

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

DISSERTATION

Inhibitorische Effekte von Thioharnstoff-Derivaten auf die
Aktivität der humanen Thyreoperoxidase
und der Typ I 5'-Deiodase

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philip Moritz Scholz

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle

2. Prof. Dr. med. H. Krude

3. Prof. Dr. Dr. med. D. Führer-Sakel

Datum der Promotion: 14.06.2009

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Schilddrüse	1
1.1.1 Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse	1
1.1.2 Schilddrüsenhormonsynthese	2
1.1.3 Ein genauerer Blick auf die Thyreoperoxidase	5
1.1.4 Hormon-Aktivierung und -Inaktivierung durch Deiodasen	7
1.1.5 Die Schilddrüse und Selen	12
1.2 Schilddrüsenerkrankungen	14
1.2.1 Iodmangel und Struma	14
1.2.2 Hypothyreose	15
1.2.3 Hyperthyreose	17
1.3 Thyreostatika	18
1.3.1 Funktionsweise der Thyreostatika	19
1.3.1.1 NIS-Blocker	19
1.3.1.2 Schilddrüsenhormon-Synthesehemmer.....	20
1.3.1.3 Iodid.....	22
1.3.1.4 Lithiumionen	23
1.3.1.5 Benzophenon-2	23
1.4 Fragestellung	24
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Material	26
2.1.1 Die untersuchten Thioharnstoff- und Selenoharnstoffderivate.....	26
2.1.2 Chemikalien für die Zellkultur	28
2.1.3 Materialien für die Zellkultur.....	28
2.1.4 Geräteliste für die Zellkultur.....	29
2.1.5 Chemikalien und Materialien für die Extraktpräparation	29
2.1.6 Geräteliste für die Extraktpräparation	29
2.1.7 Chemikalien für den Guaiacol Assay.....	30
2.1.8 Geräteliste für den Guaiacol Assay	30
2.1.9 Chemikalien für den Deiodase-1 Assay.....	30
2.1.10 Materialien für den Deiodase-1 Assay.....	31
2.1.11 Geräteliste für den Deiodase-1 Assay	31
2.1.12 Lösungen für den Deiodase-1 Assay.....	31

2.2 Methoden	34
2.2.1 Herstellung der FTC-238/TPO Zelllinie.....	34
2.2.2 Kultivierung der FTC-238/TPO Zellen	34
2.2.3 TPO Extraktpräparation.....	35
2.2.4 Beschreibung des Guaiacol Assays	35
2.2.5 Kultivierung der Hep-G2 Zellen	37
2.2.6 Hep-G2 Extraktpräparation.....	38
2.2.7 Beschreibung des Deiodase-1 Assays.....	38
2.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford	45
2.2.9 Software	45
2.2.10 Statistik.....	46
2.2.10.1 Zielgrößen (target variables).....	46
2.2.10.2 Statistisches Modell	46
2.2.10.3 Vergleich und statistische Tests.....	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1 Guaiacol Assay	49
3.1.1 Übersicht über die Ergebnisse im Guaiacol-Assay.....	50
3.1.2 Einzeldarstellungen der Ergebnisse im Guaiacol-Assay	53
3.1.3 Ergebnisse der statistischen Analyse des Guaiacol Assays.....	58
3.2 Deiodase-1 Assay	59
3.2.1 Übersicht über die Ergebnisse im Deiodase-1 Assay.....	60
3.2.2 Einzeldarstellungen der Ergebnisse im Deiodase-1 Assay	62
3.2.3 Ergebnisse der statistischen Analyse des Deiodase-1 Assays.....	67
3.2.4 Auswirkungen der Dithiothreitol-Konzentration auf den Deiodase-1 Assay.....	68
3.2.4.1 Variation der DTT-Konzentration im nativen Deiodase-1 Assay.....	69
3.2.4.2 Variation der DTT-Konzentration unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c4.....	70
3.2.4.3 Variation der DTT-Konzentration unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c9.....	71
4. DISKUSSION	74
4.1 Evaluation der schwefelhaltigen Derivate	74
4.1.1 Wirkung der schwefelhaltigen Derivate auf die TPO	75
4.1.2 Wirkung der schwefelhaltigen Derivate auf die Dio1	77
4.2 Evaluation der selenhaltigen Derivate	78
4.2.1 Wirkung der selenhaltigen Derivate auf die TPO.....	78
4.2.2 Wirkung der selenhaltigen Derivate auf die Dio1.....	81
4.2.3 Chemische Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Selenoharnstoff- Derivate und mögliche Auswirkungen auf ihre inhibitorische Wirkung.....	82
4.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Thyreostatika	84
4.4 Thyreostatika und Endokrine Orbitopathie	88
4.5 Selektive Dio1-Hemmung durch 5-CETU in vitro	91

4.6 Welche Fragestellung bleibt offen?.....	93
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	96
7. ANHANG	104
7.1 Veröffentlichungen	104
7.2 Erklärung	105
7.3 Lebenslauf.....	106
7.4 Danksagung	108

