiert.

### 3.4.4. Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub> - Deiodase-Assay

Nach Aussäen der Zellen wurden diese für 48 h kultiviert und anschließend für 48 h mit TGFβ<sub>1</sub> in Konzentrationen von 0,4 pM, 4 pM, 40 pM und 100 pM mit je 2 ml pro „well“ DMEM F12 + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> stimuliert. Zur Messung des Basalwertes wurde die entsprechende Verdünnung an 1 mM Natriumzitat sowie PBS + 2 mg/ml BSA ohne Hormonzusatz mit DMEM F12 + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> benutzt und je 2 ml pro „well“ davon ausplattiert.

### 3.4.5. Stimulation mit GH - Luciferase-Assay

Nach Transfektion mit pGL2h5'DIpr-2467 wurde für die Dauer von 48 h alle 12 h mit 400 ng/ml GH stimuliert. Das Medium wurde nur zu Beginn der Stimulation gewechselt. Es wurden folgende 2 Medien mit je 1 ml pro „well“ verwendet:

- 1.: DMEM F12 + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + 1 % [v/v] Aprotinin + 0,1 % [w/v] BSA
- 2.: DMEM 4500 mg/l D-Glucose + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + 1 mM Pyruvat + 2 mM Glutamin + 1 % [v/v] Aprotinin + 0,1 % [w/v] BSA

DMEM 4500 mg/l D-Glucose enthält, im Unterschied zu DMEM F12, 1349 mg/l D-Glucose mehr. Aprotinin ist ein polyvalenter Proteaseinhibitor, der den Abbau von GH verhindern soll, während BSA zur weiteren Stabilisierung von GH nötig ist. T<sub>3</sub> wurde in einer Konzentration von 3 nM eingesetzt und wurde nur einmalig zu Beginn der Stimulation zugesetzt. Als Kontrolle wurde die äquivalente Menge H<sub>2</sub>O verwendet.

### 3.4.6. Stimulation mit GH - Deiodase-Assay

Zum einen wurde einmalig mit 240 ng/ml GH (je 1 ml pro „well“) stimuliert und nach 48 h die Enzymaktivität im Deiodase-Assay bestimmt. Zum anderen wurde ebenfalls für die Dauer

von 48 h alle 12 h mit 400 ng/ml GH stimuliert. Es fand nur ein Mediumwechsel zu Beginn der Stimulation statt. Verwendet wurden folgende zwei Medien mit je 1 ml pro „well“:

- 1.: DMEM F12 + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + 1 % [v/v] Aprotinin + 0,1 % [w/v] BSA
- 2.: DMEM 4500 mg/l D-Glucose + 100 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> + 1 mM Pyruvat + 2 mM Glutamin + 1 % [v/v] Aprotinin + 0,1 % [w/v] BSA

T<sub>3</sub> wurde in einer Konzentration von 3 nM eingesetzt und wurde nur einmalig zu Beginn der Stimulation zugesetzt. Um einen direkten Effekt durch einen der Inhaltsstoffe von DMEM 4500 mg/l D-Glucose ausschließen zu können, wurden ebenso 1349 mg/l D-Glucose, 1 mM Pyruvat und 2 mM Glutamin für 48 h mit je 1 ml pro „well“ DMEM F12 getestet. Als Kontrolle wurde die äquivalente Menge H<sub>2</sub>O verwendet.

### 3.5. Luciferase-Assay - Promoteraktivitätsbestimmung der h5'DI

#### 3.5.1. Aktivitätsbestimmung der Luciferase

Das hier verwendete Reporterenzym war die Luciferase. Dieses Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin. Als Substrat dieser Reaktion dienen Luciferin, ATP, O<sub>2</sub> und Mg<sup>2+</sup>, wohingegen Oxyluciferin, hv, AMP, PP<sub>i</sub> und Mg<sup>2+</sup> als Reaktionsprodukte entstehen. Die relativ kurze Lichtemission (hv) dieser Chemilumineszenzreaktion ist bei 562 nm im Luminometer messbar. Die Lichtemission ist proportional zur Luciferase-Aktivität, deshalb ist die Lichtemission ein Surrogatmarker für die Promoteraktivität des entsprechenden Promoter-Reportergen-Konstrukts.

Der Luciferase-Assay setzte sich aus folgenden Arbeitsschritten zusammen: Nach Transfektion und Stimulation der Zellen wurden diese geerntet. Dazu wurden die Zellen zweimalig mit je 1 ml PBS (4 °C) gewaschen und durch Zugabe von 200 µl Reporter Lyse Puffer (1x; 4 °C) pro „well“ lysiert. Die Zellen wurden 10 min mit dem Lysepuffer inkubiert, danach mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in Eppendorf-Caps überführt. Nach Vortexen musste das Zellysate anschließend für 30 sec bei 14000 rpm zentrifugiert werden. Für die weiteren Messungen wurde nur der Überstand verwendet und auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde im Luminometer vorgenommen. Dazu wurden 20 µl der Proben in 96-„well“ Mikrotiter-Platten pipettiert und diese im Luminometer durch einen automatischen Reagenz-Injektor mit 50 µl Luciferase-Assay-Substratpuffer versetzt. Die dabei entstehende Lichtemission, die in „*Florescence units*“ (FU) angegeben wird, wurde für die Dauer von 10 sec gemessen. Letztlich musste noch die Proteinkonzentrationen der

einzelnen Proben, wie im nächsten Kapitel beschrieben, bestimmt werden, da sich die spezifische Luciferaseaktivität aus FU und Proteinkonzentration berechnet:

$$\text{spezifische Luciferaseaktivität} = \frac{\text{FU}}{\text{Protein } [\mu\text{g}]}$$

Da die Ergebnisse interexperimentelle Schwankungen aufwiesen, wurde, falls relevant, die relative Luciferaseaktivität in Prozent berechnet.

### 3.5.2. Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden durch eine modifizierte Methode nach Bradford bestimmt, dem *Bio-Rad Protein Assay* (93). Chemischphysikalische Grundlage dieser Methode bildet der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue*, dessen Absorptionsmaximum sich nach Proteinbindung von 465 nm zu 595 nm verschiebt.

Pro Küvette (1 cm) wurden 10  $\mu\text{l}$  der Probe mit 1 ml des nach Anleitung verdünnten Bio-Rad-Reagenz vermischt und mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gemessen wurden die Proben im Photometer bei 595 nm. Gleichzeitig wurden je 2, 5, 10, 20 und 30  $\mu\text{l}$  eines IgG-Proteinstandards definierter Konzentration mit 1 ml *Bio-Rad*-Lösung gemessen, um anhand einer Regressionsanalyse eine Eichgerade zu erstellen. Mit Hilfe der gemessenen Extinktion und der Standardkurve wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### 3.6. Deiodase-Assay - Enzymaktivitätsbestimmung der h5'DI

Der Deiodase-Assay dient dazu die Enzymaktivität der Deiodaseenzyme zu bestimmen. Grundlage des Assays ist die Freisetzung von radioaktivem  $^{125}\text{I}$  aus [ $^{125}\text{I}$ ]-markiertem  $\text{rT}_3$  in Anwesenheit von unmarkiertem  $\text{rT}_3$  (94) (95).

Der Assay setzt sich im Überblick aus folgenden Schritten zusammen. Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von Zellhomogenat mit h5'DI zu einem Substratmix aus 3,3',5'-[ $^{125}\text{I}$ ]- $\text{rT}_3$  als Tracer und 10 nmol/L unmarkiertem  $\text{rT}_3$ , wobei die Konzentration von [ $^{125}\text{I}$ ]- $\text{rT}_3$  gegenüber  $\text{rT}_3$  vernachlässigbar gering ist. Da die genaue Konzentration von  $\text{rT}_3$  bekannt ist, kann ausgehend von der [ $^{125}\text{I}$ ]-Freisetzung die eigentliche I-Freisetzung aus  $\text{rT}_3$  berechnet werden. Als Cosubstrat dient reduzierendes Dithiol in Form von DTT zur Regeneration der h5'DI nach Deiodierung. Die Reaktion wird durch Zugabe einer BSA/PTU-Lösung gestoppt. PTU führt zur irreversiblen Hemmung der h5'DI, und BSA bindet das verbleibende Iodthyronin. Nach Ausfällung und Abzentrifugation der Proteine wird aus dem Überstand das freigesetzte  $^{125}\text{I}$  durch Säulenchromatographie abgesondert, da [ $^{125}\text{I}$ ]- $\text{rT}_3$  an die Säulen bindet und  $^{125}\text{I}$  nicht. Anschließend wird die  $\gamma$ -Strahlung von  $^{125}\text{I}$  im  $\gamma$ -Counter gemessen.

### 3.6.1. Präparation von Zellhomogenaten

Für die Bestimmung der Deiodaseaktivität wurden die Zellen nach entsprechender Stimulationsdauer geerntet. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS (4 °C) gewaschen. Danach wurden die Zellen in 300 µl Homogenisationspuffer (4 °C) pro „well“ geerntet. Durch Ultraschall (10 mal ein 0,5 s-Puls bei 100 Watt) wurden die Zellen homogenisiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der modifizierten Bradford-Methode unter Verwendung des *Bio-Rad Protein Assays* (vgl. 3.5.2.). Die Proben wurden bis zur Messung der Deiodase-Aktivität bei -20 °C verwahrt.

### 3.6.2. Reinigung des Tracers

Da der Tracer 3,3',5'-[<sup>125</sup>I]-rT<sub>3</sub> durch spontane Deiodierung und Radiolyse auch freies <sup>125</sup>I enthält, wurde dieses durch Adsorptionschromatographie an Sephadex LH 20 gebunden. Hierzu wurden 600 µl Sephadex LH 20, das in 0,1 M HCl-Lösung resuspendiert war, in eine Sarstedt-Kunststoffsäule mit 10 µm Porenfilter pipettiert und die Säule mit 3 ml HCl (0,1 M) äquilibriert. Auf diese Säule wurde der Tracer aufgetragen, dessen Menge so gewählt wurde, dass im fertigen Substratmix eine Aktivität von 55000 cpm/50 µl gemessen werden konnte. Die Menge an Tracer war außer von der Anzahl der Proben auch von der Lagerungszeit des Tracers abhängig, da die Halbwertszeit von [<sup>125</sup>I] 60 d beträgt. Sodann wurde die Säule mit 3 ml HCl (0,1 M) und danach mit 3 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Abschließend wurde der Tracer mit 1 ml Ethanol:NH<sub>3</sub> (98:2) durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min in ein Glasröhrchen eluiert. Bei 20 °C im Wasserbad erfolgte dann unter N<sub>2</sub>-Begasung die vollständige Eindampfung des Substrats. Für den Substratmix wurde der Tracer wie folgt resolubilisiert:

rT <sub>3</sub>	nach Endkonzentration; hier 10 nmol/L rT <sub>3</sub>
NaOH	0,33 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,8)	200 mM
EDTA	2 mM
DTT	40 mM
H <sub>2</sub> O	nach Anzahl der Reaktionsansätze

Das Endvolumen an H<sub>2</sub>O richtet sich nach der Anzahl der zu untersuchenden Proben. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Deiodaseaktivität eines Ansatzes durch 2 Triplikate bestimmt

wird, nämlich ein PTU-gehemmtes und ein ungehemmtes Triplikate. Dies macht zusammen 6 Reaktionsansätze, wobei pro Reaktionsansatz 50 µl Substratmix nötig sind.

50 µl des fertigen Substratmix und 2 ml 10 % (v/v) Essigsäure wurden für 10 min im  $\gamma$ -Counter gemessen, um den Wert für die theoretisch maximal mögliche [ $^{125}\text{I}$ ]-Freisetzung ( $\text{cpm}_{100\%}$ ) bestimmen zu können. Der  $\text{cpm}_{100\%}$ -Wert sollte, wie bereits erwähnt, nach Möglichkeit bei 55000  $\text{cpm}/50 \mu\text{l}$  Substratmix liegen.

### 3.6.3. Messung der Deiodaseaktivität

Zur Bestimmung der  $\text{h5}'\text{DI}$ -Aktivität wurde das Zellhomogenat (4 °C) auf eine definierte Proteinkonzentration von 2 µg/µl verdünnt, um in jedem Reaktionsansatz 40 µl Zellhomogenat (80 µg) vorlegen zu können. Die spezifische Deiodaseaktivität berechnet sich nämlich unter anderem aus der Proteinkonzentration. Hinzupipettiert wurden entweder 10 µl  $\text{H}_2\text{O}$  oder 10 µl PTU (10 mM), da PTU die  $\text{h5}'\text{DI}$ , aber nicht die  $\text{h5}'\text{DII}$ , irreversibel hemmt. Sämtliche Arbeitsschritte mit dem Zellhomogenat wurden auf Eis durchgeführt. Weiterhin war es nötig, den entsprechenden Blindwert ( $\text{cpm}_{\text{blind}}$ ), also die spontane Deiodierung ohne Deiodase, zu ermitteln. Hierzu wurden 50 µl Substratmix mit 10 µl  $\text{H}_2\text{O}$  inkubiert und das Zellhomogenat erst später nach Abstoppen der Reaktion zugegeben.

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Substratmix. Die Inkubationstemperatur lag bei 37 °C. Nach genau 60 min wurde die Reaktion durch 50 µl BSA/PTU-Lösung gestoppt. Die Proteine wurden mit 400 µl TCA (10 %; 4 °C) ausgefällt und bei 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Von dem Überstand wurden 480 µl auf *Dowex 50 WX-2*-Säulen gegeben, nachdem diese mit 5 ml 10 % (v/v) Essigsäure äquilibriert worden waren. Mit Hilfe von zweimal 1 ml 10 % (v/v) Essigsäure wurde das  $^{125}\text{I}$  in Plastikröhrchen eluiert und das Eluat im  $\gamma$ -Counter für 10 min ( $\text{cpm}_{\text{frei}}$ ) gemessen. Zum Schluß wurde nochmals zur Kontrolle die genaue Konzentration der Proteinverdünnung mit dem *Bio Rad Protein Assay* (vgl. 3.5.2.) bestimmt. Der Wert der maximalen Countzahl wurde bereits nach Aufreinigung des Tracers gewonnen ( $\text{cpm}_{100\%}$ ). Bei zu hohem Substratumsatz tritt eine Substratdepletion ein, die in der Endphase zu einer Reaktionsverlangsamung führt. Aus diesem Grund ist darauf zu achten, dass der Wert des [ $^{125}\text{I}$ ]-Release durch die Deiodasen ( $\text{cpm}_{\text{frei}}$ ) nicht über 10 % des Werts von  $\text{cpm}_{100\%}$  liegt.

### 3.6.4. Berechnung der spezifischen Enzymaktivität

Zur Berechnung der spezifischen Deiodaseaktivität gibt folgende Gleichung die freigesetzte Iodidmenge in fmol pro Minute und mg Protein wieder:

$$\text{Spezifische Deiodaseaktivität } \left[ \frac{\text{fmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \frac{2 \cdot \text{nmol } rT_3 \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot (\text{cpm}_{\text{frei}} - \text{cpm}_{\text{blind}})}{\text{cpm}_{100\%} \cdot \text{mg Protein} \cdot \text{min} \cdot \frac{480}{550}}$$

$\text{cpm}_{\text{frei}}$  =  $^{125}\text{I}$ -Freisetzung durch Deiodaseaktivität

$\text{cpm}_{\text{blind}}$  =  $^{125}\text{I}$ -Freisetzung durch nichtenzymatische Deiodierung

$\text{cpm}_{100\%}$  = theoretisch denkbare 100 %-ige  $^{125}\text{I}$ -Freisetzung in 50  $\mu\text{l}$  Substratmix

Da [ $^{125}\text{I}$ ]- $rT_3$  aufgrund der freien Drehbarkeit der Diphenyletherbindung entweder an 3'- oder 5'-Position radioaktiv markiert wird, muss in die mathematische Formel der Faktor 2 eingehen. Da die Menge an [ $^{125}\text{I}$ ]- $rT_3$  gegenüber  $rT_3$  verschwindend gering ist, wird dessen Konzentration nicht in die Berechnung einbezogen. Außerdem ist zu beachten, dass der  $rT_3$ -Wert nicht als Konzentration in die Formel eingesetzt wird, sondern als absolute Stoffmenge, in diesen Experimenten 0,1 nmol  $rT_3$ . Außerdem wird der Faktor 480/550 berücksichtigt, weil vom Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes (550  $\mu\text{l}$ ) nur 480  $\mu\text{l}$  auf die Dowex-Säulen aufgetragen wurden. Da die Ergebnisse bei Wiederholung der Experimente interexperimentelle Schwankungen aufwiesen, wurde nur die relative Deiodaseaktivität in Prozent ausgewertet.

### 3.7. Statistische Auswertung

Voraussetzung für eine Varianzanalyse (ANOVA) der Daten bei unabhängigen Stichproben ist eine Normalverteilung der Werte, die erst ab einer Fallzahl von ungefähr 30 Werten pro Gruppe sinnvoll getestet werden kann. Da in den vorliegenden Untersuchungen diese Menge an Fallzahlen nicht erreicht wurde, konnten in dieser Arbeit nur Rangsummentests zur Anwendung kommen. Diese Tests sortieren alle Werte in aufsteigender Reihenfolge und versehen sie mit Rangnummern. Für zwei unverbundene Stichproben steht der Mann-Whitney-U-Test zur Verfügung und für drei oder mehr unverbundene Stichproben der Kruskal-Wallis-Test. Nachteil der Rangsummentests ist, dass häufiger als beim t-Test die Nullhypothese beibehalten wird. Aussage der Nullhypothese ist, dass die getesteten Gruppen gleich sind.

Da bei mehrmaligem Testen einer Gruppe von Werten der  $\alpha$ -Fehler (Fehler 1. Art) ansteigt, ist es beim multiplen Testen eventuell ratsam, die Bonferroni-Korrektur einzuführen und jedem einzelnen Test die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha/k$  zugrunde zu legen, wobei k der Anzahl der Tests entspricht und  $\alpha$  als Fehler 1. Art normalerweise bei 5 % ( $p = 0,05$ ) liegt. Für  $k = 2$  muss folglich  $p < 0,025$ , für  $k = 3$  muss  $p < 0,0166$  und für  $k = 4$  muss  $p < 0,0125$  sein

---

und so weiter. Üblicherweise werden alle Werte mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant bezeichnet. Für Berechnungen, bei denen die Bonferroni-Korrektur zur Anwendung kam, wird dies gesondert vermerkt.

Für einen Teil der Daten wurde die Monte-Carlo-Signifikanz berechnet, die eine genauere Berechnung der Signifikanz durch Simulation der Verteilung darstellt. Da dies jedoch nur auf bestimmten Rechnern mit sehr großem Arbeitsspeicher (Rechenzentrum der Universität Würzburg) möglich ist, wurde für den Großteil der Daten die asymptotische Signifikanz als Näherung verwendet.

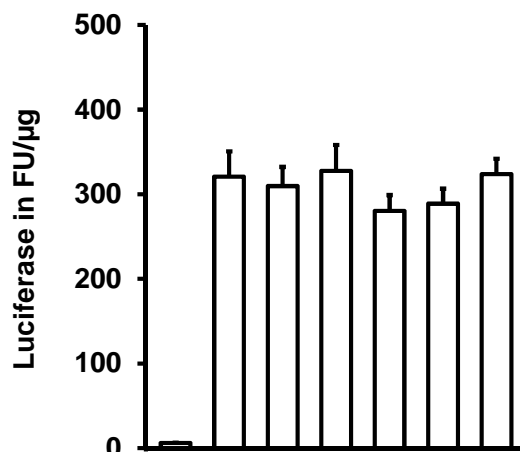
In den Graphiken kam standardmäßig die aus Triplikaten gewonnenen Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) zur Abbildung. Der Standardfehler des Mittelwertes ( $\sigma_{\bar{x}}$ ) gibt eine Schätzung der Genauigkeit des Mittelwerts wieder und ist somit ein Maß für die Variabilität des Mittelwertes. In den Graphiken sind die Standardfehler in Form von Fehlerbalken abgebildet (96).

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Wirkung von Steroidhormonen auf die h5'DI in HepG2-Zellen

#### 4.1.1. Analyse der Steroidregulation des h5'DI-Promoters im Luciferase-Assay

Da die Luciferase leichte Detektierbarkeit und lineare Werte über einen weiten Messbereich aufweist, kam anfänglich der Luciferase-Assay zum Einsatz, um die Wirkung von gonadalen Steroiden auf den Promoter der h5'DI zu untersuchen. Im Speziellen sollte eine frühe Primärantwort auf Steroidhormone mittels nukleärer Hormonrezeptoren nachgewiesen werden. Zur Verfügung standen verschiedene Reporter-genkonstrukte. Das längste dieser Fragmente besteht aus 2467 bp, während sich die kürzeren aus 1480 bp, 739 bp, 428 bp und 105 bp zusammensetzen.



**Abb. 8: Luciferase-Assay:** Transfektion von HepG2 mit pGL2h5'DIpr-1480 und Stimulation mit Steroiden. Zellen 24 h kultiviert, 24 h transfiziert und 24 h stimuliert; Steroide 50 nM; n = 1; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_x$ .

pGL2h5'DIpr-1480	-	+	+	+	+	+	+
R1881	-	-	+	-	-	-	-
DHT	-	-	-	+	-	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	-	-
P	-	-	-	-	-	+	-
Dex	-	-	-	-	-	-	+

HepG2-Zellen wurden mit dem 1480 bp großen Promoter-Reporter-genkonstrukt pGL2h5'DIpr-1480 transfiziert. Um eine mögliche estrogenähnliche Wirkung von Phenolrot auszuschließen, wurde phenolrotfreies Medium verwendet. Für die Stimulation wurden die Zellen mit Testosteron (T), Methyltrienolon (R1881), 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT), 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>), Progesteron (P) und Dexamethason (Dex) behandelt. Die Steroide wurden in



einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Nach Messung und Berechnung der Luciferaseaktivität wurden die Triplikate anhand des Mittelwertes und des Standardfehlers des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ ) ausgewertet. Wenngleich in Triplikaten gemessen wurde, ist aufgrund der hohen Gruppenzahl und der geringen Fallzahlen eine sinnvolle statistische Testung dieser Ergebnisse nicht möglich. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 veranschaulicht. Sie zeigen, dass Steroide keinen Effekt auf die Promoteraktivität der h5'DI haben.

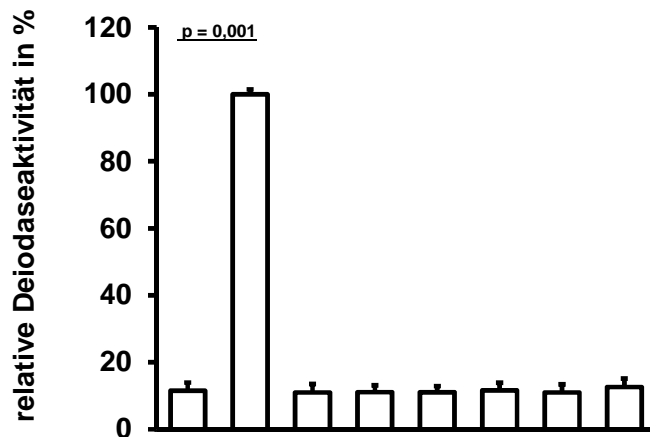
Da B. Mentrup in ihren Versuchen beobachten konnte, dass das leere Luciferase-Expressionsplasmid pGL2basic durch R1881 reguliert wird, wurde zur Wirkung der gonadalen Steroide von weiteren Experimenten mit dem Luciferase-Assay abgesehen (110).

#### **4.1.2. Analyse der Steroidregulation der h5'DI im Deiodase-Assay**

Im folgenden wurde deshalb nur anhand des Deiodase-Assays untersucht, ob die h5'DI die Zugabe von Steroidhormonen mit einem stimulatorischen Effekt beantwortet.

##### **4.1.2.1. Untersuchung der Steroidstimulation der h5'DI-Enzymaktivität in HepG2 ohne Selen**

Um zu testen, ob sich eine Steroidregulation unter Selendefizienz hierarchisch behaupten kann, wurde die Stimulation mit Steroiden ohne Supplementation von Selen versucht. HepG2-Zellen wurde für 24 h und 72 h mit jeweils 50 nM T, R1881, DHT, E<sub>2</sub>, P oder Dex stimuliert. Zur Kontrolle wurde die Selendefizienz durch Zugabe von 100 nM Selen aufgehoben. Da sich kein zeitabhängiger Steroideffekt einstellte, wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen Stimulationszeiten zusammengefasst und ausgewertet. Die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ ) wurden nicht aus den spezifischen Enzymaktivitäten [fmol/mg/min], sondern aus den relativen Aktivitäten in Prozent [%] berechnet. Wie Abb. 9 zeigt, ist das Ergebnis ein mangelnder Effekt von Steroiden auf die Enzymaktivität. Der Wert der relativen Kontrollaktivität ohne Selen beträgt ( $11,5 \pm 2,4$ ) % in Bezug auf die mit Selen ( $100,0 \pm 1,5$ ) %. Diese Ergebnisse sind im Kruskal-Wallis-Test unter Berechnung der Monte-Carlo-Signifikanz signifikant unterschiedlich ( $p = 0,001$ ).



**Abb. 9: Deiodase-Assay:**  
 Stimulation von HepG2-Zellen mit Steroiden ohne Selen. Stimulationsdauer 24 h - 72 h; Steroide 50 nM, Natriumselenit 100 nM; n=2; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ .

Selen	-	+	-	-	-	-	-	-
T	-	-	+	-	-	-	-	-
R1881	-	-	-	+	-	-	-	-
DHT	-	-	-	-	+	-	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	+	-	-
P	-	-	-	-	-	-	+	-
Dex	-	-	-	-	-	-	-	+

#### 4.1.2.2. Untersuchung der Steroidstimulation der h5'DI-Enzymaktivität in HepG2 mit Selen

Da Deiodasen Selenoproteine sind, ist deren Enzymaktivität vom supplementierten Selen abhängig. Erst wurde nur das Stimulationsmedium, später aber auch das Kulturmedium mit 100 nM Selen supplementiert. Die Zellen wurden für genau 48 h mit T, R1881, DHT, E<sub>2</sub> und Dex in einer Konzentration von 50 nM inkubiert und anschließend die Deiodaseaktivität bestimmt. In Abb. 10a sieht man, dass die Steroidhormongabe trotz Selensupplementation keinen stimulatorischen Effekt hat. Der leicht inhibitorische Effekt von R1881, (93,0 ± 3,1) %, stellt im Mann-Whitney-U-Test ein vermeintlich statistisch signifikantes Ergebnis dar (p = 0,018), doch liegt das Signifikanzniveau nach 5-maligem Testen unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur bei p < 0,01.

#### 4.1.2.3. T<sub>3</sub>-Stimulation im Deiodase-Assay und Kostimulation mit Steroiden

In die eben gezeigten Experimente wurde als Positivkontrolle zusätzlich die Stimulation von HepG2 mit 3 nM T<sub>3</sub> aufgenommen, um die potentielle Stimulierbarkeit des Systems zu testen. Gleichzeitig wurde mit Steroiden kostimuliert, um zu prüfen, ob dies einen synergistischen Effekt hat. Getestet wurden 50 nM R1881 bzw. E<sub>2</sub>.

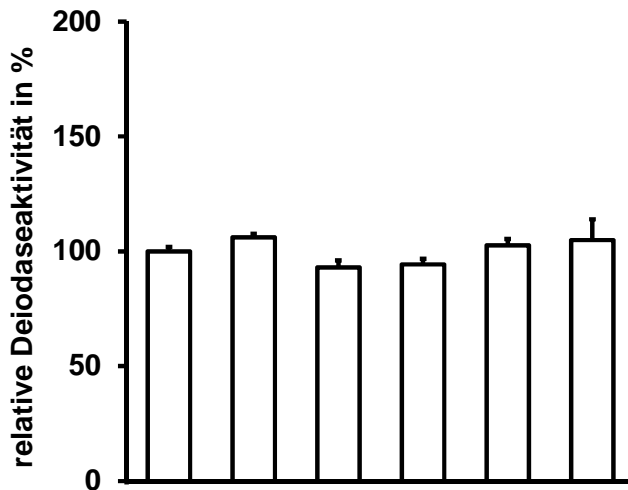


Abb. 10a: Deiodase-Assay: Stimulation von HepG2-Zellen mit Steroiden und Selen. Stimulationsdauer 48 h; Steroide 50 nM, Selen 100 nM; n=1-5; ns; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ .

Selen	+	+	+	+	+	+
T	-	+	-	-	-	-
R1881	-	-	+	-	-	-
DHT	-	-	-	+	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	-
Dex	-	-	-	-	-	+

Abb. 10b zeigt die Ergebnisse dieser T<sub>3</sub>-Stimulation, die zu einem Anstieg der h5'DI-Enzymaktivität ausgehend von (100,0 ± 1,9) % auf (187,8 ± 4,4) % führt. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant gegenüber dem Kontrollwert (p < 0,001). Die zusätzliche Kostimulation mit Steroiden verändert jedoch nicht die T<sub>3</sub>-Responsivität (p = 0,008) bzw. (p < 0,001).

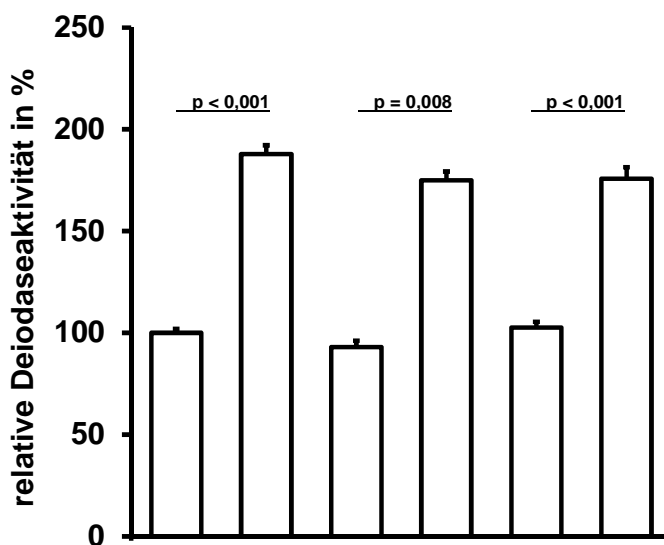
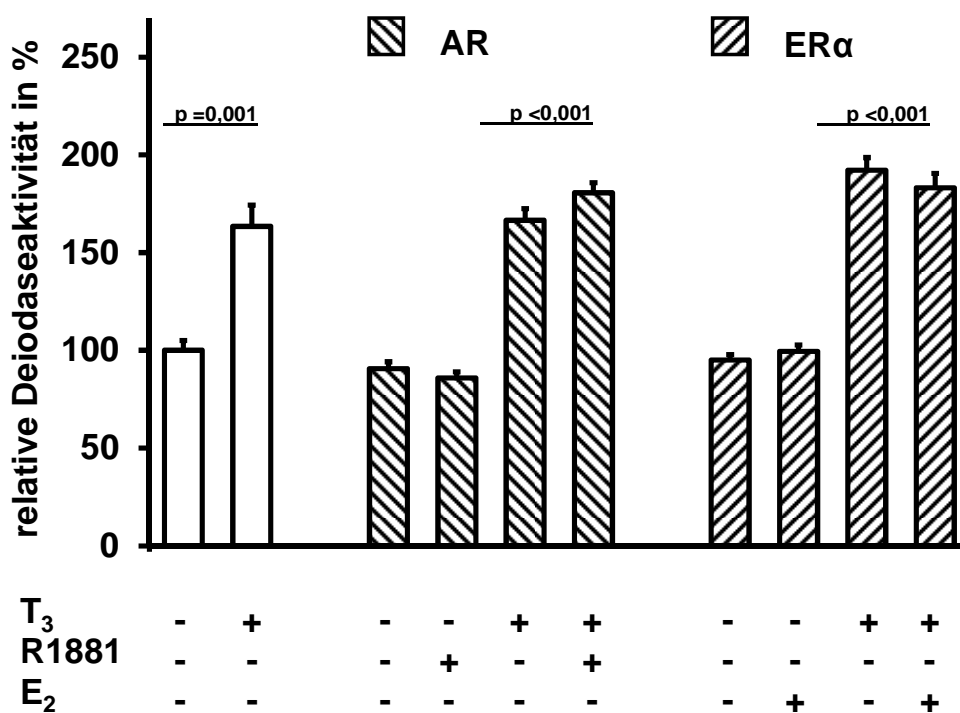


Abb. 10b: Deiodase-Assay: Stimulation von HepG2-Zellen mit Steroiden, T<sub>3</sub> und Selen. Stimulationsdauer 48 h; Steroide 50 nM, T<sub>3</sub> 3 nM, Selen 100 nM; n=1-8; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ .

Selen	+	+	+	+	+	+
T <sub>3</sub>	-	+	-	+	-	+
R1881	-	-	+	+	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	+

**4.1.2.4. Transfektion von HepG2 mit AR und ER $\alpha$ , Steroidstimulation und Bestimmung der h5'DI-Enzymaktivität**

Da nukleäre Hormonrezeptoren die Wirkung von Steroiden vermitteln, wurde untersucht, ob die zusätzliche Kotransfektion des Androgenrezeptor-Expressionsplasmids pSVAR0 bzw. des Estrogenrezeptor-Expressionsplasmids pSG5HEO einen Einfluss auf die Steroidstimulation hat. Wie in den Experimenten zuvor wurde mit R1881 respektive E<sub>2</sub> stimuliert und die Enzymaktivität als Positivkontrolle mit T<sub>3</sub> induziert. Als Kontrolle wurde die Enzymaktivität von Zellen bestimmt, die mit pBS transfiziert worden waren.



**Abb. 11: Deiodase-Assay:**  
 Transfektion von HepG2 mit AR und ER $\alpha$ , Steroidstimulation und Bestimmung der h5'DI-Enzymaktivität. Zellen 48 h kultiviert, 24 h transfiziert und 48 h stimuliert; Steroidstimulation mit R1881 bzw. 17 $\beta$ -Estradiol 50 nM und T<sub>3</sub> 3 nM; Selen 100 nM; n=3-8; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ .

In Abb. 11 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefasst. Man sieht, dass auf die Transfektion von AR bzw. ER $\alpha$  keine Änderung der Enzymaktivität folgt. Die zusätzliche Stimulation mit den Steroiden R1881 bzw. E<sub>2</sub> hat keinen weiteren Effekt. Auch hier zeigt eine Kostimulation mit Steroiden keine synergistische Wirkung auf die T<sub>3</sub>-Responsivität der h5'DI. T<sub>3</sub> induziert die Enzymaktivität um 163,4 %, was im Kruskal-Wallis-Test statistisch signifikant war (p = 0,001). Die T<sub>3</sub>-Stimulation nach Transfektion von AR bzw. ER $\alpha$  führt zu einer vergleichbaren Induktion der Enzymaktivität um 199,2 % bzw. 202,3 %. Die

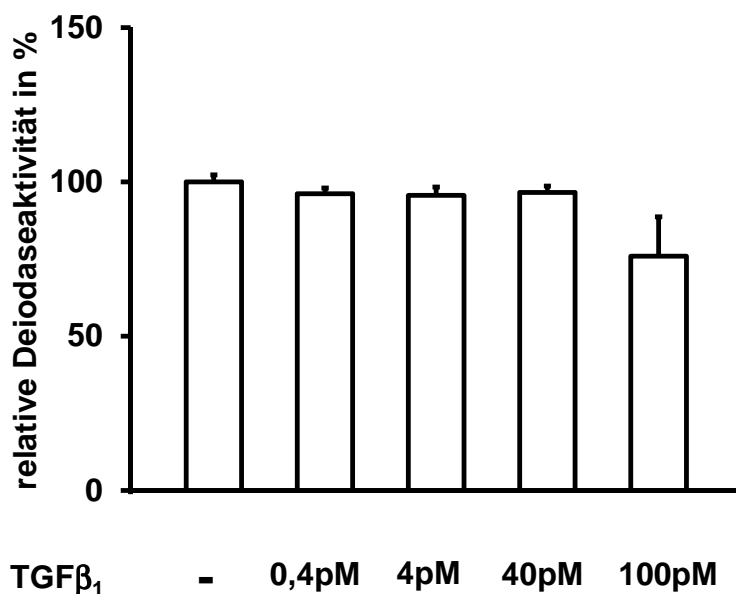
Kostimulation von AR mit R1881 und  $T_3$  bzw. von  $ER\alpha$  mit  $E_2$  und  $T_3$  führt zu einer Induktion der Enzymaktivität um 193,9 % bzw. 184,1 %.

## 4.2. Überprüfung der $TGF\beta_1$ -Responsivität der $h5'DI$ in HepG2-Zellen

Die Frage, welchen Einfluss  $TGF\beta_1$  auf die  $h5'DI$  ausübt, stellt sich im Rahmen der Pathophysiologie des „*Low  $T_3$  Syndrome*‘s“. In diesem Zusammenhang wurde auch der inhibitorische Effekt von  $TGF\beta_1$  auf die SePP-Promoteraktivität im Luciferase-Assay überprüft, um zum einen die biologische Aktivität von  $TGF\beta_1$  zu testen und zum anderen eventuelle systematische Fehler in der Durchführung von Transfektionen oder der Anwendung des Luciferase-Assays epikritisch abgrenzen zu können.

### 4.2.1. Untersuchung der Regulation der $h5'DI$ im Deiodase-Assay durch $TGF\beta_1$

HepG2-Zellen wurden mit 100 nM Selen kultiviert und mit 0,4 pM, 4 pM, 40 pM und 100 pM  $TGF\beta_1$  für die Dauer von 48 h stimuliert. Anschließend wurde die Enzymaktivität der  $h5'DI$  bestimmt.



**Abb. 12: Deiodase-Assay:** Stimulation von HepG2-Zellen mit  $TGF\beta_1$  und Bestimmung der  $h5'DI$ -Enzymaktivität. Zellen 48 h mit 0,4 pM, 4 pM, 40 pM und 100 pM  $TGF\beta_1$  stimuliert; Selen 100 nM; n=1-3; ns; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_x$ .

Trotz leichter Hemmung der  $h5'DI$ -Enzymaktivität unter 100 pM  $TGF\beta_1$  ( $75,9 \pm 12,8$ ) % weisen die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 12, im Kruskal-Wallis-Test, unter Berechnung der Monte-Carlo-Signifikanz, keinen statistisch signifikanten Unterschied auf ( $p = 0,48$ ).

### 4.2.2. Kontrolle von TGFβ<sub>1</sub> anhand des SePP-Promoters im Luciferase-Assay

#### 4.2.2.1. Transfektion von HepG2 mit pBK15SePPpr-1800

Die biologische Aktivität von TGFβ<sub>1</sub> wurde anhand des SePP-Promoters im Luciferase-Assays überprüft.

Die Stimulation mit 100 pM TGFβ<sub>1</sub> führt zu einer Hemmung der Promoteraktivität von SePP ausgehend von (2598,2 ± 120,0) FU/μg auf (1303,1 ± 67,1) FU/μg. Dies entspricht einer Inhibition auf 50,2 %, wie in Abb. 13a zu sehen ist, wobei das Signifikanzniveau aber knapp verpasst wurde (p = 0,05).

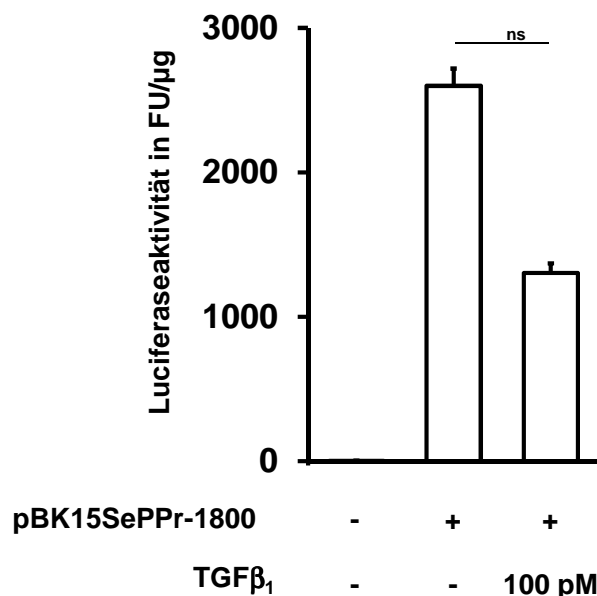


Abb. 13a: Luciferase-Assay: Transfektion von HepG2 mit pBK15SePPpr-1800 und Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub>. Zellen 24 h kultiviert, 24 h transfiziert und 24 h stimuliert; TGFβ<sub>1</sub> 100 pM; n=1; ns; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_x$ .

Bei Wiederholung des Versuches wurde der SePP-Promoter mit nur 4 pM TGFβ<sub>1</sub> stimuliert. Wie Abb. 13b zeigt, reduziert diese TGFβ<sub>1</sub>-Konzentration die SePP-Promoteraktivität immer noch von (1275,5 ± 138,6) FU/μg auf (851,9 ± 148,1) FU/μg, also auf 66,8 %. Trotz dieser beachtlichen Hemmung ist dieser Wert aufgrund n = 1 statistisch nicht signifikant (p = 0,127).

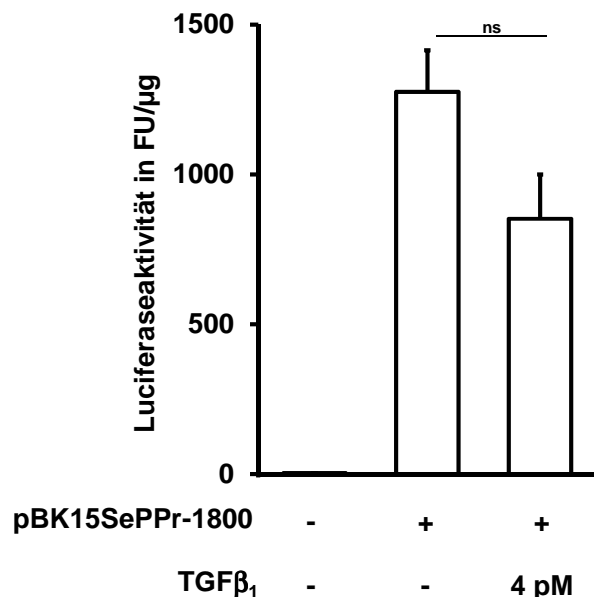


Abb. 13b: Luciferase-Assay: Transfektion von HepG2 mit pBK15SePPr-1800 und Stimulation mit TGFβ<sub>1</sub>. Zellen 24 h kultiviert, 24 h transfiziert und 24 h stimuliert; TGFβ<sub>1</sub> 4 pM; n=1; ns; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ .

### 4.3. Überprüfung möglicher GH-Effekte auf die h5'DI in HepG2

Um zu klären, ob die unter intensivmedizinischer Behandlung oder während Substitutionstherapie mit GH beobachteten Auswirkungen auf die freien Schilddrüsenhormonkonzentrationen durch die Wirkung von GH auf die h5'DI-Aktivität verursacht sein könnten, wurde der Einfluss von GH auf die Promoter- und Enzymaktivität der h5'DI in HepG2-Zellen untersucht.

#### 4.3.1. Untersuchung der GH-Regulation des h5'DI-Promoters im Luciferase-Assay

Zur Überprüfung der GH-Wirkung wurde zuerst der Luciferase-Assay angewandt. HepG2-Zellen wurden mit pGL2h5'DIpr-2467 transfiziert und hernach für die Dauer von 48 h alle 12 h mit 400 ng/ml GH stimuliert. Verwendet wurde zum einen das für HepG2-Zellen übliche Medium DMEM F12 zum anderen wurde der Einfluss des „High-glucose-medium“ (HG) DMEM-4500mg/l-D-Glucose getestet. Im Unterschied zu DMEM F12 beinhaltet dieses 1349 mg/l D-Glucose mehr.