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Regulation der Schilddrüsenhormone: Stimulation der Synthese und Sekretion durch TRH und TSH sowie Hemmung durch T_3 , T_4 und Somatostatin.....	2
Abb. 1-2:	Ablauf der Schilddrüsenhormonsynthese im Thyreozyten:.....	3
Abb. 1-3:	Regulation der biologischen Aktivität der Schilddrüsenhormone und ihre Wirkung:.....	5
Abb. 1-4:	Compound I Bildung der TPO:.....	6
Abb. 1-5:	Durch Oxidation des Fe^{III} -Kerns der TPO entsteht die π -Kation-Form	7
Abb. 1-6:	Reaktionswege zur Aktivierung und Inaktivierung von T_4 und T_3 , katalysiert durch Dio1, Dio2 und Dio3:.....	8
Abb. 1-7:	Iodothyronin Deiodase Typ 1 – Mechanismus der Deiodierung von T_4 und Hemmung durch PTU:.....	11
Abb. 1-9:	Übersicht über die Angriffspunkte der verschiedenen Thyreostatika:	19
Abb. 1-10:	Chemische Strukturen der Thyreostatika PTU, MMI und Carbimazol im Vergleich mit Thioharnstoff.....	20
Abb. 1-11:	Schematische Darstellung der Hemmung der TPO-Funktion durch MMI:.....	21
Abb. 1-12:	Hypothese der kompetitiven Hemmung der TPO:.....	22
Abb. 2-1:	Umsatz von Guaiacol durch die humane TPO unter Entstehung eines Farbstoffes und messbarer Änderung des Absorptionsspektrums mit einem Maximum bei 470 nm.	36
Abb. 2-2:	Die Dio1 spaltet sowohl vom T_4 als auch vom rT_3 jeweils das Iodatom an der 5'-Position ab. Durch Verwendung eines radioaktiv markierten Iodthyronins lässt sich die Enzymaktivität bestimmen.....	39
Abb. 2-3:	Vorbereiten des ^{125}I - rT_3 -Tracers	41
Abb. 2-4:	Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve.....	47
Abb. 3-1:	Übersicht über die Ergebnisse im Guaiacol-TPO Assay:	51
Abb. 3-2:	Einzeldarstellung der Ergebnisse des Guaiacol-TPO Assays mit den Substanzen c1 bis c10.	53
Abb. 3-3:	Übersicht über die Ergebnisse im Deiodase-1 Assay:.....	60
Abb.: 3-4:	Einzeldarstellung der Ergebnisse des Deiodase-1 Assays mit den Substanzen c1 bis c10. Gemessen wurde die Aktivität der Dio1 in 50 μ g Hep-G2-Extrakt unter ansteigenden Substanzkonzentrationen.....	62
Abb. 3-5:	Funktion des DTT im Deiodase-1 Assay:.....	68
Abb. 3-6:	Variation der DTT-Konzentration im nativen Deiodase-1 Assay:.....	69

Abb. 3-7: Variation der DTT-Konzentration (10 bis 100 mM) im Deiodase-1 Assay unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c4 (2,5 mM bis 1 μ M).	70
Abb. 3-8: Variation der DTT-Konzentration (10 bis 100 mM) im Deiodase-1 Assay unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c9 (10 mM bis 1 μ M).	72
Abb. 3-9: Variation der DTT-Konzentration (10 bis 100 mM) im Deiodase-1 Assay unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c9 (10 mM bis 1 μ M).	72
Abb. 4-1: Darstellung der Strukturformeln der Tautomere des Methimazols (MMI) und des Propylthiouracils (PTU):	76
Abb. 4-2: Auswirkungen der chemischen Struktur auf die inhibitorische Wirkung gegenüber der humanen TPO:	77
Abb. 4-3: Mechanismus der Inhibition der TPO durch MSeI:	79
Abb. 4-4: Strukturformeln der Selenoharnstoff-Derivate MSeI, c6, c8 und c10 mit Darstellung der freien Elektronenpaare der Selenatome als mögliche Stellen zur Ausbildung einer „Enzym-Se-Se-R“-Bindung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Erklärung
5-CETU	5-Carboethoxy-2-thiouracil
5-MTU	5-Methyl-2-thiouracil
6-BTU	6-Benzyl-2-thiouracil
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Au	Gold
BP-2	Benzophenon 2
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c1 - c10	Code-Namen für die untersuchten Thioharnstoffderivate
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zerfälle pro Minute
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
d. h.	das heißt
Da	Dalton (Molekularmasse) 1 Da = 1/12 der Masse von $^{12}\text{C} = 1 \text{ u}$ $\approx 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
DEHAL 1	Iodotyrosin Dehalogenase 1
Dio1	Iodothyronin Deiodase Typ 1
Dio2	Iodothyronin Deiodase Typ 2
Dio3	Iodothyronin Deiodase Typ 3
DIT	Diiodtyrosin
DMSO	Dimethylsulfoxid (organisches Lösungsmittel)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EO	Endokrine Orbitopathie
et al.	et alii, et altera (lat.: und andere)
FTC-238/TPO	humane follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie, transfiziert mit humaner TPO

fT₃	Freies 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin
fT₄	Freies 3,5,3',5'-Tetraiod-L-Thyronin
GPx	Gluthation Peroxidase
h	Stunde
H₂O	(destilliertes) Wasser, Aqua dest.
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
Hep-G2	humane Leberzelllinie
I	Iod
I⁺	Iodonium-Ion
IC50	Konzentration für halbmaximale Hemmung
K	Kalium
M	Molar = mol/l
mg	Milligramm = 10 ⁻³ g
Mio.	Million(en)
MIT	Monoiodtyrosin
ml	Milliliter = 10 ⁻³ l
mM	Millimolar= 10 ⁻³ mol/l
MMI	Methimazol
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MSeI	Methylselenoimidazol
Na	Natrium
NADP / H	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
NIS-Blocker	Substanzen die den Natrium-Iodid-Symporter kompetitiv hemmen
nM	Nanomolar = 10 ⁻⁹ mol/l
P	Phosphor
PBS	Phosphate buffered saline
PSeU	Propylselenouracil
PTU	6-n-Propyl-2-thiouracil (2,3-Dihydro-6-propyl-2-thioxo-4(1H)-pyrimidinon)
R	Rest
rpm	Umdrehungen pro Minute
rT₃	reverse T ₃ = 3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Schilddrüse
Se	Selenium
sec.	Sekunde