In Abb. 14 ist zu sehen, dass GH weder alleine noch in Kombination mit T<sub>3</sub> einen nennenswerten Effekt auf die h5'DI-Luciferaseaktivität hat. Unter Verwendung von DMEM-4500mg/l-D-Glucose ist die basale Promoteraktivität zwar erhöht, ein GH-Effekt lässt sich aber auch hier nicht abgrenzen. T<sub>3</sub> zeigt ohne die zusätzliche Kotransfektion von TRβ nicht die gewünschte Responsivität des Promoters der h5'DI. Des mangelnden Effekts

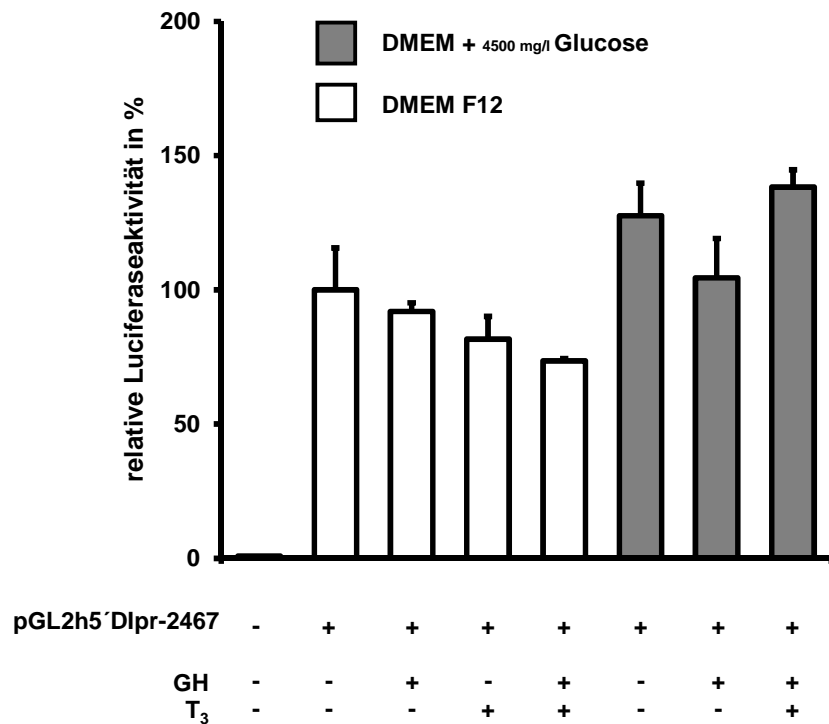


Abb. 14: Luciferase-Assay: Transfektion von HepG2 mit pGL2h5'DIpr-2467 und Stimulation mit GH bzw. T<sub>3</sub>. Zellen 24 h kultiviert, 24 h transfiziert und über einen Zeitraum von 48 h alle 12 h mit 400 ng/ml GH stimuliert; 3 nM T<sub>3</sub>; DMEM F12 oder DMEM 4500mg/l D-Glucose + 1 mM Pyruvat + 2 mM Glutamin; 1 % [v/v] Proteaseinhibitor Aprotinin und 0,1 % [w/v] BSA; n = 1; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_x$ .

wegen wurde auf weitere Experimente hierzu verzichtet. Eine statistische Testung war aufgrund der geringen Fallzahl nicht sinnvoll.

### 4.3.2. Untersuchung der GH-Regulation der h5'DI im Deiodase-Assay

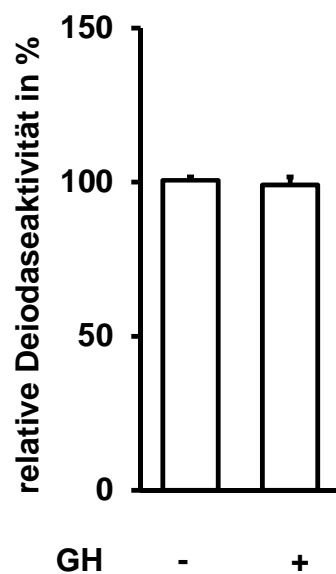
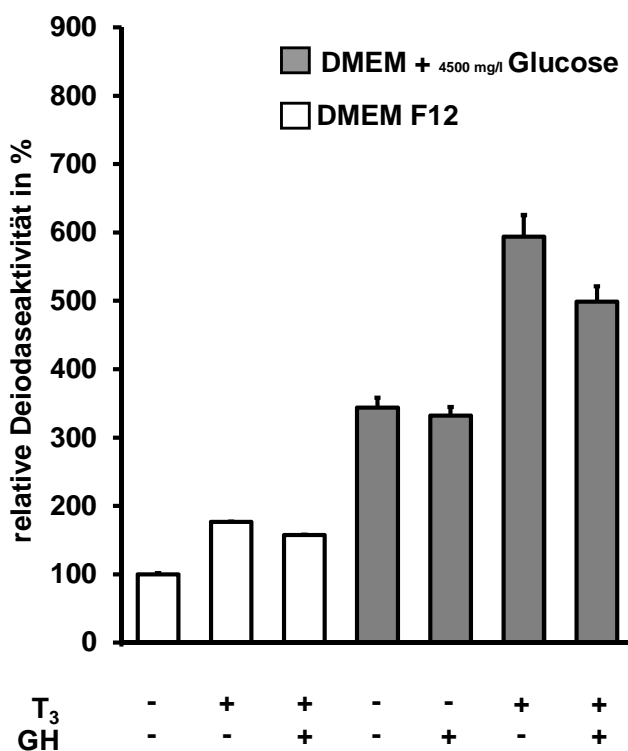


Abb. 15: Deiodase-Assay: Stimulation von HepG2-Zellen mit GH und Bestimmung der h5'DI-Enzymaktivität. Zellen 48 h mit einmalig 240 ng/ml GH stimuliert; Selen 100 nM; n=1; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_x$ .



In einem anderen Versuch wurden HepG2-Zellen im Deiodase-Assay auf ihre GH-Responsivität überprüft. Dazu wurden die Zellen einmalig mit 240 ng/ml GH stimuliert und nach 48 h die Enzymaktivität im Deiodase-Assay bestimmt. Eine Änderung der Enzymaktivität ließ sich nicht beobachten (Abb. 15).

In einem weiteren Experiment wurde die Konzentration von GH auf 400 ng/ml erhöht und über 48 h alle 12 h weitere 400 ng/ml GH zugegeben. In einem Teil des Ansatzes wurde ebenfalls das „High-glucose-medium“ (HG) DMEM 4500mg/l D-Glucose im Deiodase-Assay getestet.



**Abb. 16: Deiodase-Assay:** Stimulation von HepG2-Zellen mit GH und/oder T<sub>3</sub> und Bestimmung der h<sup>5</sup>DI-Enzymaktivität. Zellen über einen Zeitraum von 48 h alle 12 h mit 400 ng/ml GH stimuliert; 3 nM T<sub>3</sub>; Selen 100 nM; DMEM F12; DMEM 4500mg/l D-Glucose mit 1 mM Pyruvat und 2 mM Glutamin; 1 % [v/v] Proteaseinhibitor Aprotinin und 0,1 % [w/v] BSA; n=1; Kruskal-Wallis-Test: p < 0,001; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_x$ .

Abb. 16 zeigt die Deiodaseaktivität zum einen unter dem Einfluss von DMEM F12 und zum anderen unter DMEM 4500mg/l D-Glucose. Da T<sub>3</sub> die 5'DI hochreguliert, wurde, um eine unphysiologische T<sub>3</sub>-Depletion zu vermeiden, primär mit T<sub>3</sub> kostimuliert. Auffällig ist die hohe Deiodaseaktivität unter DMEM 4500mg/l D-Glucose. Jedoch ist kein direkter Einfluss von GH unter Kostimulation von T<sub>3</sub> auf die h<sup>5</sup>DI-Enzymaktivität zu beobachten, unabhängig ob DMEM F12 oder DMEM-4500mg/l-D-Glucose verwendet wurde. Der Einsatz von DMEM 4500mg/l D-Glucose zeigt hingegen eine deutliche Zunahme der h<sup>5</sup>DI-Aktivität von (100,0 ± 1,6) % auf (343,8 ± 14,6) %. Diese Steigerung hat auch unter T<sub>3</sub>-Stimulation (362,1 %) sowie unter Kostimulation von GH und T<sub>3</sub> (317,2 %) Bestand (Abb. 16). Somit lässt sich kein GH-spezifischer Effekt vermerken sondern einzig eine Steigerung der

Enzymaktivität der h5'DI durch DMEM 4500mg/l D-Glucose, die im Kruskal-Wallis-Test, unter Berechnung der Monte-Carlo-Signifikanz, mit  $p < 0,001$  statistisch signifikant ist. Die Einzelvergleiche im Mann-Whitney-U-Test waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Frage, die sich aufgrund dieser Ergebnisse stellt, ist, ob es sich dabei um eine direkte Wirkung von Glucose auf die h5'DI handelt, da DMEM 4500mg/l D-Glucose 1349 mg/l D-Glucose mehr beinhaltet als DMEM F12, oder ob dies durch einen unspezifischen anabolen Effekt von DMEM 4500mg/l D-Glucose und dessen Inhaltsstoffen bedingt ist.

### 4.3.3. Analyse der Wirkung von Glutamin, Glucose und Pyruvat auf die h5'DI

Um zu überprüfen, ob Glucose oder einer der anderen Inhaltsstoffe von DMEM 4500mg/l D-Glucose zu der beobachteten Induktion der Enzymaktivität führt, wurde die Wirkung von 1349 mg/l D-Glucose, 2 mM Glutamin bzw. 1 mM Pyruvat auf die h5'DI im Deiodase-Assay überprüft. Die Glucose-Differenz zwischen DMEM 4500mg/l D-Glucose und DMEM F12 beträgt 1349 mg/l D-Glucose. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 zu sehen. Es kann weder ein stimulatorischer Effekt beobachtet noch ein signifikantes Ergebnis im Kruskal-Wallis-Test ( $p = 0,71$ ) nachgewiesen werden.

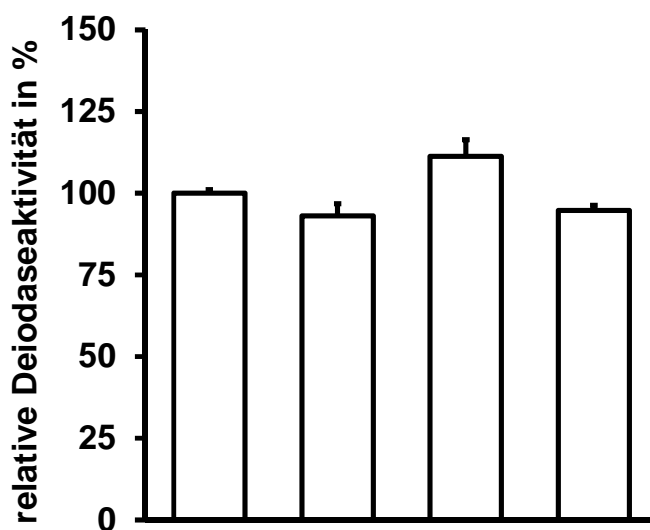


Abb. 17: Deiodase-Assay: Stimulation von HepG2-Zellen mit Glucose, Glutamin bzw. Pyruvat und Bestimmung der h5'DI-Enzymaktivität. Zellen 48 h mit 1349 mg/l D-Glucose, 2 mM Glutamin bzw. 1 mM Pyruvat stimuliert; Selen 100 nM; n=1-3; ns; Abbildung von  $\bar{x} \pm \sigma_x$ .

Glucose	-	+	-	-
Glutamin	-	-	+	-
Pyruvat	-	-	-	+

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Bedeutung der h5'DI und Diskussion der angewandten Methoden

Die Konzeption dieser Arbeit zielt auf die Frage, ob sich eine geschlechtsspezifische Expression der 5'DI auch im humanen Zellkulturmodell nachweisen lässt, oder ob die h5'DI anderweitig durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> oder GH reguliert wird. Obwohl nun nach Vorliegen der Ergebnisse die Diskussion derselben im Mittelpunkt der Betrachtung stehen sollte, muss zuallererst die Bedeutung der h5'DI sowie der angewandten Methoden kritische Bemerkung finden.

Bislang wurde vermutet, dass die 5'DI für den Großteil der peripheren Konversion von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub> verantwortlich ist und entscheidend am Abbau von rT<sub>3</sub> beteiligt ist (59). T<sub>3</sub> kann extrathyroidal sowohl durch die 5'DI als auch 5'DII generiert werden. Welcher quantitative Anteil des Plasma-T<sub>3</sub>'s durch die 5'DI in Abgrenzung zur 5'DII erzeugt wird, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden (6) (7) (10) (27).

Im Menschen wurde, unter Berücksichtigung der hohen 5'DI-Aktivität in der Leber und in Anbetracht der Größe dieses Organs, der Anteil der 5'DI an der Generierung des Plasma-T<sub>3</sub>-Spiegels auf 20 - 60 % geschätzt (6). Die Hemmung der h5'DI durch PTU in primär hypothyreoten und mit T<sub>4</sub>-substituierten Individuen führt zu einer Senkung der totalen Plasma-T<sub>3</sub>-Konzentration um 20 - 30 %. Diese Werte müssen jedoch nicht zwangsläufig den 5'DI-Anteil an der T<sub>3</sub>-Produktion widerspiegeln, da sowohl inadäquate PTU-Hemmung als auch verminderte T<sub>3</sub>-Clearance durch die 5-Deiodaseaktivität der 5'DI nicht ausgeschlossen werden können (95). Auch in Tracer-Studien, deren Zweck die Bestimmung der genauen Kompartimentierung der extrathyroidalen T<sub>3</sub>-Produktion gewesen war, schwankten die durch die h5'DI erzeugten T<sub>3</sub>-Spiegel zwischen 81 % und 15 % in Abhängigkeit von den getroffenen Annahmen (97).

Tierexperimentell ergaben Untersuchungen im C3H-Mausstamm, dass dort sowohl die 5'DI-Enzymaktivität als auch die entsprechende mRNA-Konzentration auf 10 % derer von normalen C57-Mäusen reduziert sind. Trotz der niedrigen 5'DI-Enzymaktivität zeigen diese Tiere phänotypisch normale Serum-T<sub>3</sub>-Konzentrationen (98).

Der Sec-spezifische-tRNA-Knockout in der Leber von Mäusen (Alb-Cre, Trsp<sup>fl/fl</sup>), der den Einbau von Sec in Proteine verhindert, führt zur Hemmung der Expression aller hepatischen

Selenoenzyme einschließlich der 5'DI. Die 5'DI-Aktivität wird so um mehr als 90 % reduziert. Es lassen sich keine veränderten Schilddrüsenhormonspiegel beobachten; T<sub>3</sub>-, T<sub>4</sub>- und TSH-Werte sind im Normbereich. In Niere, BAT, Skelettmuskulatur, Herz und Gehirn ist die Aktivität der 5'DI und 5'DII nicht kompensatorisch erhöht (27).

Der systemische 5'DI-Knockout in Mäusen (Dio1-KO) hingegen weist zwar erhöhte T<sub>4</sub>- und rT<sub>3</sub>-Werte auf, T<sub>3</sub>- und TSH-Spiegel sind aber normal. Deshalb scheint die 5'DI für die Aufrechterhaltung des Plasma-T<sub>3</sub>-Spiegels nicht erforderlich zu sein. Dazu sollte jedoch ausgeschlossen sein, dass mittels 5'DII vermehrt T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub> konvertiert wird, und/oder die Clearance von T<sub>3</sub> mittels 5DIII vermindert ist. Die 5'DII-Aktivität war in Hypophyse, Gehirn und Haut nicht kompensatorisch erhöht. Die 5'DII-Aktivität im BAT wurde allerdings nicht bestimmt. Was die 5DIII angeht, so ist die 5-Deiodase-Aktivität in der Leber im Dio1-KO nicht kompensatorisch erniedrigt. Gleichwohl sind ca. 70 % der hepatischen 5-Deiodase-Aktivität im Wildtyp PTU-sensitiv und somit von der 5'DI abhängig. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass diese 70 %-ige Reduktion der 5-Deiodase-Aktivität im Dio1-KO einen Einfluss auf die Clearance von T<sub>3</sub> hat (10).

Unabhängig davon scheint die 5'DI, was die systemische Versorgung mit extrathyroidal generiertem T<sub>3</sub> angeht, somit in Tieren von untergeordneter Bedeutung zu sein. Gleichzeitig aber deutet der Dio1-KO möglicherweise auf eine weitere wichtige Funktion der 5'DI hin. Leber und Niere sind Ausscheidungsorgane. Da die 5'DI sehr stark in beiden Organen exprimiert wird und THs durch dieses Enzym auch inaktiviert werden, sollte es nicht verwundern, dass im Dio1-KO die Ausscheidung von TH-Metaboliten in Fäzes und Urin verändert ist. In Wildtyp-Mäusen erschien annähernd gleichviel <sup>125</sup>I einer applizierten <sup>125</sup>I-markierten T<sub>4</sub>-Dosis in Fäzes und Urin. Dio1-KO-Tiere zeigten eine um 30 % reduzierte Ausscheidung von <sup>125</sup>I im Urin, gleichzeitig war die Ausscheidung von <sup>125</sup>I in Fäzes um diese Differenz erhöht. Im Urin wurden wenigstens 98 % des <sup>125</sup>I als anorganisches Iodid ausgeschieden, während das im Tierkot gemessene <sup>125</sup>I organisches Iodid war. Mit einer [<sup>125</sup>I]-markierten T<sub>3</sub>-Dosis verhielt es sich ähnlich. Bei genauerer Untersuchung der Fäzes stellte sich heraus, dass T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> im Kot der Dio1-KO-Tiere zwei- bzw. dreifach und rT<sub>3</sub> und 3,3'-T<sub>2</sub> sogar um den Faktor fünf erhöht waren.

Vermutlich ist die 5'DI in Mäusen nicht unwesentlich am Abbau der THs beteiligt. Gerade bei Ioddefizienz könnte dieser Zusammenhang dazu führen, dass im Urin ausgeschiedenes Iodid im tubulären System der Niere rückresorbiert wird und die Niere so einem Iodmangel entgegenwirken kann (10).

Gerade auch unter Berücksichtigung der Substratpräferenz scheint eine solche Funktion der 5'DI wahrscheinlich. Die Sulfatierung der Iodthyronine erhöht die Bevorzugung durch die 5'DI.

So weist die 5'DI für IRD und ORD von  $T_4$  nahezu gleiche  $V_{\max}/K_m$ -Quotienten auf. Durch Sulfatierung von  $T_4$  wird dieser Quotient für IRD um den Faktor 200 erhöht (6).

Die Sulfatierung von  $T_3$  führt ebenfalls zur vermehrten IRD durch die 5'DI, dennoch bleibt die Präferenz der 5'DI für  $T_3S$  hinter der für  $rT_3$  und  $rT_3S$  zurück (6) (27). Bei diesen Überlegungen gilt es zu berücksichtigen, dass die *in vitro* eingesetzten Dithiole nicht den physiologischen Effektoren entsprechen, zumal das Vorhandensein solcher *in vivo* bezweifelt wird und die Neusynthese des Enzyms wichtiger zu sein scheint.

Außerdem scheint die 5'DI zu einem nicht gerade unerheblichen Teil  $T_3$  vor allem in hyperthyreoten Zuständen zu inaktivieren, da die Behandlung von Dio1-KO-Tieren mit  $T_3$  im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zu erhöhten  $T_3$ -Werten und einem Anstieg der Expression  $T_3$ -responsiver Gene führt. Somit scheint die 5'DI einen gewissen Schutzmechanismus gegen Hyperthyreose darzustellen (133).

Die Frage nach den mutmaßlichen Ressourcen des Plasma- $T_3$ -Spiegels beantwortet möglicherweise der systemische 5'DII-Knockout in Mäusen (Dio2-KO) (28). Womöglich sind Thyroidea und 5'DII maßgebliche Quellen der Plasma- $T_3$ -Konzentration, wohingegen die 5'DI eine untergeordnete Rolle spielt und vornehmlich die systemische Clearance von THs in den Ausscheidungsorganen Leber und Niere katalysiert. Denn im Dio2-KO wurden zwar normale  $T_3$ -Werte, dafür aber zweifach erhöhte TSH-Spiegel gemessen. Der  $T_4$ -Spiegel ist um 40 % erhöht. Dies wurde initial als Schilddrüsenhormonresistenz der Hypophyse interpretiert. Gegebenenfalls entsprechen diese Veränderungen aber vielmehr dem Bild einer subklinischen Hypothyreose, wobei die Schilddrüse den peripheren Ausfall der  $T_4$ -Konversion durch eine vermehrte  $T_3$ -Sekretion unter TSH-Kontrolle im Dio2-KO zu kompensieren vermag. Der  $T_4$ -Spiegel steigt im 5'DII-KO möglicherweise aufgrund mangelnder  $T_4$ - zu  $T_3$ -Konversion durch die 5'DII. Auch wenn die 5'DI-Aktivität in Leber und Thyroidea nicht kompensatorisch erhöht ist, muss im Auge behalten werden, dass dieses Enzym auf das erhöhte Substratangebot mit einer gesteigerten  $T_3$ -Produktion reagieren könnte.

Aus diesen Experimenten wurde abgeleitet, dass die 5'DII nicht ganz unerheblich an der Generierung des Plasma- $T_3$ -Spiegels beteiligt ist. Zumal auch gezeigt werden konnte, dass die 5'DII in euthyreoten neonatalen Mäusen ein prädominanter und in hypothyreoten neonatalen Mäusen der einzige Mechanismus der extrathyroidalen  $T_3$ -Bildung ist (28). Letztlich kann

jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den in transgenen Tieren oder anderweitig beobachteten Phänomenen um reaktive kompensatorische Regulationsmechanismen handelt, die nicht zwangsläufig funktionelle Verhältnisse unter physiologischen Bedingungen darstellen (99). Außerdem können Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien nicht direkt auf den Menschen übertragen werden.

Welche Rolle auch immer die h5'DI im Metabolismus der Schilddrüsenhormone spielen mag, im Tiermodell wird die 5'DI geschlechtsspezifisch maßgeblich in der Leber reguliert (71). Deshalb wurden die Experimente in einer von menschlichen Hepatozyten abgeleiteten Zelllinie durchgeführt.

Mit der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 steht ein experimentelles Modell zur Verfügung, das sich bevorzugt zur Erforschung der Regulation der h5'DI eignet. Diese Zelllinie exprimiert zum einen hinreichend die h5'DI und kann zum anderen gleichzeitig unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden. Diese Bedingungen müssen insofern erfüllt sein, da eine Kultur unter serumfreien Bedingungen eine Untersuchung von Hormoneffekten überhaupt erst möglich macht. Die meisten Zelllinien können nur unter Zugabe von fetalem Kälberserum kultiviert bzw. stimuliert werden, was aber Hormone in praktisch unbestimmbarer Anzahl und Konzentration enthält und damit die Ergebnisse per se beeinflusst (100).