SLE	systemischer Lupus erythematoses
Synthese-blocker	Substanzen die die Schilddrüsenhormonsynthese durch Hemmung der TPO oder der Deiodasen unterbinden
T₃	Triiodthyronin = 3,5,3'-Triiod-L-Thyronin
T₄	Tetraiodthyronin, Thyroxin = 3,5,3',5'-Tetraiod-L-Thyronin
TBG	Thyroxin bindendes Globulin
TCA	Trichloressigsäure
Tg	Thyreoglobulin
ThOx1/2	Thyroid oxidase 1 / 2
TPO	Thyreoperoxidase = Schilddrüsen Peroxidase
TPO-AK	Antikörper gegen Thyreoperoxidase
TR	T ₃ -Rezeptor
TRE	T ₃ -responsive Elements
TRH	Thyrotropin Releasinghormon
TSH	Thyroidea stimulating hormone = Thyreotropin
TSH-R	Thyreotropin Rezeptor
TTR	Transthyretin
UAWs	unerwünschten Arzneimittelwirkungen
USA	United States of Amerika = Vereinigte Staaten von Amerika
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
ΔOD	Delta optische Dichte
μg	Mikrogramm = 10 ⁻⁶ g
μl	Mikroliter = 10 ⁻⁶ l
μM	Mikromolar = 10 ⁻⁹ mol/l
μm	Mikrometer = 10 ⁻⁶ m

1. Einleitung

1.1 Die Schilddrüse

Die Schilddrüse (Glandula thyreoidea) reguliert mit ihren Hormonen Wachstum und Entwicklung des Menschen sowie Energiehaushalt, Stoffwechsel, Nervensystem und die Herzaktivität. Die Schilddrüse liegt beim Menschen bedeckt von der geraden Halsmuskulatur unterhalb des Schildknorpels (Cartilago thyreoidea) vor und beidseits neben der Luftröhre (Trachea). Sie besteht aus den beiden Schilddrüsenlappen Lobus dexter und sinister sowie dem verbindenden Isthmus. Die normale Größe der Schilddrüse beträgt insgesamt 18-25 ml. Sie gliedert sich in eine innere und äußere Kapsel. Es besteht eine enge Nachbarschaft zum Nervus laryngealis recurrens, welcher die innere Kehlkopfmuskulatur motorisch innerviert. Insbesondere bei der operativen Behandlung können dessen Nervenfasern leicht verletzt werden, Heiserkeit oder Atemnot können die Folge sein. Auch bei einer Kropfbildung durch Iodmangel (Struma) kann es zu einer Reizung des Nervens und in der Folge zu Engegefühl und Heiserkeit kommen.

Histologisch besteht die Schilddrüse aus ca. 3 Mio. mit Kolloid gefüllten Schilddrüsenfollikeln, welche von einem einschichtigen Epithel (Thyreozyten) ausgekleidet sind. Das Kolloid besteht hauptsächlich aus Thyreoglobulin (Tg), in dem die Hormone Thyroxin (T₄) und Triiodthyronin (T₃) in inaktiver Form als integraler Bestandteil der Polypeptidkette enthalten sind. Zwischen den Follikeln finden sich die Calcitonin produzierenden C-Zellen [1].

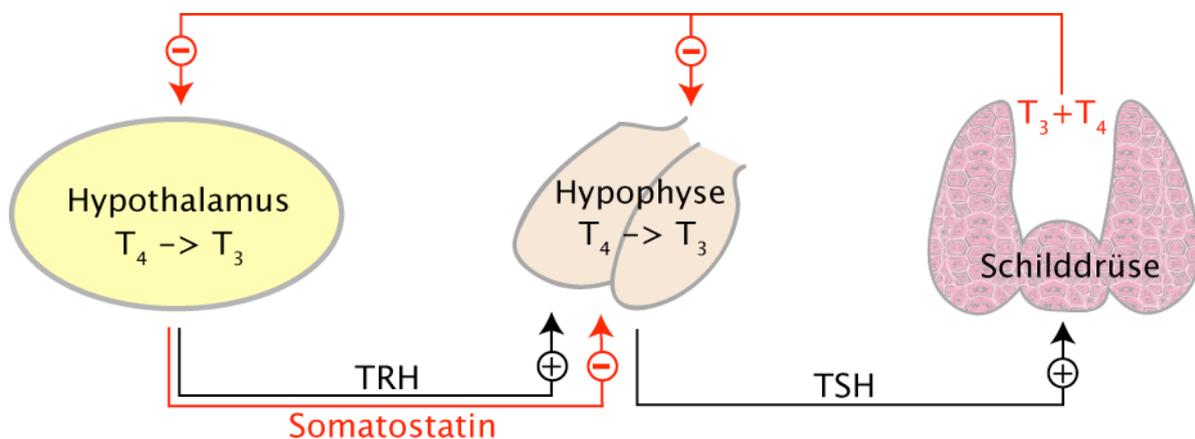
Die zentrale Aufgabe der Schilddrüse besteht in der Synthese, Speicherung und Sekretion der beiden iodhaltigen Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ [2].