Bei HepG2 handelt es sich um eine gut differenzierte humane Hepatokarzinomzelllinie, die funktionelle TRs in geringen Mengen exprimiert (101). Doch gerade da es sich bei HepG2-Zellen um eine hepatozelluläre Karzinomzelllinie handelt, ist es interessant, auf eine Arbeit von P.M. Yen zu verweisen, der in der hepatozellulären Überexpression einer dominant negativen Mutation (NCoRi) des Korepressors NCoR eine vermehrte Proliferation von Hepatozyten zeigen konnte (102). Dem mutierten Korepressor NCoRi fehlt die aminoterminalere Repressionsdomäne. In transgenen Mäusen, die NCoRi in der Leber überexprimieren, wurde eine Zunahme der Zellproliferation mit einer Steigerung der Expression Zellzyklus-abhängiger Gene beobachtet. Zu diesen Genen gehören Alphafetoprotein, MAP-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1), Cyclin A2 und Retinoblastoma (Rb). Daraus wurde gefolgert, dass NCoR direkte und indirekte Effekte auf diverse Signalkaskaden hat, die die hepatozelluläre Proliferation beeinflussen. Da diese Zellen auch eine veränderte Regulation der 5'DI zeigen, bleibt zu berücksichtigen, dass HepG2 eine Karzinomzelllinie ist, deren Rezeptoren und Koregulatoren möglicherweise mutiert sind, und

dass ablaufende Signalkaskaden in diesen proliferierenden Zellen nicht unmittelbar physiologischen Bedingungen entsprechen müssen.

In diesem Zusammenhang hat sich das Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen zur besonderen Herausforderung entwickelt. Um die Transfektion möglichst effizient zu gestalten, sollten HepG2-Zellen im adhärennten Monolayer kultiviert werden. Als ausgesprochen diffizil gestaltete sich jedoch das Vereinzeln der Zellen beim Passagieren der Zellkultur, weshalb letztlich nicht mit einem reinen Monolayer gearbeitet werden konnte.

Dass dies der Signifikanz der Ergebnisse nicht unbedingt zum Nachteil gereichen muss, zeigen Ergebnisse von M. Menjo, wonach die Kultur von primären Rattenhepatozyten als Monolayer einen negativen Effekt auf die Transkription ausübt. Der Kultur als Monolayer folgte ein progredienter Verlust der Zelldifferenzierung. So wies die Kultur derselben Hepatozyten als suspensive mehrschichtige kugelförmige Zellaggregate (Sphäroide) eine deutliche  $T_3$ -vermittelte Steigerung der 5'DI-mRNA-Konzentration auf, während in der Monolayerkultur der  $T_3$ -Effekt auf die 5'DI inkonsistent blieb. Dabei entsprach die in der Sphäroidkultur gemessene Transkription am ehesten den Ergebnissen aus *in vivo*-Versuchen, während die Monolayerkultur mit einer verminderten Transkriptionsrate aufgefallen war (103). Es scheint zumindest theoretisch möglich, dass die in Sphäroid-Kultur gemessene erhöhte mRNA-Konzentration an RXR $\alpha$  im kausalen Zusammenhang mit der erhöhten  $T_3$ -Suszeptibilität steht (104). Wobei aber die Wirkung von RXR primär auf den DR4+2 beschränkt zu sein scheint, da nur dieser die für TR-Homodimere und TR-RXR-Heterodimere charakteristischen Bindungseigenschaften zeigt (61).

Aus diesen Gründen kann es als Grad der Differenzierung von HepG2-Zellen erachtet werden, dass diese Zellen das Bestreben haben im Verband zu wachsen, wo eine differenzierte Funktion über autokrine und parakrine Regulation gegeben zu sein scheint. Denn der Grad der Differenzierung hat auf die Untersuchung solch komplexer Regulationsmechanismen wie die  $T_3$ -Wirkung beachtlichen Einfluss. Wie aus Kapitel 1.3. abgeleitet werden kann, bedingt die koordinierte Interaktion der beteiligten Hormonrezeptoren, Koaktivatoren und Korepressoren ganz wesentlich die Funktion der Signaltransduktion und beeinflusst so die Integrität der gewebe- bzw. zellspezifischen Funktion.

Weil bislang nur eingeschränkte Erkenntnisse vorliegen, wie die Promoteraktivität der h5'DI im Detail reguliert ist, muss deshalb auch auf die Besonderheiten der angewandten Methoden hingewiesen werden.

Der Unterschied zwischen Luciferase- und Deiodase-Assay besteht darin, dass durch erstere Methode nur ein ausgesuchter und damit eingeschränkter Bereich eines Promoters mit Hilfe eines Reportergens untersucht werden kann. So lässt sich mit dieser Methode lediglich ein bestimmter Promoterabschnitt näher auf dessen mutmaßliche Hormon-Responsivität hin charakterisieren. Regulative Elemente, die außerhalb dieses Abschnitts liegen, also weiter in 5'-Richtung in der Intron-Sequenz des Gens oder im 3'-untranslatierten Bereich, werden so jedoch nicht erfasst. Ein weiterer Unterschied zum Deiodase-Assay ist die Überexpression des transfizierten Reportergenkonstrukts, weshalb die nötigen Hormonrezeptoren ebenfalls transfiziert und überexprimiert werden müssen.

Ob diese Überexpression eines der Hauptprobleme des Luciferase-Assays verursacht, bleibt im Folgenden zu erörtern. Denn eine Auffälligkeit des h5'DI-Promoters im Luciferase-Assay ist die niedrige spezifische Aktivität der Luciferase (FU) als Resultat einer verminderten basalen Expression des Reportergenkonstrukts. Dass es sich hierbei nicht um einen systematischen Fehler im Sinne der Statistik handelt, zeigt die Verwendung anderer Promoter-Reportergenkonstrukte in der Arbeitsgruppe. Versuche mit dem SePP-Promoter-Reportergenkonstrukt lassen keinen Zweifel an der Funktionsfähigkeit des experimentellen Systems.

Grundsätzlich anzumerken ist, dass im Tiermodell nach Deprivation von  $T_3$  die 5'DI in der Leber nicht mehr detektierbar ist. Diese „down“-Regulation scheint TR-unabhängig zu sein, da weder der alleinige  $TR\alpha$ - noch der alleinige  $TR\beta$ -Knockout unter  $T_3$ -Depletion zu einer Steigerung der 5'DI führt (46). Eine verminderte basale Expression lässt aber primär an die Wirkung von  $TR\alpha$  denken. Untersuchungen zum  $TR\alpha$ -Knockout ( $TR\alpha^{0/0}$ ) in Mäusen kommen zu dem Schluss, dass die dabei beobachtete TH-Hypersensitivität der 5'DI nicht auf eine vermehrte Expression von  $TR\beta$ , sondern wahrscheinlich durch die hemmende Wirkung von  $TR\alpha 2$  zu erklären ist.  $TR\alpha 2$  kann DNA, aber keinen Liganden binden (46). In Ergänzung dazu wurde mit der Expression von trunkierten TRs argumentiert, die in HepG2 zu einer Minderung der Luciferase-Aktivität führen können. Obwohl  $TR\Delta\alpha 1$  weder DNA noch Ligand binden kann, antagonisiert diese Isoform die  $TR\alpha 1$ -vermittelte  $T_3$ - bzw. RA-Stimulation der Transkription und vermag so eine „down“-Regulation der Transkription auszuüben (105). Nicht gezeigte HepG2-Experimente, in denen  $TR\alpha$  zu pGL2h5'DIpr-1480 kotransfiziert und mit  $T_3$  stimuliert wurde, ergaben, dass die Promoteraktivität der h5'DI durch  $TR\alpha$  unter  $T_3$  gehemmt wird. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde beobachtet, dass Gene, die *in vivo* durch  $T_3$  hochreguliert werden, in HepG2 dagegen herunterreguliert werden (106). Dieser



grundsätzliche Unterschied bedingt sich womöglich durch die vermehrte Expression von TR $\alpha$ 2.

Ferner wurde eine Promoter-unabhängige Hemmung der Luciferaseaktivität beschrieben. A.L. Maia und deren Mitarbeiter postulierten ein kryptisch negatives TRE (nTRE) im codierenden Bereich des Luciferase-Reportergen-Konstrukts. Sie konnten zeigen, dass TR $\beta$  mehr als TR $\alpha$  eine T<sub>3</sub>-unabhängige Steigerung der Luciferaseaktivität ausübt, während die zusätzliche Stimulation mit T<sub>3</sub> zu einer Hemmung der Luciferase führt (107) (108).

Eine andere Theorie, auf die in den Kapiteln 5.2.2. und 5.2.4. noch näher eingegangen wird, beschäftigt sich mit der Hypothese, wonach die T<sub>3</sub>-vermittelte Genexpression durch die Verfügbarkeit von Koaktivatoren, insbesondere von SRC1, beeinflusst wird. So könnte auf die simultane Induktion verschiedener Gene unter bestimmten Umständen eine Depletion von Koaktivatoren folgen, was schließlich die Aktivierung anderer Gene limitiert. Übertragen auf das hier vorliegende Problem, könnte durch Transfektion ein breites Spektrum an hepatischen Genen in HepG2 aktiviert werden, infolgedessen die aktivierten Gene um die vorhandenen Koaktivatoren konkurrieren, wobei das transfizierte Promoter-Reportergen-Konstrukt aufgrund der Überexpression sprichwörtlich leer ausgeht (109). Ob nun die Depletion von Koaktivatoren wirklich eine Rolle spielen mag, bleibt offen, der Einfluss von SRC1 auf die T<sub>3</sub>-vermittelte Hormonwirkung in TR-Knockout-Experimenten konnte aber belegt werden. So wurde gefolgert, dass neben der Hemmung durch TR $\alpha$ 2 normalerweise die Verfügbarkeit des Koaktivators SRC1 durch kompetitive Bindung an TR $\alpha$  primär eingeschränkt wird (39).

Im Zusammenhang mit der Hemmung der Transkription verdichten sich somit Beweise, dass zumindest TR $\alpha$ 2 ganz entscheidenden Einfluss auf die geringe Promoteraktivität der h5'DI im Luciferase-Assay haben könnte.

Der eigentliche Vorteil des Luciferase-Assays liegt darin, dass die Aktivität der Luciferase leicht detektierbar ist und lineare Werte über einen weiten Messbereich aufweist. Im Deiodase-Assay sind lineare Werte dabei nur in einem eingeschränkten Messbereich zu finden, außerhalb dessen aufgrund von Substratdepletion eine Hemmung der Enzymaktivität eintritt (7). Im Deiodase-Assay wird die Hormonwirkung sowohl auf die Genexpression als auch die Enzymaktivität selbst geprüft. Zum einen unterliegt dieser Assay dem weiten Feld der Genregulation (12). Zum anderen hängt die Enzymaktivität der h5'DI unter anderem vom supplementierten Selen ab, da es sich bei der h5'DI um ein Selenoprotein mit Selen im enzymatisch aktiven Zentrum handelt (6). Diese Eigenschaft ist zu beachten, da in Mäusen das geschlechtsabhängige Expressionsmuster der 5'DI über selenabhängige prä- und

posttranskriptionale Regulationsmechanismen kontrolliert wird, die in Kapitel 5.2.1. noch näher erläutert werden (72).

Zuletzt bleibt noch die Frage der Stimulationsdauer. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, zeigt die Stimulation nukleärer Hormonrezeptoren durch Steroide zum Teil ein biphasisches Antwortverhalten. So weist das Malatenzym eine frühe Primärantwort nach 4 h und eine späte Sekundärantwort nach 24 h auf (8).

In Experimenten von M. Menjo zur 5 $\alpha$ DI zeigte sich auf Transkriptionsebene ein signifikanter Unterschied durch T<sub>3</sub>-Stimulation erst nach 6 h, der über 48 h anhielt und nicht biphasisch war. Wie in Kapitel 4.1.2.1. beschrieben, weist die Enzymaktivität der h5 $\alpha$ DI nach Inkubation von HepG2-Zellen mit Steroiden für 24 h und 72 h keinen zeitabhängigen Effekt auf, weshalb diese Ergebnisse zusammengefasst wurden. Da die biologische Halbwertszeit der 5 $\alpha$ DI zwischen 20 und 30 h liegt, diese *in vitro* durch DTT reduziert werden kann und der durch gonadale Steroide verursachte Stimulationseffekt eher gering eingeschätzt worden war, wurde im Luciferase-Assay für die Stimulation ein Zeitraum von 24 h gewählt, während im Deiodase-Assay mit einer Zeitspanne von 48 h stimuliert wurde (103). Die Konzentration der eingesetzten Steroide richtete sich nach denen anderer Arbeiten (141) (100).

Ob die Ergebnisse aus diesen Methoden artifiziell bleiben oder physiologischen Bedingungen entsprechen, hängt also von unterschiedlichen Faktoren ab, die sich zudem gegenseitig beeinflussen. Daher müssen bei der Interpretation der Ergebnisse die hier aufgeführten Aspekte berücksichtigt werden, damit vermeintliche Effekte nicht das Ergebnis systematischer Fehler im Sinne der Statistik darstellen.

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse der Promoter- und Enzymaktivitätsexperimente**

### **5.2.1. Diskussion der Ergebnisse unter Steroidstimulation**

Da sich im Tiermodell eine deutliche Induktion der hepatischen 5 $\alpha$ DI durch Testosteron gezeigt hat, stand der Nachweis einer Testosteron-induzierten Primärantwort der h5 $\alpha$ DI im humanen Zellkulturmodell im Mittelpunkt des Interesses. Es konnte jedoch keine Wirkung von gonadalen Steroiden auf die Promoteraktivität der h5 $\alpha$ DI in HepG2-Zellen nachgewiesen werden. Wenngleich eine Aussage über die statistische Signifikanz dieser Ergebnisse

aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich ist, so konnte B. Mentrup über eine mangelnde Regulation der h5'DI durch Steroide hinaus in ihren Versuchen beobachten, dass das leere Luciferase-Expressionplasmid pGL2basic durch Steroide reguliert wird (110). Aus diesem Grund wurde auf weitere Versuche mit dem Luciferase-Assay zur Wirkung von gonadalen Steroiden verzichtet. Andererseits ist zu beachten, dass das eingesetzte Promoterkonstrukt nur aus 1480 bp besteht und putative hormonresponsive Elemente außerhalb des untersuchten Promoterbereichs liegen. Regulative Elemente können weiter in 5'-Richtung, in der Intron-Sequenz des Gens oder im 3'-untranslatierten Bereich liegen. Zumindest die für AR und ER $\alpha$  charakteristischen Konsensussequenzen konnten in dem verwendeten Promoterabschnitt nicht nachgewiesen werden. Außerdem könnte aber auch gerade aufgrund der in Kapitel 5.1 aufgezeigten Problematik argumentiert werden, dass sich die Fragestellung mit Hilfe des Luciferase-Assays nicht adäquat untersuchen ließ. Denn der Promoter der h5'DI weist im Luciferase-Assay nicht die für andere Promotoren typische hohe Luciferaseaktivität auf, wodurch die Interpretation von marginalen Effekten zusätzlich erschwert bzw. praktisch unmöglich gemacht wird.

Aus diesem Grunde können, was die Relevanz der Ergebnisse zur Wirkung von Steroiden anbelangt, nur die Ergebnisse aus dem Deiodase-Assay von Interesse sein, weil dort die Enzymaktivität der h5'DI direkt bestimmt wird. Da die Deiodasen Selenoproteine sind, ist deren Enzymaktivität vom supplementierten Selen abhängig. Zuerst wurde eine Steroidstimulation ohne Selensupplementation versucht, um zu sehen, ob sich eine Steroidregulation der h5'DI auf hierarchische Art unter Selendefizienz behaupten kann. Eine solche Steroidregulation konnte aber nicht beobachtet werden.

Jedoch auch unter Supplementation von Selen ist in HepG2-Zellen nach Stimulation mit gonadalen Steroiden keine Steigerung der Deiodaseaktivität zu verzeichnen. Vielmehr lässt sich eine statistisch signifikante leichte Hemmung der h5'DI durch R1881 auf  $(93,0 \pm 3,1) \%$  beobachten ( $p = 0,018$ ). Hierbei handelt es sich wohl um einen Fehler 1. Art, also ein falsch positives Ergebnis, da sich auch geringe Unterschiede aufgrund der hohen Fallzahlen  $n = 9$  bzw.  $n = 5$  als statistisch signifikant ausnehmen, obwohl Abweichungen in diesem Differenzbereich sicherlich keinen relevanten Unterschied darstellen. Zum anderen muss nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur, die das Signifikanzniveau nach fünfmaligem Testen auf  $p < 0,01$  absenkt, berücksichtigt werden, dass  $p = 0,018$  als nicht signifikant zu werten ist. Die Stimulation mit T<sub>3</sub> zeigt, dass das experimentelle System und damit die h5'DI an sich induzierbar ist. Doch zeigt die Kostimulation mit gonadalen Steroiden keine synergistischen Effekte. HepG2-Zellen sind karzinomatösen Ursprungs und Western-Blot-Analysen dieser

Zellen zum Nachweis der Expression von AR, die von B. Mentrup angefertigt worden waren, erbrachten nur ein sehr schwaches Signal. Aus diesem Grund wurden HepG2-Zellen vor Steroidstimulation mit dem AR- respektive ER $\alpha$ -Expressionsplasmiden transfiziert. Dies führte jedoch nicht zu einer Induktion der h5'DI-Enzymaktivität und hatte auch keinen weiteren Effekt auf die T<sub>3</sub>-Responsivität.

Da die Untersuchungsergebnisse, die mit Hilfe des Luciferase-Assays bezüglich der Wirkung gonadaler Steroide auf die h5'DI gewonnen wurden, aufgrund mangelnder Aussagekraft ohne Relevanz sind und sich zudem im Deiodase-Assay kein Effekt von gonadalen Steroiden auf die Enzymaktivität der h5'DI gezeigt hat, kann letztlich keine Aussage zur geschlechtsabhängigen Expression der h5'DI im Hinblick auf die in Mäusen beobachteten, selenabhängigen prä- und posttranskriptionalen Regulationsmechanismen getroffen werden (72). Das Besondere hierbei ist, dass die Expression der 5'DI in Mäusen von zwei Parametern abhängt, nämlich der vorhandenen Selen-Menge und der posttranskriptionalen Translationseffizienz, also der Kontrolle der Biosynthese unabhängig von der RNA-Menge.

C. Riese *et al.* konnten zeigen, dass die Expression der hepatischen 5'DI über die posttranskriptionale Translationseffizienz reguliert wird (72). So weist die hepatische 5'DI-Aktivität in männlichen Mäusen einen um 2,8-mal höheren Wert als in weiblichen auf. Im Gegensatz dazu ist die hepatische 5'DI-mRNA-Menge in männlichen Mäusen um 30 % niedriger als in weiblichen. Das besondere ist außerdem, dass Orchiektomie weder die hepatische 5'DI-mRNA-Menge noch die hepatische 5'DI-Aktivität beeinflusst. Hingegen führt Ovariektomie zu einem Anstieg der hepatischen 5'DI-Aktivität, aber nicht zu einem Anstieg der hepatischen 5'DI-mRNA-Menge. Somit kann gefolgert werden, dass in Mäusen 17 $\beta$ -Estradiol maßgeblichen Einfluss auf die posttranskriptionale Regulation der hepatischen 5'DI-Expression hat. Als zusätzlicher Regulationsfaktor hat sich der Selenstatus herausgestellt, da unter Selendefizienz die hepatische 5'DI-mRNA-Menge in männlichen Mäusen unverändert niedriger als in weiblichen, jedoch die hepatische 5'DI-Aktivität zwischen männlichen und weiblichen Tieren nahezu gleich ist, bei Reduktion der hepatischen 5'DI-Aktivität in männlichen Tieren um das 5,6-Fache und in weiblichen Tieren um das 2-Fache. Unter Selendefizienz ist folglich keine geschlechtsakzentuierte Expression der hepatischen 5'DI mehr nachweisbar.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass weibliche Mäuse eine um 1,8-mal höhere renale 5'DI-Aktivität und eine um 2,6-mal höher renale 5'DI-mRNA-Konzentration als männliche Mäuse aufweisen. Orchiektomie erhöht die renale 5'DI-mRNA-Menge und 5'DI-Aktivität auf die Menge und Aktivität von weiblichen Tieren. Ovariektomie führt zu einem Abfall der

renalen 5'DI-mRNA-Menge gegenüber ovariectomierten und mit Estradiol behandelten Tieren, wovon jedoch die renale 5'DI-Aktivität unbeeinflusst bleibt. Unter Selenmangel nimmt die renale 5'DI-Aktivität und -mRNA-Menge in beiden Geschlechtern ab und die Differenz zwischen beiden Geschlechtern zu, wobei die renale 5'DI-Aktivität und -mRNA-Menge in männlichen Tieren 4 - 5-fach niedriger ist als in weiblichen Tieren.

Der geschlechtsspezifische Expressionsunterschied der murinen 5'DI wird jedoch nicht durch eine geschlechtsabhängige Expression von Faktoren der Selenoprotein-Biosynthese oder durch die Serumkonzentration an Selen vermittelt, da die Expression von SBP2 und EF<sub>SEC</sub> sowie die Serumkonzentration an Selen in weiblichen und männlichen Mäusen gleich ist. Die selen- und geschlechtsakzentuierte Expression von Selenoproteinen scheint somit durch eine Regulation der Translationseffizienz oder der Proteinstabilität vermittelt zu sein (72).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der im Tiermodell beobachtete Einfluss von Steroiden auf die 5'DI nicht durch Zellkulturexperimente bestätigt werden konnte. Es ließ sich somit keine direkte Regulation der h5'DI durch R1881 oder 17 $\beta$ -Estradiol in HepG2-Zellen nachweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann aber eine geschlechtsspezifische Regulation im Menschen nicht völlig ausgeschlossen werden. Denn von Untersuchungen an einer Karzinomzelllinie kann nur begrenzt auf Verhältnisse im menschlichen Körper geschlossen werden und mögliche indirekte Effekte müssen ebenfalls berücksichtigt werden.