1.1.1 Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse

Die Funktion der Schilddrüse wird durch einen Regelkreislauf gesteuert, der die Hormonsekretion auf den physiologischen Bedarf des Organismus abstimmt. Im Hypothalamus wird das Thyreotropin Releasinghormon (TRH) produziert und gelangt über ein Pfortadersystem (hypophysärer Portalkreislauf) zum Hypophysenvorder-

lappen. Dort stimuliert TRH die Sekretion des Thyreoidea stimulierenden Hormons (TSH) in den Blutkreislauf. Diese Sekretion wird durch Somatostatin gehemmt. In der Schilddrüse bindet TSH an den TSH-Rezeptor und bewirkt dort cAMP vermittelt eine verstärkte Iodaufnahme und Hormonsekretion sowie über den Phosphoinositol-Transduktionsweg die Iodierung von Tg und die Hormonsynthese. Die unter TSH-Einwirkung vermehrt synthetisierten und freigesetzten Schilddrüsenhormone sind für die negative Rückkopplung verantwortlich. Sie hemmen auf hypothalamischer Ebene die TRH-Sekretion und auf hypophysärer Ebene die TSH-Sekretion [3]. So wird sichergestellt, dass dem Organismus stets die notwendige Menge an Schilddrüsenhormonen zur Verfügung steht. Zusätzlich existiert auch eine intra-thyreoidale Auto-regulation zwischen organischem Iodpool und der Leistung des Natrium-Iodid-Symporters. Bei einem Iodmangel kommt es zu einer vermehrten, bei Iod-Überschuss zu einer verminderten Aufnahme von Iodid (Wolff-Chaikoff-Effekt, siehe auch 1.3.1.3).

Abb. 1-1: Regulation der Schilddrüsenhormone: Stimulation der Synthese und Sekretion durch TRH und TSH sowie Hemmung durch T_3 , T_4 und Somatostatin.

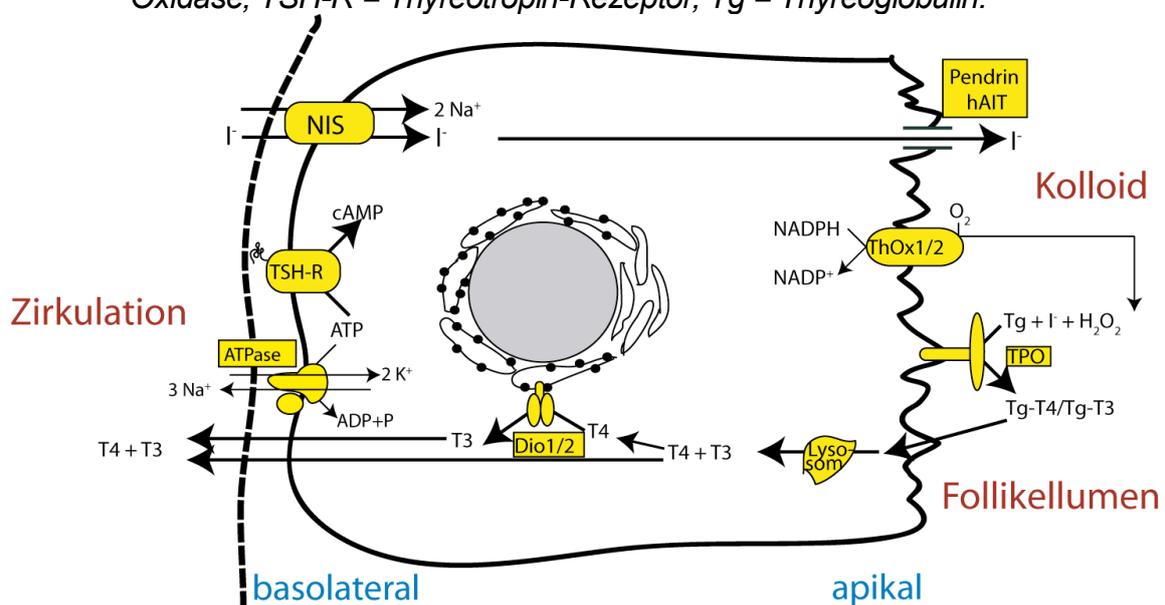


1.1.2 Schilddrüsenhormonsynthese

Die iodhaltigen Schilddrüsenhormone Tetraiodthyronin (Thyroxin, T_4) und Triiodthyronin (T_3) werden durch Iodierung und Abspaltung aus Tg in der Schilddrüse gebildet. Das aus zwei identischen Untereinheiten bestehende Tg wird durch die Thyreozyten synthetisiert und im Follikellumen gespeichert. Dort findet auch die Thyroperoxidase (TPO) vermittelte Iodierung der Tyrosylreste statt. Die membranständige TPO ist im apikalen Bereich der Thyreozyten an den in das Follikellumen hineinragenden Mikrovilli lokalisiert. Sie oxidiert Iodid unter H_2O_2 -Verbrauch zum Iodonium-