So besteht unter anderem die Möglichkeit, dass die im Tiermodell beobachtete geschlechtsspezifische 5'DI-Regulation über eine gesteigerte Proteinsynthese vermittelt oder durch Stabilisierung der mRNA bedingt sein könnte (71). Wenngleich ein Estrogeneffekt auch gar nicht zu erwarten war, so soll erwähnt werden, dass eine adäquate Stimulierbarkeit von HepG2-Zellen durch Estrogene nicht möglich zu sein scheint (111). Dexamethason übt tierexperimentell nur in supraphysiologischen Dosen von  $10^{-8}$  M einen Effekt auf die hepatische 5'DI aus, der sich durch Cycloheximide hemmbar zeigt, und somit keine Primärantwort, sondern eine Sekundärantwort mit *de novo* Proteinsynthese darstellt (103). Diesbezüglich konnte S. Yamaguchi zeigen, dass Dexamethason auf die T<sub>3</sub>-abhängige Genexpression des Malatenzym und auf die Genexpression von Spot 14 (S14) nicht direkt über ein „*Glucocorticoid response element*“ (GRE) wirkt, sondern über *de novo*-Proteinsynthese von RXR $\alpha$  im Sinne einer verzögerten Sekundärantwort. Dexamethason scheint somit die T<sub>3</sub>-vermittelte Transkription von Genen unter bestimmten Bedingungen mit Hilfe von Koaktivatoren beeinflussen zu können (112). Inwiefern in HepG2 überhaupt eine

Dexamethason-abhängige Regulation der 5'DI möglich ist, wo doch über die verminderte Transkription von RXR $\alpha$  in der Monolayerkultur von primären Rattenhepatozyten berichtet wurde, bleibt offen (104).

Ein veränderte Expression von Koregulatoren führt auch zu einer Veränderung der transkriptionellen Aktivität von AR. So muss aufgrund von Beobachtungen zum Wachstumsverhalten von Prostatakarzinomzellen festgehalten werden, dass eine verminderte Expression von SRC1 als mögliche Ursache einer veränderten transkriptionellen Aktivität von AR in Frage kommt. Alternativ wird argumentiert, Mutationen von SRC1 könnten die Aktivität von AR und damit das Wachstumverhalten von Tumoren ändern (113).

Für die Wirkung von ER $\alpha$  gilt, dass ER $\alpha$  und TRs an identische Halbseiten, 5'-AGGTCA-3', binden können. *In vitro* kann die Wirkung von ER $\alpha$  durch Kotransfektion von TR $\alpha$ 1 und T<sub>3</sub> abgeschwächt werden. Die Ursache der Repression von ER $\alpha$  scheint jedoch nicht DNA-kompetitiv zu sein, sondern ist wohl durch Protein-Protein-Interaktion bedingt (114).

Die Regulation T<sub>3</sub>-responsiver Gene unterscheidet sich in der Gen- bzw. Promoter-spezifischen Gruppierung von Koaktivatoren und Korepressoren. Diese Interaktion birgt ein hohes Regulationspotential, das im Folgenden nur ansatzweise näher charakterisiert werden kann.

Der Mangel an SRC1 in SRC1-defizienten Mäusen (SRC1<sup>-/-</sup>) lässt die hepatische Expression der 5'DI und des Malatenzyms gegenüber der Kontrolle unbeeinflusst. Beide Enzyme zeigen eine typische T<sub>3</sub>-abhängige Stimulation der Transkription, während *Spot 14* (S14) in SRC1<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht den erwarteten Abfall der S14-mRNA-Konzentration unter T<sub>3</sub>-Depletion zeigt und somit auch kein Unterschied zwischen T<sub>3</sub>-Depletion und anschließender T<sub>3</sub>-Stimulation in der Transkription von S14 nachgewiesen werden konnte (115). Das mutmaßliche TRE von S14 liegt mit ca. 2500 bp sehr weit vom Transkriptionsstartpunkt entfernt und scheint diesen Promoter-spezifischen Effekt zu vermitteln (116).

Zu dem Korepressor NCOR gibt es, wie bereits erwähnt, eine dominant negative Mutation (NCORi), der die aminoternale Repressionsdomäne fehlt (102). Transgene Mäuse, die NCORi überexprimieren, zeigen während T<sub>3</sub>-Depletion eine Derepression der eigentlichen Repression, die normalerweise die basale Transkription hemmen würde. Während T<sub>3</sub>-Substitution hingegen findet sich kein Unterschied zwischen normalen und transgenen Tieren, was zu der Annahme führt, dass Korepressoren nur mit TRs in Abwesenheit des entsprechenden Liganden interagieren und nach Bindung von T<sub>3</sub> primär Koaktivatoren ihren Einfluss ausüben. So ist die hepatische Expression der 5'DI, der Glucose-6-phosphatase, von

*bcl3* und *S14* in NCoRi-transgenen Tieren gegenüber Kontrolltieren während T<sub>3</sub>-Depletion gesteigert. Die hepatische Expression des Malatenzyms hingegen bleibt in ihrer Expression unbeeinflusst. Was diesen Gen-spezifischen Effekt bedingt, bleibt allerdings fraglich (102) (50).

Korepressoren wie NCOR1 oder NCOR2 können generell mit anderen Repressoren interagieren, wie z.B. Sin-3 und Histondeacetylase-1 (HDAC1). Ferner können MAD/MAX, MYC/MXI und „*Methyl-CpG-binding protein*“ mit Sin-3 und HDACs einen Korepressorkomplex bilden (8). Es wird vermutet, dass DNA-Methylierung und Histondeacetylierung möglicherweise über das „*Methyl-CpG-binding protein*“ miteinander verknüpft sind. Für TRs ist auch eine Interaktion mit „*CCCTC binding factor*“ (CTCF) beschrieben worden, was gleichsam zur Bildung eines Repressor-Komplexes führt (50) (117). Auf diese Weise können Koregulatoren spezifisch die Regulation von Zielgenen steuern. Deshalb muss der Stellenwert von Interaktion, Mutation und Depletion der beteiligten Koregulatoren, bezogen auf die mangelnde Steroidresponsivität der h5´DI in HepG2-Zellen, ebenfalls berücksichtigt werden.

### 5.2.2. Alternative Mechanismen der h5´DI-Regulation

Der Vollständigkeit halber sollen in diesem Zusammenhang noch weitere potentielle Regulationsmechanismen Erwähnung finden.

Für die Kontrolle der Transkription können sowohl DNA-Methylierung als auch das Verhältnis von Sp1 zu Sp3 von Bedeutung sein. Im Promoter der h5´DI finden sich zwei potentielle GC-Boxen zwischen den Nt -39 und -34 bzw. -68 und -63. GC-Boxen vermitteln die basale Transkription von Haushaltsgenen und gelten als putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus der Sp-Familie (118) (119). Sp1 und Sp4 gelten als Aktivatoren der Transkription, während Sp3 oft als Repressor agiert (120) (121). Das Verhältnis von Sp1 zu Sp3 scheint daher ein eigenständiger zellspezifischer Regulationsmechanismus in der Genregulation zu sein.

Doch darüber hinaus haben GC-Boxen noch eine weitere Funktion. Wenn in der DNA auf ein Cytosin ein Guanin (CpG) folgt, kann Cytosin am C<sub>5</sub>-Atom methyliert werden. Diese epigenetische Alteration durch Einbringung spezifischer Methylierungsmuster in das Genom mit Hilfe der DNA-Methyltransferase (DNMT) führt zur Inaktivierung von Genen und wird „*Genomic imprinting*“ genannt. Das Methylierungsmuster kann die Bindung von Sp1 beeinflussen, denn methylierte CpG-Stellen hemmen die Bindung von Sp1 (122). Alternativ

kann der Transkriptionsrepressor MeCP1 und/oder MeCP2 um die Bindungsstelle an methylierten CpG-Stellen mit Sp1 konkurrieren (119) (123) (124).

Der Promoter der h5'DI enthält mehrere putative CpG-Methylierungsstellen, die am Übergang des Promoters zum ersten Intron liegen (-1997 bis +1132 bp). So konnte gezeigt werden, dass das Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Karzinomzelllinien, die die h5'DI noch oder nicht mehr exprimieren, an Position -4 unterschiedlich ist. In verschiedenen Zelllinien aus humanen Schilddrüsen-Karzinomen konnte nachgewiesen werden, dass die Methylierung des h5'DI-Promoters an Position -4 die Transkription der h5'DI herunterreguliert. In HepG2-Zellen ist der Promoter an dieser Stelle nicht methyliert (124). Das Methylierungsmuster kann zudem unabhängig davon die Bindung von CTCF beeinflussen (125). Fraglich bleibt, welches Methylierungsmuster normale Hepatozyten tragen und ob sich dieses von HepG2-Zellen unterscheidet.

Eine ebenfalls sehr interessanter Weg, die Genexpression zu kontrollieren, sind MYC/MAX und MAD/MAX. Im Promoter der h5'DI lässt sich an Position -180 bis -175 bp die komplementäre Sequenz einer mutmaßlichen „*Enhancer-box*“ (E-Box) nachweisen. Eine E-Box ist ein Hexanukleotid mit folgender Basenfolge: 5'-CACGTG-3'. Die Heterodimere MYC/MAX und MAD/MAX können an eine solches Elemente über eine „*Basic/helix-loop-helix/leucine zipper*“-(bHLHZ)-Domäne binden. MYC ist ein Protoonkogen, das als Aktivator der Transkription auftritt und dem viralen Onkogen des „*Myelocytomatosis Virus*“ entspricht. MYC/MAX interagiert mit TRAP, das wiederum eine Histonacetyltransferase rekrutiert, um die Transkription zu aktivieren. MAD hingegen ist ein Repressor der Transkription und zählt deshalb zu den Tumorsuppressorgenen. MAD/MAX interagiert mit dem Korepressor mSin3, einer Histondeacetylase, was zur Kondensation von Chromatin und zur Hemmung der Transkription führt. Die Heterodimere MYC/MAX und MAD/MAX konkurrieren folglich um die entsprechenden DNA-Sequenzen und lenken das Schicksal der Zelle entweder Richtung Proliferation und Transformation oder Richtung Differenzierung und Ruhephase (126). Bisher liegen keine Untersuchungen vor, die sich mit dem Einfluss von MYC/MAX und MAD/MAX auf die Promoteraktivität der h5'DI beschäftigt haben.

Ein weiterer Kontrollmechanismus der Genexpression ist T<sub>4</sub> selbst. T<sub>4</sub> kann nämlich die Assoziation einer Proteinkinase mit TRs steuern, was an TRs zur Phosphorylierung von Serin führt (127).



Ein gesteigerter Phosphorylierungsgrad in Zellen kann die T<sub>3</sub>-vermittelte transkriptive Aktivierung bestimmter Gene fördern, der Mechanismus bleibt allerdings vorerst unbekannt. Die Vermutung, dass die Phosphorylierung von TR, RXR oder Koaktivatoren zur gesteigerten Aktivität der Transkription führt, wird durch Experimente bestätigt, die dies sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachwiesen. Der humane TR $\beta$ -1 kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* phosphoryliert werden, ohne aber die Lokalisation der Phosphorylierungsseite zu kennen. Phosphorylierung mag eventuell ein anderer Weg sein, der zusätzlich zur T<sub>3</sub>-Bindung die Bindung von TR-Komplexen an TREs modulieren kann. Hinzu kommt, dass T<sub>3</sub> selbst Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von TRs hat (8).

### 5.2.3. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone

Wenngleich die hier vorliegenden Ergebnisse die These, wonach die h5'DI allein für einen geschlechtsspezifischen Unterschied im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone verantwortlich sein könnte, nicht stützen, so scheinen dennoch geschlechtsakzentuierte Besonderheiten bezüglich des Metabolismus der Schilddrüsenhormone im Menschen vorzuliegen.

Sexualsteroid beeinflussen im Tiermodell die TSH-Sekretion (1) (128). Außerdem konnte im Hypophysenvorderlappen von weiblichen Ratten im Vergleich zu männlichen Tieren eine höhere 5'DI-mRNA-Konzentration und 5'DI-Aktivität beobachtet werden (142). Deren Bedeutung für die Physiologie des Menschen bleibt jedoch unklar.

Unter Estrogentherapie wurde in hypothyreoten Frauen ein vermehrter Bedarf an Thyroxin beobachtet (16). Hierfür müssen zwei mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden. Ursache Nummer eins ist eine Estrogen-induzierte Konzentrationssteigerung von TBG im Plasma. Normalerweise ist die Serumkonzentration von TBG zwischen Männern und Frauen gleich. Zu einer Konzentrationssteigerung von TBG kommt es aber bei Frauen in der Schwangerschaft, im Rahmen der Kontrazeption, unter postmenopausaler Hormonersatztherapie oder bei Patienten mit estrogenproduzierendem Tumor. Grund für den TBG-Anstieg ist eine vermehrte Glykosylierung von TBG mit einem verlangsamten Abbau des Proteins und zu einem geringeren Teil auch die gesteigerte Produktion von TBG (16). R. Gärtner, der die Mikroheterogenität von TBG untersucht hat, konnte ein unterschiedliches Glykosilierungsmuster von TBG durch Sialinsäure nachweisen (129). S. Refetoff konnte

schließlich demonstrieren, dass Sialinsäurereste die Stabilität von TBG beeinflussen, indem sie den Abbau des Proteins verzögern. Glykoproteine, wie TBG, mit einem vermehrten Anteil an Sialinsäure werden in geringerem Umfang aus dem Plasma entfernt, da der Grad der Sialinisierung eines Proteins die Aufnahme in Hepatozyten vermindert (130). Der TBG-Anteil mit dem höchsten Sialinsäureanteil ist durch eine höhere Halbwertszeit gekennzeichnet. Dieser Anteil liegt jedoch nur bei 10 - 15 % des Gesamt-TBG. In Rhesus-Affen stieg nach Estrogengabe die TBG-Konzentration im Serum an (131). Mit HepG2-Zellen konnte ein solcher Effekt nicht nachgewiesen werden, wohl auch deshalb, da diese Zellen nicht wie normale Zellen auf Estrogen reagieren (111). So scheint, den Ausführungen von D. Glinöer folgend, die Erhöhung der TBG-Konzentration in der Schwangerschaft multifaktorieller Genese zu sein (132).

In gesunden weiblichen Individuen zeigt sich außer einer Erhöhung der totalen Thyroxinkonzentration im Serum kein physiologischer Effekt durch die estrogeninduzierte TBG-Konzentrationssteigerung im Serum. Normalerweise führt die estrogeninduzierte Steigerung der TBG-Konzentration über eine vermehrte TSH-Sekretion zu einer Anpassung des Thyroxin-Spiegels, damit die Konzentration an freiem Thyroxin konstant bleibt. Weder der Thyroxinspiegelabfall noch die konsekutive TSH-Spiegelzunahme konnten bislang dokumentiert werden. In Frauen mit Hypothyreose kann jedoch die Thyroxinkonzentration nicht adäquat gesteigert werden, weswegen die freie Thyroxinkonzentration fällt und die TSH-Konzentration steigt. Nur in seltenen Fällen kommt es zu einer klinisch manifesten Hypothyreose, aber in fast jedem zweiten Fall ist aufgrund des gesunkenen freien Thyroxinspiegels eine Erhöhung der TSH-Konzentration im Serum zu beobachten (16).

Neuere Untersuchungen bringen einen weiteren Aspekt in diese Diskussion. Ursache Nummer zwei für den Mehrbedarf an TH könnte auch die Estrogen-bedingte Regulation der h5DIII sein. Die h5DIII ist nämlich sowohl im Uterusepithel als auch in der Plazenta lokalisiert und könnte durch eine vermehrte Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen womöglich das Phänomen des geschlechtsspezifischen Unterschieds im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone miterklären. S.A. Huang und dessen Kollegen haben bei ihrer Arbeit zur Wirkung von TGF $\beta$ <sub>1</sub> auf die h5DIII herausgefunden, dass E<sub>2</sub> bei Kotransfektion von ER $\alpha$  in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> M die Luciferaseaktivität des h5DIII-Promoters um den Faktor 10 stimuliert. Im Vergleich dazu führt die Kotransfektion eines dominant negativen Smads zur Abschwächung des eben beschriebenen E<sub>2</sub>-Effekts, was darauf hindeutet, dass

Smads nötig sind für die Kostimulation bzw. Expression der 5DIII. Ein synergistischer Effekt zwischen  $TGF\beta_1$  und  $E_2$  konnte nicht belegt werden (3).

Da Smads im Endometrium exprimiert werden, scheint eine Expression der h5DIII in diesem Gewebe möglich. Im Zusammenhang mit der  $E_2$ -Wirkung auf die h5DIII könnte die vermehrte Expression der h5DIII in diesem Gewebe den erhöhten Schilddrüsenhormonbedarf, der in hypothyreoten Frauen unter der Einwirkung einer Schwangerschaft oder Hormonersatzbehandlung auftritt, kausal erscheinen lassen. Dessen Bedeutung muss noch geklärt werden, doch steht dies wohl in engem Verhältnis zu der Funktion, die die h5DIII in der Schwangerschaft ausübt, wo sie einen lokalen Hypothyreoidismus induziert, um die Expression onkofetaler Gene durch Inaktivierung von TH möglich zu machen (3).

Es entspräche keinesfalls klarer wissenschaftlicher Erkenntnis, aus diesen Beobachtungen eine Ursache für die geschlechtsakzentuierte Verteilung endokrinologischer Erkrankungen ableiten zu wollen. Doch gerade unter dem Einfluss anderer Faktoren in der Schwangerschaft, wie HCG, Veränderung der immunologischen Toleranz und gesteigertem Bedarf an Iodid, können TBG und h5DIII Bausteine in der Pathophysiologie endokrinologischer Erkrankungen sein (6).

#### **5.2.4. Diskussion der Pathophysiologie des „Low $T_3$ Syndrome´s“**

Hinter der mutmaßlichen Pathophysiologie des „Low  $T_3$  Syndrome´s“ steht das teleologische Konzept, wonach Krankheit oder Nahrungskarenz die Schilddrüsenhormonspiegel so beeinflussen, dass es zu einer physiologischen Reduktion des Grundumsatzes und damit zum Schutz der Energiereserven kommt (109) (6). Als mögliche Ursache dieser Veränderungen im Schilddrüsenhormonstoffwechsel wird der inhibitorische Einfluss von Zytokinen auf die Expression der h5'DI genannt (76). Die Frage nach der spezifischen Wirkung von  $TGF\beta_1$  auf die h5'DI wurde unter diesem Aspekt gestellt, zumal der 5'-untranslatierte Bereich des Gens der h5'DI an Position -186 bis -190 ein putatives „*Smad binding element*“ (SBE) aufweist (3). Die Enzymaktivität der h5'DI zeigt nach Stimulation mit  $TGF\beta_1$  keinen statistisch signifikanten Unterschied trotz leichter Hemmung der h5'DI mit 100 pM  $TGF\beta_1$ , wobei es sich hier wohl um einen unspezifischen Effekt handelt. Denn in den SePP-Experimenten von V. Mostert lag die halbmaximale inhibitorische Konzentration bereits bei 30 pM  $TGF\beta_1$ , während hier mit 40 pM  $TGF\beta_1$  keine Hemmung der h5'DI-Enzymaktivität zu beobachten ist.

Zwar blieb die Stimulation bis maximal 100 pM TGF $\beta$ <sub>1</sub> unter der Plasmakonzentration von 200 nM TGF $\beta$ <sub>1</sub> (79), doch ist für Zellkulturmedien die Zugabe von TGF $\beta$ <sub>1</sub> in einem Konzentrationsbereich von 4 - 120 pM angegeben (100).

Dass die hier verwendeten HepG2-Zellen TGF $\beta$ <sub>1</sub>-responsiv sind, und dass das verwendete TGF $\beta$ <sub>1</sub> die volle biologische Aktivität besitzt, konnte durch Transfektion dieser Zellen mit dem SePP-Promoter demonstriert werden. Zwar waren auch hier die Ergebnisse statistisch nicht signifikant, doch liegt dies wohl weniger an der Differenz der Werte, als vielmehr an der niedrigen Fallzahl. Zumal sich die Ergebnisse mit den Beobachtungen von V. Mostert decken, denn die Luciferaseaktivität des SePP-Promoters zeigt die von ihm beschriebene Hemmung in Abhängigkeit von der TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Konzentration (22) (23). Somit lässt sich folgern, dass TGF $\beta$ <sub>1</sub> in HepG2-Zellen keinen Effekt auf die Enzymaktivität der h5'DI ausübt. Dabei muss die Promoter-spezifische Regulation von negativen TREs (nTREs) berücksichtigt werden (8). Die Sekretion von TSH wird ebenfalls über nTREs reguliert und ist in Mäusen RXR $\gamma$ -abhängig. Durch Stimulation mit einem RXR-spezifischen Agonisten kann die TSH-Sekretion supprimiert werden (8). Wie bereits erläutert, könnte die Expression von RXR in HepG2 und somit auch die RXR-abhängige Gen-Suppression beeinträchtigt sein (104). Wenn also in HepG2-Zellen keine Suppression der h5'DI durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> zu beobachten ist, so schließt dies einen negativen Effekt von TGF $\beta$ <sub>1</sub> auf die h5'DI *in vivo* nicht völlig aus.

Obwohl somit der Einfluss von Zytokinen, was die Pathophysiologie des „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“s“ anbelangt, nicht weiter geklärt werden konnte, gibt es jedoch interessante Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen, die sich mit dem Einfluss von Koaktivatoren auf die 5'DI-Regulation beschäftigt haben. J. Yu und R.J. Koenig vermuten eine indirekte Hemmung der 5'DI-Expression durch Aktivierung anderer Gene, indem aktivierte Gene um die vorhandenen Koaktivatoren, die eigentlich für die T<sub>3</sub>-abhängige Genexpression nötig sind, konkurrieren. Aus diesen Überlegungen wurde die Hypothese abgeleitet, wonach die Depletion von Koaktivatoren zu einer Hemmung der Expression der 5'DI im „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ führt (109). Konkret konnte in Rattenhepatozyten eine dosisabhängige Hemmung der 5'DI durch IL-1 und IL-6 nachgewiesen werden, sowohl was die Transkriptionsrate als auch was die Enzymaktivität betrifft. Die Kotransfektion von SRC1 in zusätzlich mit dem 5'DI-Promoter durchgeführten Transfektionsexperimenten hob die durch IL-1 verursachte Hemmung der Promoteraktivität wieder auf. Die endogene Menge von SRC1 wurde durch IL-1 nicht beeinflusst. Es zeigt sich also, dass die T<sub>3</sub>-vermittelte Expression durch die Verfügbarkeit von Koaktivatoren, speziell durch SRC1, reguliert wird. So könnte auf die

simultane Induktion verschiedener Gene eine Depletion von Koaktivatoren folgen, was schließlich die Induktion bestimmter Gene limitiert (109).

Als Resümee wurde aus diesen Beobachtungen gefolgert, dass wohl die Gabe von  $T_3$  im „*Low T\_3 Syndrome*“ weniger nützlich als vielmehr gefährlich sein könnte, da  $T_3$  womöglich Koaktivatoren auf seine Transkriptionsregulation konzentriert, wodurch die durch Zytokine induzierte Genexpression kompromittiert werden könnte (109).