Ion (I^-) und baut es anschließend in die Tyrosylreste des Tg ein. Die Iodierung erfolgt unter Bildung von Mono- (MIT) und Diiodtyrosin (DIT), welche dann durch eine intramolekulare Kopplungsreaktion zu T_3 und T_4 werden. Dabei bilden zwei DIT Moleküle T_4 sowie jeweils ein MIT und DIT Molekül T_3 . Das hierfür erforderliche Iodid gelangt aus dem Blut über den an der basalen Zelloberfläche gelegenen Natrium-Iodid-Symporter (NIS) [4-6] zunächst in die Epithelzelle und von dort wahrscheinlich über den Pendrin-Kanal [7-9] in das Follikellumen. Zur Sekretion der Hormone werden die im Follikellumen gespeicherten an Tg gekoppelten Schilddrüsenhormone durch Pinocytose von den Epithelzellen aufgenommen. Intrazellulär findet eine Fusion der Vesikel mit Lysosomen unter Bildung von Phagolysosomen statt, in welchen durch Cystein-Proteasen das Tg vollständig abgebaut wird und die Schilddrüsenhormone freigesetzt werden. Diese werden in das Blutplasma sezerniert. Ebenfalls entstehende MIT und DIT werden wahrscheinlich innerhalb der Thyreozyten durch die Iodotyrosin-dehalogenase 1 (DEHAL1) zu Tyrosin und Iodid deiodiert, welches zur Hormonsynthese wieder verwendet wird [10]. Tyrosin und Iodid stehen somit der Schilddrüse wieder für die Hormonsynthese zur Verfügung.

Abb. 1-2: Ablauf der Schilddrüsenhormonsynthese im Thyreozyten:
 Iodid (I^-) gelangt über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) vom Blut in den Thyreozyten, über den Pendrin-Kanal ins Follikellumen, wird an der Thyreoperoxidase (TPO) unter H_2O_2 -Verbrauch zum Iodonium-Ion (I^+) aktiviert. I^+ reagiert mit den Tyrosylresten des Tg zu MIT und DIT, durch Kopplungsreaktion zu Tg- T_3 und Tg- T_4 . Aufnahme in Thyreozyten durch Pinocytose, dort Abbau von Tg durch Lysosomen und Sezernierung von T_3 und T_4 ins Blut. ATPase = Adenosin-triphosphatase, ADP = Adenosindiphosphat, MIT + DIT = Mono- und Diiodtyrosin, NADPH = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, ThOx1/2 = Thyroid-Oxidase, TSH-R = Thyreotropin-Rezeptor, Tg = Thyreoglobulin.



Im Blut werden die Schilddrüsenhormone hauptsächlich, da sie sehr schlecht wasserlöslich sind, an Trägerproteine gebunden transportiert. Wichtigstes Protein hierbei ist das Thyroxin-bindende Globulin (TBG). Die Serum-Konzentration von T_4 beträgt etwa das Vierzigfache der T_3 Konzentration. Die Halbwertszeit von T_4 beträgt sieben Tage, von T_3 nur einen Tag. Ungefähr 68% des gebundenen T_4 und 80% des T_3 werden an TBG gebunden transportiert. Der Rest bindet an das Transthyretin (TTR) und an Albumin. Albumin hat dabei die geringste Affinität für Schilddrüsenhormone, kommt aber aufgrund seiner hohen Plasmakonzentration trotzdem für fast 20% der Hormonbindung auf. Nur 0,03% des T_4 und 0,3% des T_3 liegen im Plasma in freier ungebundener Form vor. Dieser Unterschied entsteht im Wesentlichen durch die ca. 20-fach niedrigere Bindungsaffinität von TBG für T_3 .

Nur die freien ungebundenen Schilddrüsenhormone (fT_3 , fT_4) stehen dem Stoffwechsel zur Verfügung. Die an Bindungsproteine gebundenen Mengen an T_3 und T_4 stellen ein Reservoir für Schilddrüsenhormone dar und sorgen dadurch für gleichmäßige Plasma-Hormonspiegel.

Tabelle 1-1: Übersicht über die humanen Schilddrüsenhormon-Bindungsproteine, TBG: Thyroxin-bindendes Globulin, TTR: Transthyretin. (Tabelle nach P. Reed Larsen et al., Williams Textbook of Endocrinology, 2003, [11])

	TBG	TTR	Albumin
Molekulargewicht (kDa)	54 000	54 000	66 000
Plasmakonzentration ($\mu\text{mol/l}$)	0,27	4,6	640
T4-Bindungskapazität ($\mu\text{gT}_4/\text{dl}$)	21	350	50 000
Assoziationskonstanten der Hauptbindungsstelle (l/M)			
T_4	1×10^{10}	7×10^7	7×10^5
T_3	5×10^{10}	$1,4 \times 10^7$	1×10^5
Anteil an gebundenem Hormon (%)			
T_4	68	11	20
T_3	80	9	11

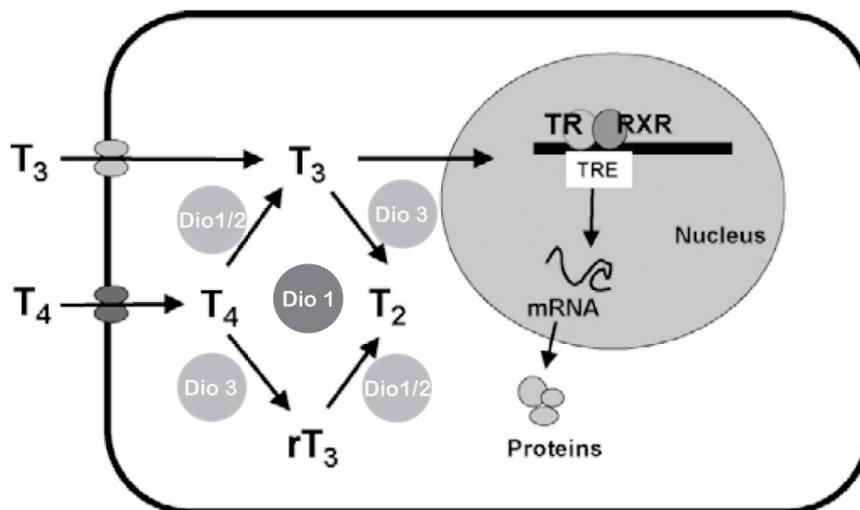
Die zelluläre Aufnahme der Schilddrüsenhormone geschieht nicht wie früher angenommen wurde durch Diffusion, sondern über einen energieabhängigen Transport. In den letzten Jahren konnten zahlreiche Schilddrüsenhormontransporter identifiziert werden. Die meisten dieser Transporter sind nicht schilddrüsenhormonspezifisch, sondern transportieren eine Vielzahl verschiedener Liganden. Zu dieser Gruppe von Transportern gehören NTCPs (Familie Na^+ -abhängiger organischer Anionen Transporter), verschiedene OATPs (Na^+ -unabhängiger Transport amphipatischer organi-

scher Verbindungen), L-Typ der HATs (heterodimerische Aminosäure Transporter) und FAT. Außerdem wurden bisher zwei auf Schilddrüsenhormone spezialisierte Transporter entdeckt: OATP-F (bevorzugter Ligand T_4) und MCT-8 (bevorzugter Ligand T_3) [12-14].

Im Cytosol der Zellen kann T_4 durch die Dio1 oder Dio2 zu T_3 aktiviert oder durch die Dio3 in rT_3 umgewandelt und T_3 kann durch die Dio3 zu T_2 inaktiviert werden. Die Wirkung von T_3 wird über den T_3 -Rezeptor (TR) vermittelt. Der TR ist normalerweise als ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor an T_3 -responsive Elements (TRE) in der Promotorregion der T_3 -abhängigen Gene gebunden und bewirkt im aktivierten Zustand eine Regulation der Transkription [12].

Abb. 1-3: *Regulation der biologischen Aktivität der Schilddrüsenhormone und ihre Wirkung:*

T_3 und T_4 gelangen über Transporter (z. B. MCT-8, OATP-F) in die Zelle. T_4 wird durch Dio1/2 zu T_3 aktiviert oder durch Dio3 zu rT_3 abgebaut. T_3 kann durch Dio3 zu T_2 inaktiviert werden. T_3 bindet an TR, der als Heterodimer mit RXR an TRE in der Promotorregion T_3 -abhängiger Gene gebunden ist. TR bewirkt im aktivierten Zustand eine Regulation der Transkription. RXR = Retinoid-X-Rezeptor, rT_3 = 3,3',5'-Triiodthyronin, T_2 = 3,3'-Diiodthyronin, TRE = T_3 -responsive Elements. (Abbildung nach Friesema et al., 2005, [12])



1.1.3 Ein genauerer Blick auf die Thyreoperoxidase

Die Thyreoperoxidase (TPO) gehört in die Familie der Peroxidasen und ist ein Typ I glykolisiertes transmembranöses Hämprotein. Das Gen, welches für die humane TPO kodiert, liegt auf Chromosom 2 und besteht bei einer Gesamtlänge von 150 kbp aus 17 Exons und 16 Introns. Es kodiert für ein Enzym, welches aus 933 Aminosäuren besteht

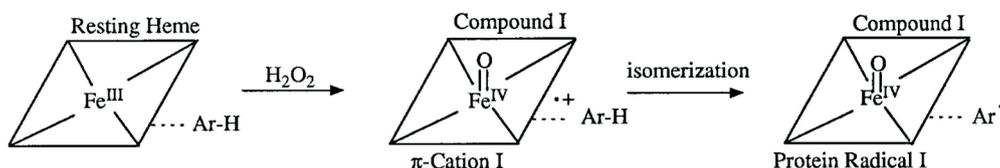
und eine Transmembrandomäne besitzt. Die Expression der TPO wird durch thyreozytenspezifische Transkriptionsfaktoren wie TTF-1, TTF-2 und Pax-8 gesteuert.

Das Bemerkenswerte an der TPO ist, dass sie drei völlig verschiedene Reaktionen gleichzeitig katalysiert. Sie oxidiert einerseits Iodid zum Iodonium-Ion und sorgt andererseits für die Iodination der Tyrosylreste, was einer elektrophilen Substitutionsreaktion entspricht. Außerdem unterstützt sie die intramolekulare Kopplungsreaktion von MIT und DIT zu T_3 und T_4 , was einer phenolischen Kondensationsreaktion entspricht [15].

Als Hämprotein besitzt die TPO in ihrem aktiven Zentrum einen Fe^{III} -Kern. Durch endogen produziertes H_2O_2 wird dieser durch Übertragung von zwei Elektronen zu $Fe^{IV}-O$ oxidiert [16-18]. Diese Form wird als „Compound I“ bezeichnet. Es sind zwei Isomere des „Compound I“ bekannt. Zum einen gibt es das „Compound I“ als Oxoferryl- π -Radikalkation I, in seiner anderen Form gibt der TPO- Fe^{IV} -Kern das zweite Elektron an eine nahe im Apoprotein gelegene Aminosäure ab und bildet eine Protein-Radikal-Form aus [19]. Für die TPO ist noch nicht restlos geklärt, um welche Aminosäure es sich dabei handelt, wahrscheinlich ist es aber ein Tyrosin- oder Tryptophan-Rest, der das Elektron aufnimmt. In Abwesenheit eines geeigneten Substrates wandelt sich die instabile Oxoferryl- π -Kation-Radikal-Form schnell in die stabilere Protein-Radikal-Form um. Das zweite Oxidationselektron wird dabei auf eine Aminosäure übertragen. Strittig und noch nicht vollständig geklärt ist dabei die Frage, ob die beiden Formen der oxidierten TPO auch für die zwei unterschiedlichen Aufgaben der TPO verantwortlich sind oder ob Iodination und Kopplungsreaktion beide von der Oxoferryl- π -Kation-Radikal-Form katalysiert werden und ob es sich dabei um eine Ein- oder Zwei-Elektronenübertragungsreaktion handelt [15, 19]. Dies ist relevant auch wegen der möglichen Ausbildung eines Radikalzustandes während der Reaktion.