Im Zusammenhang mit dem „*Low T\_3 Syndrome*“ muss nochmals die Bedeutung der  $h5'DI$  diskutiert werden. Hauptmerkmal des „*Low T\_3 Syndrome's*“ ist ein Abfall von  $T_3$  und eine Zunahme von  $rT_3$ .

Bislang wurde angenommen, dass für den hohen  $rT_3$ -Wert nicht eine vermehrte Bildung von  $rT_3$ , sondern eine verminderte Clearance verantwortlich sei (6). Mittlerweile weiß man aber, dass die hohe  $h5DIII$ -Aktivität in Leber und Skelettmuskulatur sowohl die  $rT_3$ -Produktion als auch den  $T_3$ -Abbau steigert. Entgegengesetzt dazu reduziert womöglich die niedrige  $h5'DI$ -Aktivität die  $T_3$ -Produktion und den  $rT_3$ -Abbau. In Patienten mit „*Low T\_3 Syndrome*“ ist die  $h5'DII$  in Skelettmuskulatur und Leber nicht detektierbar. Folglich verursachen entweder die  $h5'DI$  oder die  $h5'DII$  die niedrigen  $T_3$ -Werte. Der Anteil, mit dem die einzelnen Isozyme daran beteiligt sind, kann nicht näher ermittelt werden, doch korrelieren  $T_3/rT_3$ -Quotient und  $h5'DI$ -Aktivität positiv mit einem statistisch signifikanten Wert von  $p < 0,001$  (2). Die niedrige  $h5'DI$ -Aktivität scheint daher an der verminderten  $T_3$ -Produktion beteiligt zu sein.

Eine andere Möglichkeit der Regulation stellt die Ubiquitinierung und der sich anschließende Abbau der  $5'DII$  im Proteasom dar. Deaktivierung und Aktivierung der  $5'DII$  werden kontrolliert durch Ubiquitinierung bzw. Deubiquitinierung, wobei diese Reaktionen durch „*Ubiquitin ligase WD repeat and SOCS box-containing 1*“ (WSB-1) respektive „*von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes*“ 1 und 2 (VDU1/VDU2) katalysiert werden. Wenn also der  $T_4$ -Spiegel fällt, kann so durch vermehrte Deubiquitinierung zumindest teilweise einer Hypothyreose entgegengewirkt werden (133). Ein weiterer Diskussionspunkt ist, dass die permanente Neusynthese der  $5'DII$  durch Krankheit und Nahrungskarenz kompromittiert sein könnte (2).

Da die  $5'DI$ -Expression eine direktproportionale Responsibilität zur  $T_3$ -Konzentration zeigt, könnte die niedrige  $5'DI$ -Aktivität mehr ein Effekt als der Grund für die niedrige Plasma- $T_3$ -Konzentration sein (61) (133). Die verminderte  $T_3$ -Produktion mag letztlich als unvermeidliche Konsequenz von Vorteil sein, wenn Stress und Krankheit gerade aufgrund der kurzen Halbwertszeit der  $5'DII$  zu einem niedrigeren  $T_3$ -Spiegel führen (6). Wenn also

Nahrungskarenz oder Krankheit aufgrund der verminderten Expression der 5'DII zu den hormonellen Veränderungen führen, so scheint dies mehr ein physiologischer Schutzmechanismus als eine pathologische Fehlregulation zu sein, weshalb auch aus diesem Grund die T<sub>3</sub>-Supplementation beim „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ nicht sinnvoll zu sein scheint (6) (133).

Neben den eben beschriebenen peripheren Veränderungen, soll noch die zentrale Komponente des „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ kurze Erläuterung finden. Die Ursachen für den inadäquaten TSH-Spiegel liegen wohl in einer Hemmung der TSH-Sekretion durch IL1 $\beta$  oder TNF $\alpha$ . IL1 $\beta$  stimuliert die Sekretion von Somatostatin, Somatostatin seinerseits hemmt die TSH-Sekretion. Überdies ist die TRH-Sekretion und die pro-TRH-mRNA-Konzentration in Nagern unter Nahrungskarenz reduziert. Aufgrund von Experimenten an Leptin-defizienten Mäusen (Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>) und an Mäusen unter Nahrungskarenz geht man davon aus, dass Leptin die TRH-Genexpression im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus nach oben reguliert, einerseits direkt über hypophysiotrope TRH-Neurone und andererseits über andere hypothalamische Neuronengruppen wie „*Arcuate nucleus POMC and NPY-agouti-related peptide*“ Neurone (1). Folglich tragen Infektion, Entzündung und Nahrungskarenz, unabhängig von den bisher beschriebenen Effekten, ihren Teil zum Bild des „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ bei (1).

Eine Beteiligung der h5'DI an der Pathophysiologie des „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ scheint zwar gegeben, doch ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der h5'DI-Aktivität und TGF $\beta$ <sub>1</sub> konnte nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist die Genese dieses Krankheitsbildes eher multifaktorieller Natur und nicht lediglich durch die Fehlregulation eines einzelnen Enzyms bedingt.

### **5.2.5. Diskussion der Ergebnisse der GH-Stimulation**

Bezüglich der GH-Wirkung auf die h5'DI ist zu beachten, dass die hier vorgestellten Ergebnisse allein aufgrund der Fallzahlen nur Pilotstudien-Charakter haben können und eine statistisch belegte Interpretation der Ergebnissen nicht möglich ist. Nichtsdestotrotz konnte kein Effekt beobachtet werden, wobei die zeitintensive Bestätigung eines mangelnden Effekts aus Kostengründen nicht durchführbar war.

Die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten mit dem Promoter der h5'DI in HepG2-Zellen zeigen, dass GH unter Kostimulation mit T<sub>3</sub> keine Wirkung auf die Promoteraktivität dieses Enzyms ausübt. Auch unter Verwendung von DMEM 4500mg/l D-Glukose zeigt sich GH ohne regulatorische Aktivität. Die gleichen Versuche wurden unter Zuhilfenahme des Deiodase-Assay wiederholt. Auch hier konnte kein Einfluss von GH auf die Aktivität der h5'DI unter Kostimulation mit T<sub>3</sub> in HepG2 nachgewiesen werden, unabhängig ob DMEM F12 oder DMEM-4500mg/l-D-Glukose verwendet wurde. Im Deiodase-Assay und, wenn auch geringer, im Luciferase-Assay führt der Einsatz von DMEM 4500mg/l D-Glukose *per se* zu einer deutlichen Zunahme der h5'DI-Enzym- bzw. -Promoter-Aktivität. Diese Steigerung persistiert auch unter Stimulation mit T<sub>3</sub> sowie unter Kostimulation von GH und T<sub>3</sub>. Somit lässt sich kein GH-spezifischer Effekt vermerken, sondern einzig eine Steigerung der Enzymaktivität der h5'DI durch DMEM 4500mg/l D-Glukose. Daraus leitete sich unmittelbar die Frage ab, ob es sich dabei um einen unspezifischen Effekt des Mediums DMEM 4500mg/l D-Glukose oder um einen spezifischen Effekt der Glukose handelt. Die Überprüfung der Wirkung von Glutamin, D-Glukose und Pyruvat auf die h5'DI im Deiodase-Assay bestätigt, dass es sich um einen unspezifischen Effekt handelt, der womöglich durch eine gesteigerte Proteinsynthese bedingt ist.

Zur Stimulierbarkeit von HepG2-Zellen durch GH und IGF-1 kann die Regulation der humanen Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) angeführt werden. So konnten in HepG2-Zellen anhand von Luciferase-Experimenten die Regulation dieser Enzyms durch GH und IGF-I nachgewiesen werden (135) (141). Von anderen Forschern wurde demonstriert, dass HepG2-Zellen funktionelle Rezeptoren für GH besitzen (136).

Gleichwohl bleibt die Wirkung von GH auf die humane Schilddrüsenhormonachse unzweifelhaft, da die GH-Substitution von Erwachsenen zu einer Veränderung des Schilddrüsenhormonhaushalts führt. So hat die Behandlung euthyreoter Individuen mit GH eine Erhöhung des Plasma T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>-Quotienten und eine Erniedrigung des Plasma rT<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>-Quotienten zur Folge (83). Da bei gleichzeitig T<sub>4</sub>-substituiertem zentralem Hypothyreoidismus die Ursache dieser Veränderungen in der Peripherie liegen muss, kann es sich deshalb nur um eine gesteigerte Aktivität der h5'DI oder um eine verminderte Aktivität der h5DIII handeln. In der Leber von Hühnern übt GH zumindest auf die 5DIII einen analogen Effekt aus (6). Möglicherweise sind die TH-Veränderungen unter Therapie mit GH durch die verminderte Aktivität der h5DIII bedingt.

Wie bereits in Kapitel 1.7.1. beschrieben, hat sich G. Van den Berghe im Detail mit den theoretischen Grundlagen der physiopathologischen Veränderungen der somatotropen Hormonachse in intensivpflichtigen Patienten beschäftigt. In der initialen Akute-Phase-Reaktion (h bis d) ist sowohl die pulsatile Freisetzung von GH als auch die interpulsatile GH-Konzentration gesteigert. Zusätzlich ist die GH-Pulsfrequenz erhöht. Diese Veränderungen werden als erworbene periphere GH-Resistenz gedeutet. Hingegen wird in der chronischen Phase schwerer Krankheit (nach 7-10 d) die pulsatile Freisetzung von GH unter intensivmedizinischer Behandlung zunehmend unkoordinierter. Die GH-Konzentration der pulsatilen Freisetzung ist niedriger als in der Akute-Phase-Reaktion, aber höher als unter physiologischen Bedingungen. Die Pulsfrequenz bleibt ebenso erhöht (82) (139). Da sich in den hier vorgelegten Ergebnissen die h5'DI von GH unbeeinflusst zeigt, lässt sich folglich kein Zusammenhang zwischen den physiopathologischen Veränderungen der somatotropen Hormonachse in intensivpflichtigen Patienten und dem „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ herstellen.

Im Zusammenhang mit einer möglichen indirekten Wirkung von gonadalen Steroiden auf die 5'DI bleibt die geschlechtsabhängige GH- und IGF-I-Regulation der hepatischen Genexpression zu diskutieren.

D.J. Waxmann und dessen Mitarbeiter haben sich eingehend mit dem Einfluss von GH auf die Transkription der murinen Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monoxygenasen (CYP) auf der Basis eines unterschiedlichen GH-Sekretionsmusters mit einer geschlechtsspezifischen Aktivierung von STATs beschäftigt (134) (143).

Der Hauptunterschied des GH-Sekretionsmusters zwischen weiblichen und männlichen Ratten ist das interpulsatile Intervall mit geringem oder fehlendem GH-Plasmakonzentrationsnachweis in männlichen Ratten. Adulte männliche Ratten weisen ca. alle 3,5 h GH-Werte von bis zu 200 ng/ml auf, gefolgt von einem ungefähr 2 h dauernden, GH-freien Intervall. Adulte weibliche Ratten hingegen sind charakterisiert durch eine höherfrequente GH-Sekretion mit einem nahezu konstanten Plasma-GH-Spiegel von ungefähr 30 - 60 ng/ml. Das GH-freie Intervall ist für das geschlechtsspezifische Expressionsprofil hepatischer Gene in männlichen Tieren essentiell. In männlichen Tieren wird nämlich unter konstanter Infusion von GH das männliche Expressionsmuster hepatischer Gene durch ein weibliches Expressionsmuster ersetzt. GH aktiviert unter anderem folgende 4 Transkriptionsfaktoren: STAT1, STAT3, STAT5a und STAT5b. Im Wesentlichen wird STAT5b durch den wiederholten männlichen GH-Puls phosphoryliert und damit aktiviert, was letztlich für das sexuell dimorphe



Expressionsprofil hepatischer Gene verantwortlich ist. Dies konnte durch Experimente an STAT5b-defizienten Mäusen bestätigt werden (134) (143).

Die hepatische Cytochrom-P<sub>450</sub>-Monooxygenase (CYP) 2C12 wird in weiblichen Tieren spezifisch durch die hepatischen Transkriptionsfaktoren HNF-3 $\beta$ , HNF-6 und „*CCAAT/enhancer binding protein*“ (C/EBP) reguliert. So konnte gezeigt werden, dass eine hohe und für männliche Tiere spezifische Konzentration von STAT5b die Wirkung von HNF-6 und HNF-3 $\beta$  antagonisiert und die Expression der CYP2C12 hemmt (134). Im Gegensatz hierzu steht die für männliche Ratten spezifische, hepatische CYP2C11 unter dem Einfluss von HNF-3 $\beta$ , HNF-1 $\alpha$  und HNF-4 $\alpha$ . Die STAT5b-abhängige Hemmung der durch HNF-3 $\beta$  stimulierten CYP2C11-Promoteraktivität zeigt jedoch die für HepG2-Zellen bekannte Problematik. So ist ein für weibliche Tiere spezifisches GH-Sekretionsmuster unter konstanter Zugabe von GH in HepG2-Zellen gut simulierbar, wohingegen die Simulation eines männlichen pulsatilen GH-Sekretionsmusters aufgrund der langsamen Inaktivierung von STAT5b in HepG2-Zellen nicht möglich zu sein scheint (143). Eine Wirkung von STAT5b auf den CYP2C11-Promoter konnte in Transfektionsexperimenten nicht nachgewiesen werden, wobei regulatorische Elemente möglicherweise im 5'-flankierenden und nicht untersuchten Promoterbereich liegen. Das geschlechtsspezifische Sekretionsmuster von GH zeigt, dass GH indirekt Einfluss auf die geschlechtsspezifische Expression hepatischer Gene nehmen kann.

Zusätzlich ist die Wirkung von GH auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel zum Teil durch IGF-I vermittelt (137). Möglicherweise steht die hepatische h5'DI primär nicht nur unter dem Einfluss von GH, sondern sekundär im Sinne einer auto- oder parakrinen Regulation außerdem unter dem Einfluss von IGF-I. IGF-I zeigt eine geschlechtsspezifische, Testosteron-abhängige Regulation (141). Experimente von Y. Wu *et al.* konnten zeigen, dass Testosteron die Reporterogenaktivität des IGF-I-Promoters in HepG2- und LNCaP-Zellen steigert, indem Testosteron und AR in Hepatozyten und Prostataepithel im 5'-untranslatierten Bereich des IGF-I-Gens an zwei Androgen-responsive Elemente an Position -1320 und -1420 binden. Die durch Testosteron induzierte Expression von IGF-I vermag so möglicherweise zum anabolen und wachstumsstimulierenden Effekt von Testosteron beizutragen (141). M. Hussain hat einen stimulatorischen Effekt von IGF-I auf die h5'DI nachweisen können (137). Ob die autokrine Regulation in HepG2-Zellen adäquat reguliert ist und ob IGF-I indirekt die h5'DI reguliert, kann nicht gesagt werden.

---

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass auch die thyrotrope Hormonachse einen Einfluss auf die somatotrope Hormonachse auszuüben scheint. Hypothyreote Erwachsene weisen eine verminderte Konzentration an IGF-I auf. In hyperthyreoten Patienten werden im Gegensatz dazu erhöhte oder normale IGF-I-Konzentrationen gemessen, wobei die freie IGF-I-Konzentration allerdings gleich bleibt und sich nicht in Abhängigkeit von der Schilddrüsenfunktion ändert (138) (140).

Da sich thyrotrope und somatotrope Hormonachse gegenseitig beeinflussen und nicht nur ein direkter GH-Effekt auf der Basis einer geschlechtsspezifischen hepatischen Genexpression durch das GH-Sekretionsprofil, sondern auch ein indirekter IGF-I-Effekt im Rahmen einer geschlechtsspezifischen Regulation der hepatischen IGF-I-Synthese möglich zu sein scheint, lässt sich letztlich nicht ermitteln, welchen Einfluss die somatotrope Hormonachse auf die Promoter- oder Enzymaktivität der h5'DI ausübt.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Erkrankungen der Schilddrüse treten im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung des Menschen vermehrt aufseiten des weiblichen Geschlechts auf. Eine erhöhte Belastung von Frauen mit Sexualsteroiden bedingt durch Pubertät, Gravidität und Klimakterium wird dafür verantwortlich gemacht. In männlichen Ratten wird die hepatische Genexpression der 5'-Deiodase Typ I (5'DI) durch Testosteron transkriptional aktiviert. Die 5'DI hat eine besondere Stellung im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone, da sie Schilddrüsenhormone nicht nur aktivieren, sondern auch inaktivieren kann. Möglicherweise vermag eine Regulation der humanen 5'DI durch gonadale Steroide diese geschlechtsakzentuierte Verteilung von Schilddrüsenerkrankungen im Menschen ansatzweise zu erklären.

Die Wirkung von Steroiden wird durch nukleäre Hormonrezeptoren vermittelt, die mit ihren Liganden an den Promoterbereich eines Gens binden und damit die Transkription dieses Gens beeinflussen. Mit Hilfe der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 wurde zum einen anhand des Luciferase-Reporter-Gen-Assays die Promoteraktivität der 5'DI auf ihre Steroidresponsivität hin untersucht. Zum anderen wurde durch den Deiodase-Assay die Enzymaktivität der 5'DI unter dem Einfluss gonadaler Steroide direkt bestimmt. Weder mittels Luciferase-Assay noch mittels Deiodase-Assay ließ sich eine steroidabhängige Regulation der 5'DI durch den reinen Androgenagonisten R1881 bzw. Estradiol nachweisen. Nur der bekannte stimulatorische Effekt durch  $T_3$  und die ebenfalls bekannte Selen-abhängige Expression der 5'DI als Selenoprotein konnten reproduziert werden. Auch die transiente Transfektion von HepG2-Zellen mit den Steroidrezeptoren AR bzw. ER $\alpha$ , gefolgt von der Bestimmung der Deiodaseaktivität nach Stimulation mit den entsprechenden Liganden R1881 bzw. Estradiol, führte nicht zu einem positiven Resultat. Es konnte somit kein direkter Einfluss von gonadalen Steroidhormonen auf die Expression und Funktion der humanen 5'DI nachgewiesen werden.

Die Steroidregulation der 5'DI ist thematisch mit der Pathophysiologie des „*Low T<sub>3</sub> Syndromes*“ verbunden. Das „*Low T<sub>3</sub> Syndrome*“ ist gekennzeichnet durch erniedrigte  $T_3$ -Werte und erhöhte  $rT_3$ -Werte. Verursacht werden diese Veränderungen durch eine erhöhte Aktivität der humanen 5-Deiodase Typ III (5DIII) und durch eine verminderte Aktivität der humanen 5'DI. Die Transkription der 5DIII wird durch TGF $\beta_1$  gesteigert. Deshalb wurde der Einfluss von TGF $\beta_1$  auf die Deiodaseaktivität von HepG2-Zellen untersucht. Eine

---

konzentrationsabhängige Hemmung der humanen 5'DI durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> konnte jedoch nicht festgestellt werden. Da bei intensivpflichtigen Patienten nicht nur die thyreotrope, sondern auch die somatotrope Hormonachse pathologisch verändert ist, war es außerdem von Interesse zu prüfen, welchen Effekt GH auf die Enzymaktivität der humanen 5'DI in HepG2-Zellen ausübt. Auch hier konnte nur der T<sub>3</sub>-Effekt reproduziert werden, während GH alleine keinen Einfluss zu nehmen scheint. Folglich konnte weder die Ursache der pathophysiologischen Veränderungen des „*Low T<sub>3</sub> Syndromes*“ näher definiert werden noch ließ sich ein direkter Einfluss von GH auf die 5'DI nachweisen.

Die Wirkung der einzelnen Hormone auf die Expression und Enzymaktivität der humanen 5'DI wird im Menschen möglicherweise nicht nur durch direkte, sondern auch durch indirekte Effekte vermittelt. Hinzukommt, dass in Mäusen das geschlechtsabhängige Expressionsmuster der 5'DI über selenabhängige prä- und posttranskriptionale Regulationsmechanismen kontrolliert wird. Außerdem müssen die hier vorliegenden Ergebnisse nicht zwangsläufig physiologischen Bedingungen entsprechen, da epigenetische Alterationen in Zellen karzinomatösen Ursprungs die Wirkung von Hormonen beeinflussen können.

---

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, et al. Williams Textbook of Endocrinology. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2003.
2. Peeters RP, Wouters PJ, Kaptein E, van Toor H, Visser TJ, Van den Berghe G. Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jul;88(7):3202-11.
3. Huang SA, Mulcahey MA, Crescenzi A, Chung M, Kim BW, Barnes C, et al. Transforming growth factor-beta promotes inactivation of extracellular thyroid hormones via transcriptional stimulation of type 3 iodothyronine deiodinase. *Mol Endocrinol.* 2005 Dec;19(12):3126-36.
4. Van den Berghe G. Growth hormone secretagogues in critical illness. *Horm Res.* 1999;51 Suppl 3:21-8.
5. Mesotten D, Wouters PJ, Peeters RP, Hardman KV, Holly JM, Baxter RC, et al. Regulation of the somatotrophic axis by intensive insulin therapy during protracted critical illness. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3105-13.
6. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):38-89.
7. Köhrle J. Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol.* 2002;347:125-67.
8. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001 Jul;81(3):1097-142.
9. Malik R, Hodgson H. The relationship between the thyroid gland and the liver. *Qjm.* 2002 Sep;95(9):559-69.
10. Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, et al. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):580-9.
11. Visser TJ. Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med Austriaca.* 1996;23(1-2):10-6.
12. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie.* 7. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer; 2003.

13. Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, et al. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med.* 2004 Jun;10(6):638-42.
14. Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, et al. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology.* 2004 Dec 1;205(1-2):95-102.
15. Larsen PR, Wilson JD, Williams RH. *Williams Textbook of Endocrinology.* 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia [u.a.]: Saunders; 1998.
16. Utiger RD. Estrogen, thyroxine binding in serum, and thyroxine therapy. *N Engl J Med.* 2001 Jun 7;344(23):1784-5.
17. Köhrle J, Brigelius-Flohe R, Bock A, Gartner R, Meyer O, Flohe L. Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol Chem.* 2000 Sep-Oct;381(9-10):849-64.
18. Köhrle J. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie.* 1999 May;81(5):527-33.
19. Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature.* 1991 Jan 31;349(6308):438-40.
20. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science.* 2003 May 30;300(5624):1439-43.
21. Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, Flohe L, Sendtner M, Köhrle J. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J.* 2003 Mar 1;370(Pt 2):397-402.
22. Mostert V, Wolff S, Dreher I, Köhrle J, Abel J. Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor-beta. *Eur J Biochem.* 2001 Dec;268(23):6176-81.
23. Mostert V, Dreher I, Köhrle J, Wolff S, Abel J. Modulation of selenoprotein P expression by TGF-beta(1) is mediated by Smad proteins. *Biofactors.* 2001;14(1-4):135-42.
24. Campos-Barros A, Hoell T, Musa A, Sampaolo S, Stoltenburg G, Pinna G, et al. Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone

- concentrations in the human central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Jun;81(6):2179-85.
25. Nishikawa M, Toyoda N, Yonemoto T, Ogawa Y, Tabata S, Sakaguchi N, et al. Quantitative measurements for type 1 deiodinase messenger ribonucleic acid in human peripheral blood mononuclear cells: mechanism of the preferential increase of T3 in hyperthyroid Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Sep 29;250(3):642-6.
  26. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology.* 1996 Aug;137(8):3308-15.
  27. Streckfuss F, Hamann I, Schomburg L, Michaelis M, Sapin R, Klein MO, et al. Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Nov 18;337(2):739-45.
  28. Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol.* 2001 Dec;15(12):2137-48.
  29. Huang H, Marsh-Armstrong N, Brown DD. Metamorphosis is inhibited in transgenic *Xenopus laevis* tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 2;96(3):962-7.
  30. Braverman LE, Utiger RD. *Werner & Ingbar's the thyroid.* 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia [u.a.]: Lippincott-Raven; 2000.
  31. Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans.* 2005 Feb;33(Pt 1):228-32.
  32. Evans R. A transcriptional basis for physiology. *Nat Med.* 2004 Oct;10(10):1022-6.
  33. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4<sup>th</sup> ed. New York, NY: Garland; 2002.
  34. Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 Mar;14(2):85-90.
  35. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:439-66.

36. Yen PM, Feng X, Flamant F, Chen Y, Walker RL, Weiss RE, et al. Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep.* 2003 Jun;4(6):581-7.
37. Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE. Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem.* 1995 Jun 16;270(24):14274-80.
38. Tagami T, Madison LD, Nagaya T, Jameson JL. Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biol.* 1997 May;17(5):2642-8.
39. Sadow PM, Chassande O, Gauthier K, Samarut J, Xu J, O'Malley BW, et al. Specificity of thyroid hormone receptor subtype and steroid receptor coactivator-1 on thyroid hormone action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Jan;284(1):E36-46.
40. Lazar MA. Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(4):497-9.
41. Weiss RE, Murata Y, Cua K, Hayashi Y, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone action on liver, heart, and energy expenditure in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Endocrinology.* 1998 Dec;139(12):4945-52.
42. Oberste-Berghaus C, Zanger K, Hashimoto K, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE. Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators. *J Biol Chem.* 2000 Jan 21;275(3):1787-92.
43. Yen PM. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 Sep;14(7):327-33.
44. Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, et al. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res.* 1997;52:141-64; discussion 64-5.
45. Makowski A, Brzostek S, Cohen RN, Hollenberg AN. Determination of nuclear receptor corepressor interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 2003 Feb;17(2):273-86.
46. Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, et al. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 2;98(1):349-54.



47. Wikstrom L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, et al. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *Embo J*. 1998 Jan 15;17(2):455-61.
48. Amma LL, Campos-Barros A, Wang Z, Vennstrom B, Forrest D. Distinct tissue-specific roles for thyroid hormone receptors beta and alpha1 in regulation of type 1 deiodinase expression. *Mol Endocrinol*. 2001 Mar;15(3):467-75.
49. Liu Y, Xia X, Fondell JD, Yen PM. Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of co-activator recruitment and histone acetylation. *Mol Endocrinol*. 2006 Mar;20(3):483-90.
50. Viguerie N, Langin D. Effect of thyroid hormone on gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 Jul;6(4):377-81.
51. Moeller LC, Dumitrescu AM, Walker RL, Meltzer PS, Refetoff S. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):936-43.
52. Feng X, Jiang Y, Meltzer P, Yen PM. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocrinol*. 2000 Jul;14(7):947-55.
53. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett*. 2003 May 22;543(1-3):5-10.
54. Silva JE. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003 Aug 5;139(3):205-13.
55. Medina-Gomez G, Hernandez A, Calvo RM, Martin E, Obregon MJ. Potent thermogenic action of triiodothyroacetic acid in brown adipocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Sep;60(9):1957-67.
56. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, et al. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108(1):97-105.
57. Freaque HC, Oppenheimer JH. Thermogenesis and thyroid function. *Annu Rev Nutr*. 1995;15:263-91.
58. Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser F, Schmid M, Köhrle J. Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics*. 1997 Jun 1;42(2):361-3.

- 
59. Jakobs TC, Schmutzler C, Meissner J, Köhrle J. The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene--mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element. *Eur J Biochem.* 1997 Jul 1;247(1):288-97.
  60. Peeters RP, van Toor H, Klootwijk W, de Rijke YB, Kuiper GG, Uitterlinden AG, et al. Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jun;88(6):2880-8.
  61. Toyoda N, Zavacki AM, Maia AL, Harney JW, Larsen PR. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995 Sep;15(9):5100-12.
  62. Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1156-63.
  63. Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J. Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Sep;79(3):791-8.
  64. Schmutzler C, Köhrle J. Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid.* 2000 May;10(5):393-406.
  65. Auf Dem Brinke D, Hesch RD, Köhrle J. Re-examination of the subcellular localization of thyroxine 5'-deiodination in rat liver. *Biochem J.* 1979 May 15;180(2):273-9.
  66. Fekkes D, van Overmeeren-Kapteijn E, Docter R, Hennemann G, Visser TJ. Location of rat liver iodothyronine deiodinating enzymes in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 1979 Sep 20;587(1):12-9.
  67. Safran M, Leonard JL. Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem.* 1991 Feb 15;266(5):3233-8.
  68. Visser TJ. Mechanism of action of iodothyronine-5'-deiodinase. *Biochim Biophys Acta.* 1979 Aug 15;569(2):302-8.
  69. Visser TJ, Fekkes D, Docter R, Hennemann G. Kinetics of enzymic reductive deiodination of iodothyronines. Effect of pH. *Biochem J.* 1979 Jun 1;179(3):489-95.

70. Ogawa Y, Nishikawa M, Toyoda N, Yonemoto T, Gondou A, Inada M. Age- and sex-related changes in type-1 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat liver and kidney. *Horm Metab Res.* 1999 May;31(5):295-9.
71. Miyashita K, Murakami M, Iriuchijima T, Takeuchi T, Mori M. Regulation of rat liver type 1 iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endocrinol.* 1995 Dec 29;115(2):161-7.
72. Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Gotz F, Köhrle J, Schweizer U, et al. Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology.* 2006 Dec;147(12):5883-92.
73. Fannon SA, Vidaver RM, Marts SA. An abridged history of sex steroid hormone receptor action. *J Appl Physiol.* 2001 Oct;91(4):1854-9.
74. Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J.* 1996 Nov 1;319 ( Pt 3):657-67.
75. Gartner R. [Subclinical hypothyroidism--does it have to be treated?]. *MMW Fortschr Med.* 2004 Sep 23;146(39):37-9.
76. Jakobs TC, Mentrup B, Schmutzler C, Dreher I, Köhrle J. Proinflammatory cytokines inhibit the expression and function of human type I 5'-deiodinase in HepG2 hepatocarcinoma cells. *Eur J Endocrinol.* 2002 Apr;146(4):559-66.
77. Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I, Hershman JM. Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1994 May;101(1-2):R31-5.
78. Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Berlin [u.a.]: Springer; 1999.
79. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(2-3):111-9.
80. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003 Oct 9;425(6958):577-84.
81. Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J. Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells. *J Biol Chem.* 1997 Nov 14;272(46):29364-71.

- 
82. Van den Berghe G. Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness. *Eur J Endocrinol.* 2000 Jul;143(1):1-13.
  83. Jorgensen JO, Pedersen SA, Laurberg P, Weeke J, Skakkebaek NE, Christiansen JS. Effects of growth hormone therapy on thyroid function of growth hormone-deficient adults with and without concomitant thyroxine-substituted central hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989 Dec;69(6):1127-32.
  84. Strasburger CJ. Effekte von Wachstumshormon im Erwachsenenalter. [Habilitationsschrift ] München: LMU; 1999.
  85. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001 Feb;22(1):53-74.
  86. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jun;278(6):E967-76.
  87. Holt RI, Simpson HL, Sonksen PH. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis. *Diabet Med.* 2003 Jan;20(1):3-15.
  88. MacGorman LR, Rizza RA, Gerich JE. Physiological concentrations of growth hormone exert insulin-like and insulin antagonistic effects on both hepatic and extrahepatic tissues in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981 Sep;53(3):556-9.
  89. Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen P, et al. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem.* 1989;34(1-6):307-10.
  90. Green S, Issemann I, Sheer E. A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. *Nucleic Acids Res.* 1988 Jan 11;16(1):369.
  91. Lottspeich F, et al. *Bioanalytik.* 1. Aufl. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akademischer Verlag; 1998.
  92. Ernst M, Schmid C, Froesch ER. Phenol red mimics biological actions of estradiol: enhancement of osteoblast proliferation in vitro and of type I collagen gene expression in bone and uterus of rats in vivo. *J Steroid Biochem.* 1989 Nov;33(5):907-14.
  93. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

94. Leonard JL, Rosenberg IN. Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology*. 1980 Nov;107(5):1376-83.
95. Moreno M, Berry MJ, Horst C, Thoma R, Goglia F, Harney JW, et al. Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS Lett*. 1994 May 16;344(2-3):143-6.
96. Weiß C. *Basiswissen medizinische Statistik*. 2. Aufl. Berlin [u.a.] Springer; 2002.
97. Pilo A, Iervasi G, Vitek F, Ferdeghini M, Cazzuola F, Bianchi R. Thyroidal and peripheral production of 3,5,3'-triiodothyronine in humans by multicompartmental analysis. *Am J Physiol*. 1990 Apr;258(4 Pt 1):E715-26.
98. Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Effect of 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) administration on *dio1* gene expression and T3 metabolism in normal and type 1 deiodinase-deficient mice. *Endocrinology*. 1995 Nov;136(11):4842-9.
99. Taneja R, Roy B, Plassat JL, Zusi CF, Ostrowski J, Reczek PR, et al. Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR beta 2 and *Hoxa-1* activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):6197-202.
100. Lindl T. *Zell- und Gewebekultur*. 4. Aufl. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akademischer Verlag; 2000.
101. Lin KH, Zhu XG, Shieh HY, Hsu HC, Chen ST, McPhie P, et al. Identification of naturally occurring dominant negative mutants of thyroid hormone alpha 1 and beta 1 receptors in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Endocrinology*. 1996 Oct;137(10):4073-81.
102. Feng X, Jiang Y, Meltzer P, Yen PM. Transgenic targeting of a dominant negative corepressor to liver blocks basal repression by thyroid hormone receptor and increases cell proliferation. *J Biol Chem*. 2001 May 4;276(18):15066-72.
103. Menjo M, Murata Y, Fujii T, Nimura Y, Seo H. Effects of thyroid and glucocorticoid hormones on the level of messenger ribonucleic acid for iodothyronine type I 5'-deiodinase in rat primary hepatocyte cultures grown as spheroids. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):2984-90.
104. Menjo M, Yamaguchi S, Murata Y, Hayashi Y, Nagaya T, Ohmori S, et al. Responsiveness to thyroid hormone is enhanced in rat hepatocytes cultured as spheroids compared with that in monolayers: altered responsiveness to thyroid

- hormone possibly involves complex formed on thyroid hormone response elements. *Thyroid*. 1999 Sep;9(9):959-67.
105. Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, et al. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol*. 1997 Aug;11(9):1278-90.
  106. Wetzel M, Weitzel J. Genomischer T3-Effekt: in vivo upregulated, in HepG2 downregulated. [Vortrag] 19. AESF; 2003; Halle, Germany; 2003.
  107. Maia AL, Harney JW, Larsen PR. Is there a negative TRE in the luciferase reporter cDNA? *Thyroid*. 1996 Aug;6(4):325-8.
  108. Tillman JB, Crone DE, Kim HS, Sprung CN, Spindler SR. Promoter independent down-regulation of the firefly luciferase gene by T3 and T3 receptor in CV1 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1993 Sep;95(1-2):101-9.
  109. Yu J, Koenig RJ. Regulation of hepatocyte thyroxine 5'-deiodinase by T3 and nuclear receptor coactivators as a model of the sick euthyroid syndrome. *J Biol Chem*. 2000 Dec 8;275(49):38296-301.
  110. Mentrup B. Abstracts of the 46th annual meeting of the German Society of Endocrinology. Göttingen, February 27-March 2, 2002. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002;110 Suppl 1:S1-98.
  111. Bartalena L. Recent achievements in studies on thyroid hormone-binding proteins. *Endocr Rev*. 1990 Feb;11(1):47-64.
  112. Yamaguchi S, Murata Y, Nagaya T, Hayashi Y, Ohmori S, Nimura Y, et al. Glucocorticoids increase retinoid-X receptor alpha (RXRalpha) expression and enhance thyroid hormone action in primary cultured rat hepatocytes. *J Mol Endocrinol*. 1999 Feb;22(1):81-90.
  113. Linja MJ, Porkka KP, Kang Z, Savinainen KJ, Janne OA, Tammela TL, et al. Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 1;10(3):1032-40.
  114. Zhu YS, Yen PM, Chin WW, Pfaff DW. Estrogen and thyroid hormone interaction on regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12587-92.

115. Takeuchi Y, Murata Y, Sadow P, Hayashi Y, Seo H, Xu J, et al. Steroid receptor coactivator-1 deficiency causes variable alterations in the modulation of T(3)-regulated transcription of genes in vivo. *Endocrinology*. 2002 Apr;143(4):1346-52.
116. Zilz ND, Murray MB, Towle HC. Identification of multiple thyroid hormone response elements located far upstream from the rat S14 promoter. *J Biol Chem*. 1990 May 15;265(14):8136-43.
117. Lutz M, Burke LJ, LeFevre P, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, et al. Thyroid hormone-regulated enhancer blocking: cooperation of CTCF and thyroid hormone receptor. *Embo J*. 2003 Apr 1;22(7):1579-87.
118. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*. 1987 Dec 24;51(6):1079-90.
119. Pang RT, Lee LT, Ng SS, Yung WH, Chow BK. CpG methylation and transcription factors Sp1 and Sp3 regulate the expression of the human secretin receptor gene. *Mol Endocrinol*. 2004 Feb;18(2):471-83.
120. Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J*. 1994 Aug 15;13(16):3843-51.
121. Dennig J, Beato M, Suske G. An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *Embo J*. 1996 Oct 15;15(20):5659-67.
122. Lee LT, Tan-Un KC, Pang RT, Lam DT, Chow BK. Regulation of the human secretin gene is controlled by the combined effects of CpG methylation, Sp1/Sp3 ratio, and the E-box element. *Mol Endocrinol*. 2004 Jul;18(7):1740-55.
123. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):905-14.
124. Mentrup B. Abstracts of the 28th Annual Meeting of the European Thyroid Association. Goteborg, Sweden, September 7-11, 2002. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(7 Suppl):1-139.
125. Reik W, Murrell A. Genomic imprinting. Silence across the border. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):408-9.

126. Nair SK, Burley SK. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*. 2003 Jan 24;112(2):193-205.
127. Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, Davis FB. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem*. 2000 Dec 1;275(48):38032-9.
128. Christianson D, Roti E, Vagenakis AG, Braverman LE. The sex-related difference in serum thyrotropin concentration is androgen mediated. *Endocrinology*. 1981 Feb;108(2):529-35.
129. Gartner R, Henze R, Horn K, Pickardt CR, Scriba PC. Thyroxine-binding globulin: investigation of microheterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981 Apr;52(4):657-64.
130. Ain KB, Mori Y, Refetoff S. Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Oct;65(4):689-96.
131. Glinoe D, McGuire RA, Gershengorn MC, Robbins J, Berman M. Effects of estrogen on thyroxine-binding globulin metabolism in rhesus monkeys. *Endocrinology*. 1977 Jan;100(1):9-17.
132. Glinoe D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. *Endocr Rev*. 1997 Jun;18(3):404-33.
133. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2571-9.
134. Waxman DJ, O'Connor C. Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression. *Mol Endocrinol*. 2006 Nov;20(11):2613-29.
135. Araya Z, Tang W, Wikvall K. Hormonal regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene CYP27A1. *Biochem J*. 2003 Jun 1;372(Pt 2):529-34.
136. Parini P, Angelin B, Lobie PE, Norstedt G, Rudling M. Growth hormone specifically stimulates the expression of low density lipoprotein receptors in human hepatoma cells. *Endocrinology*. 1995 Sep;136(9):3767-73.
137. Hussain MA, Schmitz O, Jorgensen JO, Christiansen JS, Weeke J, Schmid C, et al. Insulin-like growth factor I alters peripheral thyroid hormone metabolism in humans: comparison with growth hormone. *Eur J Endocrinol*. 1996 May;134(5):563-7.



- 
138. Peeters RP, van den Beld AW, van Toor H, Uitterlinden AG, Janssen JA, Lamberts SW, et al. A polymorphism in type I deiodinase is associated with circulating free insulin-like growth factor I levels and body composition in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jan;90(1):256-63.
  139. Van den Berghe G. Endocrine changes in critically ill patients. *Growth Horm IGF Res.* 1999 Apr;9 Suppl A:77-81.
  140. Zimmermann-Belsing T, Juul A, Juul Holst J, Feldt-Rasmussen U. The insulin-like growth axis in patients with autoimmune thyrotoxicosis: effect of antithyroid drug treatment. *Growth Horm IGF Res.* 2004 Jun;14(3):235-44.
  141. Wu Y, Zhao W, Zhao J, Pan J, Wu Q, Zhang Y, Bauman WA, et al. Identification of Androgen Response Elements in the Insulin-Like Growth Factor I Upstream Promoter. *Endocrinology* 2007 Mar; 148(6):2984-2993.
  142. Köhrle J, Schomburg L, Drescher S, Fekete E, Bauer K. Rapid stimulation of type I 5'-deiodinase in rat pituitaries by 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Mol Cell Endocrinol.* 1995 Feb;108(1-2):17-21.
  143. Park SH, Waxman DJ. Inhibitory Cross-talk between STAT5b and Liver Nuclear Factor HFN3 $\beta$ . *J Biol Chem.* 2001 Sep;276(46):43031-39.
  144. Wagner C. Charakterisierung von regulatorischen Elementen des Promoters der humanen Typ I 5'-Deiodase. [Diplomarbeit] Würzburg: Julius-Maximilians-Universität; 1998.

## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A, a	Adenin
Abb.	Abbildung
AF	„ <i>Activation function</i> “, Aktivierungs-Element
ALS	„ <i>Acid-labile subunit</i> “, Protein zur Stabilisierung von IGF-1 im Serum.
ANOVA	„ <i>Analysis of varianz</i> “, Varianzanalyse
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
BAT	„ <i>Brown adipose tissue</i> “, Braunes Fettgewebe
bp	„ <i>Base-pairs</i> “, Basenpaare
BMR	Grundumsatz, „ <i>basal metabolic rate</i> “, Ruheumsatz, „ <i>resting metabolic rate</i> “
BSA	Bovines Serumalbumin
C, c	Cytosin
cDNA	Komplementäre DNA: DNA, die der mRNA eines Proteins identisch ist, also keine Exon-Intron-Sequenzunterschiede aufweist und somit in Prokaryonten untersucht werden kann.
cpm	„ <i>Counts per minute</i> “
CTCF	„ <i>CCCTC-binding factor</i> “
CYP	Cytochrom-P <sub>450</sub> -Monoxygenase
d	Tag
D, Da	Dalton, siehe u
5´DI	5´-Iodthyronindeiodase Typ I
5´DII	5´-Iodthyronindeiodase Typ II
5DIII	5-Iodthyronindeiodase Typ III
h5´DIpr	pGL2h5´DIpr, Reportergenkonstrukt aus h5´DI-Promoter und Luciferasegen
DBD	DNA-Bindungsdomäne der TRs
DCC-FCS	steroidfreies fetales Kälberserum, „ <i>Dextran-Charcoal-FCS</i> “
DEAE	Diethylaminoethanol
Dex	Dexamethason
DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
DIT	Diiodyrosin
<i>DioI</i>	Gen der h5´DI
DMEM	„ <i>Dulbecco´s modified Eagle´s Medium</i> “

---

DMEM F12	DMEM/NUT MIX F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„ <i>Deoxyribonucleic acid</i> “, Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DOPE	Dioleoyl-phosphatidylethanolamine
DOSPA	2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DR	„ <i>Direct repeat</i> “, direkte Wiederholung der Halbseiten eines TREs [→→]
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E <sub>1</sub>	Estron
E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF <sub>SEC</sub>	„ <i>Sec-specific elongation factor</i> “
ERα	Estrogenrezeptor α
ERβ	Estrogenrezeptor β
ERBA1	TRα
ERBA2	TRβ
EthBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F12	„ <i>Ham's Nutrient Mixture F12</i> “
FCS	„ <i>Foetal bovine serum</i> “, fetales Kälberserum
fT <sub>3</sub>	freies, ungebundenes T <sub>3</sub>
fT <sub>4</sub>	freies, ungebundenes T <sub>4</sub>
FU	„ <i>Fluorescence units</i> “
G, g	Guanin
g	Gramm
GAS	„ <i>IFN-γ activation site</i> “, IFN-γ-responsives Element
GH	„ <i>Growth hormone</i> “, Somatotropin
GHBP	„ <i>GH binding protein</i> “
GHDA	adulte GH-Defizienz
GHRH	„ <i>Growth hormone releasing hormone</i> “, siehe SRH