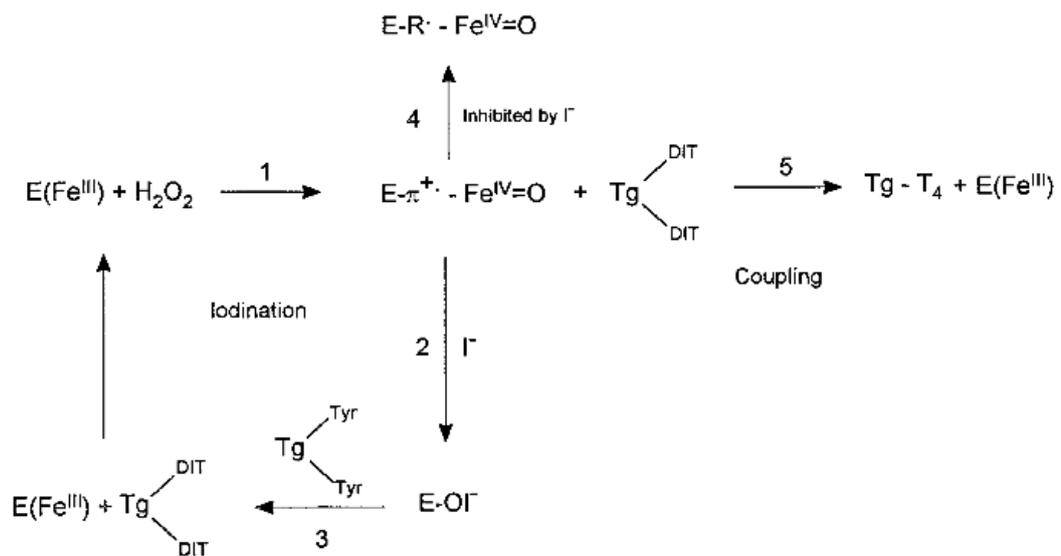
Abb. 1-4: Compound I Bildung der TPO:

Die Oxidierung des nativen Enzyms mit zwei Elektronen führt erst zur Bildung des Compound I in der Oxoferryl- π -Kation-Radikal-Form. In Abwesenheit eines geeigneten Substrats kommt es zur raschen Umwandlung in die stabilere Protein-Radikal-Form. Das zweite Elektron der Oxidationsreaktion wird dabei auf eine im Apoprotein gelegene Aminosäure überführt. (Abbildung nach Taurog et al., 1996, [19])



Die oxidierte Form der TPO reagiert in einem zweiten Schritt mit dem Iodid im Follikellumen zu einem Iodierungszwischenprodukt, dessen genaues Aussehen noch umstritten ist. Bei diesem Zwischenprodukt handelt es sich entweder um ein Häm-TPO-I(+) Iodinium Ion oder um ein TPO-O-I(-) Hypoiodid [19, 20]. Das Iodierungszwischenprodukt reagiert anschließend mit dem Tg und übergibt dabei das Iod an die Tyrosylreste. In der sich anschließenden Kopplungsreaktion entsteht aus MIT und DIT schließlich T₃ und T₄ (siehe auch 1.1.2).

Abb. 1-5: Durch Oxidation des Fe^{III}-Kerns der TPO entsteht die π-Kation-Form (1). In Anwesenheit von Iodid als Substrat entsteht das Hypoiodid-Iodierungszwischenprodukt (E-OI⁻), von welchem schließlich das Iod auf die Tyrosylreste des Tg übergeht (2+3). Die Kopplungsreaktion findet in einem zweiten Schritt statt (4). Hohe Iodidkonzentrationen scheinen über eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen dem π-Kation und dem Protein-Radikal die Kopplungsreaktion zu hemmen. (Abbildung nach Taurog et al., 1996, [19])