---

GHRH	„ <i>Growth hormone release inhibiting hormone</i> “, siehe SIH
GPx	Glutathionperoxidasen
GRE	„ <i>Glucocorticoid response element</i> “
h	1. humane, -es, 2. Stunde
h5´DI	humane 5´-Iodthyronindeiodase Typ 1
h $\nu$	Strahlung der Energie $E = h \cdot \nu$ (h = Planck-Wirkungsquantum, $\nu$ = Frequenz)
HAT	Histonacetyltransferase
HBSS	„ <i>Hank´s balanced salt solution</i> “
HCG	humanes Choriongonadotropin
HDAC	Histondeacetylase
HEK 293	humane embryonale Nierenzelllinie
HepG2	humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie
HEPES	2-[4-(2 Hydroxyethyl)-1 piperazinyl]-ethansulfonsäure
HG	„ <i>High-glucose-medium</i> “ DMEM-4500mg/l-D-Glukose
hnRNA	Heterogene nucleäre RNA, primäres Transkriptionsprodukt
I	Symbol für chemisches Element Iod, ältere Nomenklatur Jod
I.E.	Internationale Einheiten bzw. „ <i>international unit</i> “ [IU] bzw. „ <i>unit</i> “ [U]; Enzymmenge, die die Umwandlung von 1 $\mu$ mol Substrat pro min katalysiert, neuere Einheit Katal [kat].
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGF-I	„ <i>Insulin-like growth factor 1</i> “, Somatomedin C
IGF-II	„ <i>Insulin-like growth factor 2</i> “, Somatomedin A
IGFBP	„ <i>IGF binding protein</i> “
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRD	„ <i>Inner-ring deiodinations</i> “, 5-Deiodierung am inneren Tyrosylring der THs
ITHs	Iodthyronine
IU	„ <i>International unit</i> “ [IU]; siehe I.E.
JAK	„ <i>Janus activated kinase</i> “
kb	„ <i>Kilobases</i> “
kDa	Kilodalton, siehe u
KIE	Kallikrein-Inaktivator-Einheiten
KO	Knockout

---

$K_m$	Michaelis Konstante: Substratkonzentration, bei der die Hälfte der max. Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wird.
l	Liter
LBD	Ligandenbindungsdomäne der TRs
LB-Medium	„ <i>Luria Bertani medium</i> “
LH	Luteinisierendes Hormon
M	molar = mol/l
m	milli
MAD	„ <i>MAX dimerization protein, transcriptional repressor</i> “
MAPK	„ <i>Mitogen-activated protein kinase</i> “
MAX	„ <i>MYC-associated factor x protein</i> “, MAX Protein
MCT8	„ <i>Monocarboxylate transporter 8</i> “
MeCP-1	„ <i>Methyl-CpG-Binding Protein 1 Complex</i> “, „ <i>MeCP1 Complex</i> “
MG	Molekülgewicht
mg	Milligramm = $10^{-3}$ g
$\mu$ g	Mikrogramm = $10^{-6}$ g
min	Minuten
MIT	Monoiodthyrosin
ml	Milliliter = $10^{-3}$ l
$\mu$ l	Mikroliter = $10^{-6}$ l
mM	millimolar = $10^{-3}$ mol/l
$\mu$ M	Mikromolar = $10^{-6}$ mol/l
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “
MYC	„ <i>v-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, transcriptional activator</i> “
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Natriumselenit
NCOA1	„ <i>Nuclear receptor coactivator 1</i> “, SRC1
NCOR1	„ <i>Nuclear receptor corepressor 1</i> “
NCOR2	„ <i>Nuclear receptor corepressor 2</i> “, SMRT
NCORi	Mutation von NCoR, ohne die N-terminale Repressionsdomäne
ng	Nanogramm = $10^{-9}$ g
nm	Nanometer
nM	Nanomolar = $10^{-9}$ mol/l

---

ns	nicht signifikant
Nt	Nucleotid, Nucleosidmonophosphat
nTRE	negatives TH-responsives Element, Hemmung der Genexpression
NUT MIX F12	„ <i>Ham's Nutrient Mixture F12</i> “
OATP	„ <i>Organic anion transporters</i> “
OD	optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man <sup>TM</sup>
ORD	„ <i>Outer-ring deiodinations</i> “, 5'-Deiodierung am äußeren phenolischen Ring der THs
P	Progesteron
pBK15SePPpr	Promoterreportergenkonstrukt aus SePP und Luciferase
PBS	„ <i>Phosphate buffered saline</i> “, Salz-Phosphat-Puffer
pBS	pBluescript II SK +/-, Kontrollplasmid
pGL2h5'DIpr	Promoterreportergenkonstrukt aus h5'DI und Luciferase
pH	<i>Pondus hydrogenii</i> , Wasserstoffionenkonzentration
PPAR	„ <i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> “
pSG5HEO	Expressionsplasmid für ER $\alpha$
pSVAR0	Expressionsplasmid für AR
PTU	6-n-Propyl-2-Thiouracil
R1881	Methyltrienolone; äquivalente Eigenschaft zu Testosteronpropionat
RA	Retinoat, Retinsäure
RAR	Retinsäurerezeptor
RARE	„ <i>Retinoic acid response element</i> “, Retinsäure-responsives Element
rcf	„ <i>Relative centrifugal force</i> “, $RCF = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot (\text{rpm})^2 \cdot g$
rhGH	Rekombinantes humanes GH
RNA	„ <i>Ribonucleic acid</i> “, Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rT <sub>3</sub>	3,3',5'-Triiod-L-Thyronin, reverses T <sub>3</sub>
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Sekunde
S14	Spot14
SBE	„ <i>Smad binding element</i> “
SBP2	„ <i>Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2</i> “

---

Se	Selen
Sec	Selenocystein
SelB	„ <i>Selenoprotein translation factor SelB</i> “
SelD2	Selenophosphatsynthase Typ 2
SePP	Selenoprotein P
SMRT	„ <i>Silencing mediator for RAR and TR</i> “
SNP	„ <i>Single nucleotide polymorphism</i> “
SIH	„ <i>Somatotropin release inhibiting hormone</i> “, Somatostatin, GHRH oder SRIF
Sp1	Transkriptionsfaktor Sp1
SRC1	„ <i>Steroid receptor coactivator 1</i> “, NCOA1
SRC1 <sup>-/-</sup>	SRC1-Knockout
SRH	„ <i>Somatotropin releasing hormone</i> “, GHRH, Somatoliberin
SRIF	„ <i>Somatotropin release inhibiting factor</i> “, siehe SIH
STAT	„ <i>Signal transducer and activator of transcription</i> “
$\sigma_{\bar{x}}$	Standardfehler des Mittelwertes
T, t	Thymin
T	Testosteron
T <sub>1</sub> AM	3-Iodthyronamin
T <sub>2</sub>	3,5-Diiod-L-Thyronin
T <sub>2</sub> S	Diiod-L-Thyroninsulfat
T <sub>3</sub>	3,5,3'-Triiod-L-Thyronin
T <sub>3</sub> S	Triiod-L-Thyroninsulfat
T <sub>4</sub>	3,5,3',5'-Tetraiod-L-Thyronin, L-Thyroxin
Tab.	Tabelle
TAAR1	„ <i>Trace amine associated receptor 1</i> “
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TCA	Trichloressigsäure
TGF $\beta$	„ <i>Transforming growth factor beta</i> “, tumortransformierende Wachstumsfaktor
TH(s)	„ <i>Thyroid hormone(s)</i> “, Thyreoidhormon(e), Schilddrüsenhormon(e)
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRAPs	„ <i>TR-associated proteins</i> “ (p140 und p160)
TR $\alpha$	„ <i>Thyroid hormone receptor <math>\alpha</math></i> “, Schilddrüsenhormonrezeptor $\alpha$
TR $\alpha$ <sup>0/0</sup>	TR $\alpha$ -Knockout
TR $\beta$	„ <i>Thyroid hormone receptor <math>\beta</math></i> “, Schilddrüsenhormonrezeptor $\beta$

---

TR $\beta$ <sup>-/-</sup>	TR $\beta$ -Knockout
TRE	„ <i>Thyroid hormone response element</i> “, TH-responsives Element
TRH	„ <i>Thyrotropin-releasing hormon</i> “
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TrxR	Thioredoxinreductase
TSH	Thyroideastimulierendes Hormon, Thyrotropin
U, u	Uracil
U	„ <i>Unit</i> “, siehe I.E.
u	Atomare Masseneinheit, „ <i>Atomic unit of mass</i> “; $u = 1,66057 \cdot 10^{-27}$ kg; alternative Einheit Dalton [D]; $1 u = 1 D$ .
UGA	Basentriplet: 1. Selenocystein-spezifisches Codon; 2. Stopcodon
w/o	engl. „ <i>without</i> “, ohne
w/v	„ <i>Weight [g] in volume [ml]</i> “
v <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion
v/v	„ <i>Volume [ml] in volume [ml]</i> “
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
$\bar{x}$	Mittelwert
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 9. ANHANG

### 9.1. Promotersequenz

Promotersequenz der h5'DI:

```

-2500´ ..... 5´-ggatcctgca atgattacct
-2450´gcacaacatt gctttggact aagggaccaa ttttaattgta aagaacatgc
-2400´aacagtgaca cataacctatg ggtcttacc actggtctta ccatgtgact
-2350´cagtcattcca atagtaggtg gcctaataagg atgggtggaat ggcttggttaa
-2300´aggcacagtt agggctccag gttggggaaa atactcagga gactggggca
-2250´ttgtcctccg gcatgtagta catatactaa accaatgggt tatcaattat
-2200´ttataatggg actttgttct aaatacctat agatttgcaa accaaggggt
-2150´agcacttctt actatcactt tcagtgaaac ctacacacat agaatgtgtg
-2100´cctcctgctg cacaagttta agttctgctt ggttgagat cctgggtcca
-2050´gggaagcagg gaaggcggag agagaacact tccattccag ttacagttcc
-2000´actgaattgg aagctgtaac taccacttag gcatttttgg cttctcatac
-1950´cactgcacca gcaggtaaag aaaagagtgc cggctgggag cggctgctac
-1900´gcctgtaatc ccagcacttt cggaggccaa ggtgggcgga tcacctgagg
-1850´tcaggaattc gagaccaacc tggccaacat ggcgaaacct atctctactg
-1800´aaaacacaaa aattagctgg gcatggtggc acacgcctgt aatcccagct
-1750´acttgggagg ctgaggcagg agaattgctt gaacctggga ggcggagggt
-1700´gcagtgagcc gagattgtgc cactacactc cagcctggac aacagagcga
-1650´ggctctgtct caaaaataaa taaataaaga gtgacacatg gtggggaaaa
-1600´tcagccctga ttactttaag aagttggggg ctgggcatgg tggctcattc
-1550´ccataatccc agcattttga gagatcaagg aaggaggatt gtttgaggtc
-1500´aagagttcaa gaccagcctg ggcaacataa ggagaagcta taacagtcac
-1450´aaaatttgcc gggtttgggt ggcacgcctg tagtcctaac tactctggct
-1400´gaggtgagag gatggcttga gcccaggagt ttgaggctgc agtgagctat
-1350´gatcacacca ctgccctcca gcctggtgac agaggaagga aaccccgtct
-1300´caattatttt aaaaaaaaaa ggtcttgggt gtattttaaa acacttcca
-1250´actctgagct ctatgattct tctttcagtt tctccaatga gccatgctgt
-1200´ctctggcttc tgggcctttg gccagtgtgg ttccttcac caggacacta
-1150´tccccacttt agccagctga ctgcttgccg tctttctgggt ttcagcatag
-1100´aatcacttc ctcagtgaag tcctcttgac ttctctaacc agaattagct
-1050´tcccccttct cctgctctcg tagcccacgc acaccctccg cctctggact
-1000´tcatttagga aatggtagtt ttttgtttac ttgtctattc cccgcactag
-0950´accatgactt ccttgagaga agaggggtgtt ttatttgtca ctctatgcc
-0900´agtgctaagg ggagttgcag gccccagggt ttgttagaaa tgggtccatt
-0850´tctgtctctg ccctgggagg tttgagatcc atatcccctg gggagggtc

```

```

-0800´tgactacaga aatagtcaac caccagctag aagccatgat tgggggcccgg
-0750´gtgcggtggc tcgagcctgt aatcccagca cttttggagg ccaaggcggg
-0700´taggtcatct gaggtcagga gttcaagacc agcctgacca acacggtgaa
-0650´acctgtctc tactaaaaat acaaaaatta gccaggcgtg gtggcaggcg
-0600´cctgtaatcc cagctactca ggaggttgag gcaggataac tgcttgaacc
-0550´tgggaggcag aggttgcagt gagccaagat cgtgccactg acctccagcc
-0500´tgggcgacag agcgagactc catctccagc aacaacaaca aaaaacctg
-0450´gatgtttgtt gggaaaacaa agatctttgt tgggaaaaac atctttcatt
-0400´agtaaaagaa gagtttgtgt ataaagaata actaatagcc aaatctactg
-0350´acttgtgaga gagcatctaa caggttctct ttaagtgtgg tctttttaag
-0300´tacttgtttt ttaaaaaatt aatcagaggg agaatttaag atgtggaatc
-0250´taccaatcca agaatctctc aaaagctcag gcaaagaatt ggaaatgata
-0200´atgattaaaa cagacctttg tgcaccctgg ttaggaattt tctatctcat
-0150´gacagaaagg caaacatctt ctgacctgac tccttcccct gaccdggggg
-0100´tggtgctcc taccctgcac cttcattcag ctccgccag tgttgccctgg
-0050´ctgcagcctc tctgccata gaactcagag cttactctgg ctttgccgag
±0000´atg-3´.....
    
```

Quelle: (144)

OMIM: +147892

aggtcatctgaggtcaggagttca DR4+2 an Position -676 bis -699 (59)

tgacctgactccttcccctgacct DR12 an Position -129 bis -106 (61)

gtgcac potentielle E-box an Position -175 bis -180, Bindung von Myc/Max and Mad/Max (125)

cagac potentielle „*Smad binding sequence*“ an Position -186 bis -190 (3)

## 9.2. Wertetabelle

### 9.2.1. Ergebniswerte aus dem Luciferase-Assay

Abb. 8: Transfektion von HepG2 mit pGL2h5'DIpr-1480 und Stimulation mit Steroiden.

pGL2h5'DIpr-1480	-	+	+	+	+	+	+
R1881	-	-	+	-	-	-	-
DHT	-	-	-	+	-	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	-	-
P	-	-	-	-	-	+	-
Dex	-	-	-	-	-	-	+
Fallzahl der Triplikate	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1
$\bar{x}$ [FU/ $\mu$ g]	6,2	320,8	309,5	327,6	280,3	288,7	323,6
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [FU/ $\mu$ g]	$\pm 0,7$	$\pm 51,5$	$\pm 39,1$	$\pm 52,9$	$\pm 32,0$	$\pm 30,7$	$\pm 31,6$

Abb. 13a/b: Transfektion von HepG2 mit pBK15SePPpr-1800 und Stimulation mit TGF $\beta_1$ .

pBK15SePPpr-1800	-	+	+	-	+	+
TGF $\beta_1$	-	-	100 pM	-	-	4 pM
Fallzahl der Triplikate	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1
$\bar{x}$ [FU/ $\mu$ g]	2,9	2598,2	1303,1	2,7	1275,5	851,9
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [FU/ $\mu$ g]	$\pm 0,9$	$\pm 120,9$	$\pm 67,1$	$\pm 0,0$	$\pm 138,8$	$\pm 148,1$
p-Wert	ns (p=0,05)			ns (p=0,127)		

Abb. 14: Transfektion von HepG2 mit pGL2h5'DIpr-2467 und Stimulation mit GH und T<sub>3</sub>.

pGL2h5'DIpr-2467	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
DMEM F12	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
DMEM 4500 mg/l Glucose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
GH	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
T <sub>3</sub>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Fallzahl der Triplikate	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1
$\bar{x}$ [%]	0,8	100	91,9	81,6	73,5	127,5	138,2	1,1	127,5	104,4
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]	$\pm 0,1$	$\pm 15,6$	$\pm 3,2$	$\pm 8,5$	$\pm 0,9$	$\pm 12,3$	$\pm 6,4$	$\pm 0,0$	$\pm 9,9$	$\pm 14,7$

### 9.2.2. Ergebniswerte aus dem Deiodase-Assay

Abb. 9: Stimulation von HepG2-Zellen mit Steroiden ohne Selen.

Selen	-	+	-	-	-	-	-	-	-
T	-	-	+	-	-	-	-	-	-
R1881	-	-	-	+	-	-	-	-	-
DHT	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Dex	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fallzahl der Triplikate	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
$\bar{x}$ [%]	11,5	100,0	11,0	11,1	11,0	11,6	11,0	12,6	
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]	$\pm 2,4$	$\pm 1,5$	$\pm 2,5$	$\pm 2,0$	$\pm 1,9$	$\pm 2,3$	$\pm 2,4$	$\pm 2,5$	
p-Wert	p=0,001								

Abb. 10a/b: Stimulation von HepG2-Zellen mit Steroiden, T<sub>3</sub> und Selen.

Selen	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R1881	-	-	+	-	-	-	-	+	-
DHT	-	-	-	+	-	-	-	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Dex	-	-	-	-	-	+	-	-	-
T <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Fallzahl der Triplikate	n=9	n=1	n=5	n=1	n=5	n=1	n=8	n=1	n=3
$\bar{x}$ [%]	100,0	106,0	93,0	94,3	102,6	104,9	187,8	174,9	175,7
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]	$\pm 1,9$	$\pm 1,6$	$\pm 3,1$	$\pm 2,4$	$\pm 2,8$	$\pm 9,0$	$\pm 4,4$	$\pm 4,3$	$\pm 5,7$
p-Werte	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ns (p=0,018)</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">ns (p=0,379)</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">p&lt;0,001</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">p=0,008</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">p&lt;0,001</div> </div>								

Abb. 11: Transfektion von HepG2 mit AR bzw. ER $\alpha$  und Stimulation mit Steroiden und T<sub>3</sub>.

AR	-	-	AR	AR	AR	AR	-	-	-	-
ER $\alpha$	-	-	-	-	-	-	ER $\alpha$	ER $\alpha$	ER $\alpha$	ER $\alpha$
Selen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T <sub>3</sub>	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
R1881	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
E <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Fallzahl der Triplikate	n=3	n=2	n=6	n=4	n=6	n=3	n=8	n=4	n=7	n=4
$\bar{x}$ [%]	100,0	163,4	90,7	85,9	180,7	166,6	95,0	99,5	192,2	183,2
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]	$\pm 5,0$	$\pm 10,9$	$\pm 3,4$	$\pm 3,1$	$\pm 5,1$	$\pm 5,9$	$\pm 2,7$	$\pm 3,3$	$\pm 6,5$	$\pm 7,4$
p-Werte	p=0,001		p<0,001				p<0,001			

Abb. 12: Stimulation von HepG2-Zellen mit TGFβ<sub>1</sub>.

Selen		+	+	+	+	+
TGFβ <sub>1</sub>		-	0,4 pM	4 pM	40 pM	100 pM
Fallzahl der Triplikate		n=4	n=3	n=3	n=3	n=1
$\bar{x}$ [%]		100,0	96,2	95,6	96,5	75,9
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]		$\pm 2,3$	$\pm 1,8$	$\pm 2,6$	$\pm 2,0$	$\pm 12,8$
p-Werte		Kruskal-Wallis-Test: ns (p=0,479)				

Abb.15: Stimulation von HepG2-Zellen mit GH.

Selen		+	+
GH		-	+
Fallzahl der Triplikate		n=1	n=1
$\bar{x}$ [%]		100,6	99,0
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]		$\pm 3,1$	$\pm 2,6$

Abb. 16: Stimulation von HepG2-Zellen mit GH bzw. T<sub>3</sub>.

Selen		+	+	+	+	+	+
DMEM F12		+	+	+	-	-	-
DMEM 4500 mg/l Glucose		-	-	-	+	+	+
T <sub>3</sub>		-	+	+	-	-	+
GH		-	-	+	-	+	-
Fallzahl der Triplikate		n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1
$\bar{x}$ [%]		100,0	176,8	157,4	343,8	332,3	593,9
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]		$\pm 1,6$	$\pm 2,5$	$\pm 0,5$	$\pm 14,6$	$\pm 12,4$	$\pm 31,6$
p-Werte		Kruskal-Wallis-Test: p<0,001; Mann-Whitney-U-Test: ns					

Abb. 17: Stimulation von HepG2-Zellen mit Glucose, Glutamin bzw. Pyruvat

Selen		+	+	+	+
Glucose		-	+	-	-
Glutamin		-	-	+	-
Pyruvat		-	-	-	+
Fallzahl der Triplikate		n=2	n=1	n=3	n=1
$\bar{x}$ [%]		100,0	93,0	111,2	94,7
$\pm\sigma_{\bar{x}}$ [%]		$\pm 1,0$	$\pm 3,8$	$\pm 5,2$	$\pm 1,6$
p-Werte		Kruskal-Wallis-Test: ns (p=0,071)			

## DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg unter der wissenschaftlichen Aufsicht von Herrn Prof. Dr. J. Köhrle. Ihm möchte ich für die Überlassung des Themas, für die Begutachtung dieser Arbeit und besonders für die intensive und lehrreiche Betreuung danken. Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. B. Mentrup für die hervorragende praktische und theoretische Begleitung aller Phasen dieser Arbeit, für die Betreuung der Versuchsplanung, die Unterweisung spezifischer Methoden und nicht zuletzt für die Hilfe bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Den vielen Mitgliedern der Abteilung Molekulare Innere Medizin gilt mein Dank für die Einführung in verschiedene experimentelle Techniken, allen voran Frau Dr. A. Baur, Frau Priv.-Doz. Dr. C. Schmutzler und im besonderen bei Herrn Prof. Dr. L. Schomburg für die Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Weidemann danke ich für die Hormonbestimmungen, von ihm stammten in der Anfangsphase auch die Steroide, sowie Herrn Dr. A.O. Brinkmann von der Erasmus Universität in Rotterdam (Niederlande) für die freundliche Überlassung des AR-Plasmids.

Herrn Dipl.-Math. A. Spahn vom Rechenzentrum der Universität Würzburg danke ich für die selbstlose Unterstützung bei der Erarbeitung des statistischen Teils dieser Arbeit.

Herzlichen Dank möchte ich auch den Freundinnen und Freunden aussprechen, die mich und diese Arbeit über all die Jahre begleitet haben, vorallem bei StR Silke Markwort und Mag. phil. Holger Furthmeyer für die Durchsicht dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinem Vater Dipl.-Ing. (FH) Anton Herbert, meinem Bruder Dipl.-Ing. (TU) Johannes Herbert und StR Silke Markwort für die fortwährende Unterstützung und Zuversicht in meinen bisherigen Werdegang.

## **CURRICULUM VITAE**

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

**ERKLÄRUNG**

„Ich, Sebastian Herbert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Charakterisierung hormonregulatorischer Effekte von gonadalen Steroiden, TGF- $\beta_1$  und GH auf die Promoter- und Enzymaktivität der humanen 5'-Deiodase Typ I in humanen HepG2-Zellen, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.“

01.11.2010

Sebastian Herbert