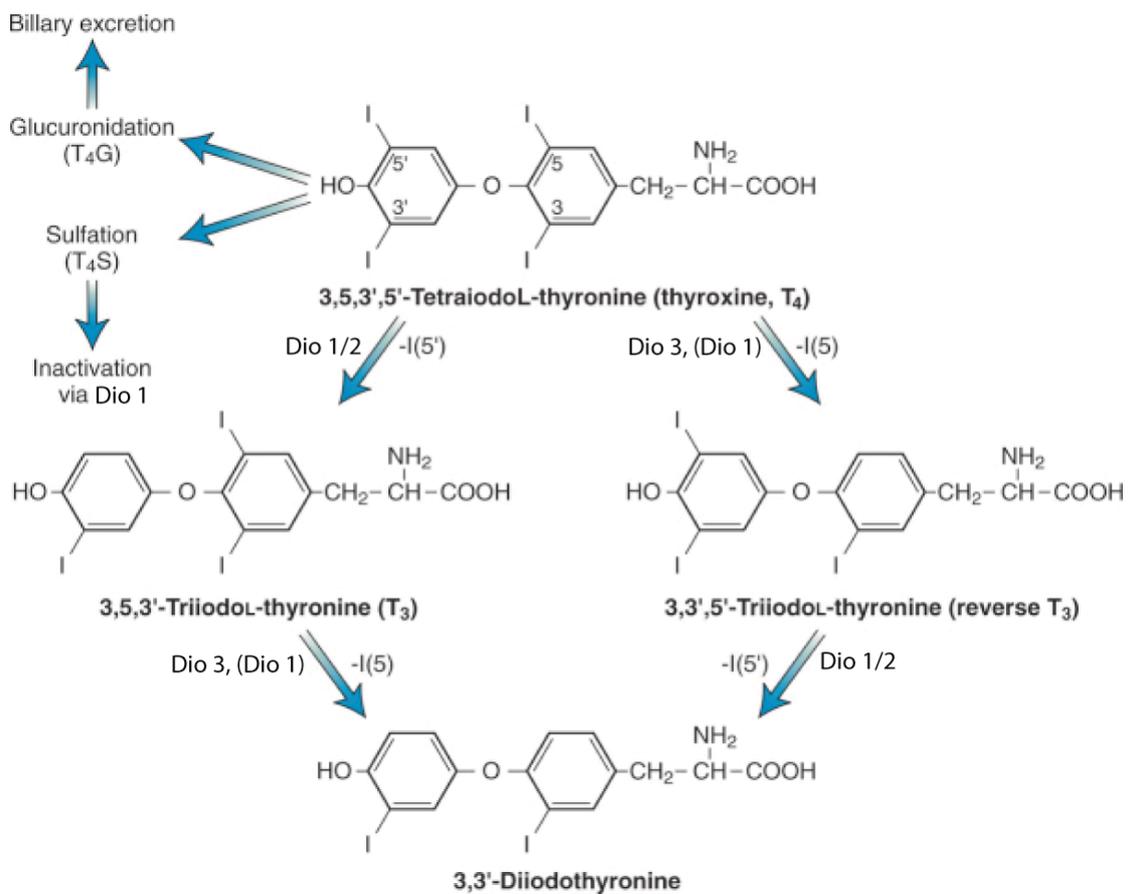


1.1.4 Hormon-Aktivierung und -Inaktivierung durch Deiodasen

Der wichtigste Reaktionsweg für T₄ ist die Umsetzung in seine aktive Form T₃. Dies geschieht durch 5'-Monodeiodierung des „äußeren“, weiter von der Amid-Gruppe entfernten, Phenol-Ringes. Diese Reaktion wird durch die Iodothyronin Deiodasen vom Typ 1 und Typ 2 (Dio1, Dio2) katalysiert. Die Deiodierung des „inneren“ Phenol-Ringes geschieht hauptsächlich durch die Deiodase Typ 3 (Dio3). Durch letztere Reaktion werden T₄ und T₃ inaktiviert [21, 22]. Daher kann über diese drei Reaktions-

wege sowohl eine Aktivierung als auch eine Inaktivierung von T_3 stattfinden und die Schilddrüsenhormonspiegel können zellspezifisch reguliert werden.

Abb. 1-6: Reaktionswege zur Aktivierung und Inaktivierung von T_4 und T_3 , katalysiert durch Dio1, Dio2 und Dio3:
 Die Nummern beziehen sich auf die Position der Iodatome, welche abgespalten werden. Die Klammer um Dio1 betont, dass Dio3 wahrscheinlich hauptsächlich das Enzym ist, welches die Deiodierung des inneren Ringes katalysiert. (Abbildung nach P. Reed Larsen et al., Williams Textbook of Endocrinology, 2003, [11])



Alle drei Iodothyronin 5'-Deiodasen enthalten Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum [22-24]. Die nukleophilen Eigenschaften des Selenocysteins machen die Selenodeiodasen zu idealen Katalysatoren von Redoxreaktionen wie der Deiodierung von Iodothyroninen. Das Selen der Deiodasen fungiert während der Reaktion als Iodid-Akzeptor [25]. Siehe hierzu auch Abbildung 1-7.

Das aktive Zentrum besteht aus einem einzelnen Selenocystein, welches den katalytischen Kern der Deiodasen bildet und von 15 in der Evolution hoch konservierten Aminosäuren umgeben ist. Die verschiedenen Subtypen der Deiodasen unterschei-

den sich unter anderem in der Variation dieser Aminosäuren. Die Deiodierung der Schilddrüsenhormone geschieht in zwei Teilschritten:

1. Transfer eines Iodionum-Ions (I^+) vom Substrat zum Selenolat-Anion (Se^-) der Deiodase unter Bildung eines Selenyliodid-Zwischenproduktes (Sel) und
2. Reduktion von Sel durch eine thiolgruppenhaltige Substanz (Cofaktor), wie z. B. reduziertes Glutathion oder Dithiothreitol (DTT) [26].

Bisher ist es noch nicht gelungen, den natürlichen Cofaktor dieser Reaktion in vivo nachzuweisen. Allerdings konnte eine Stimulation der Dio1-Aktivität mit dem Glutathion-, Thioredoxin-System und mit Dihydroliponamid gezeigt werden [26, 27]. Ob eine Regeneration des Enzyms in vivo tatsächlich erfolgt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Die Hemmung der Dio1 durch das Thyreostatikum 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU) wird für einen Teil der antithyreoidalen Wirkung dieser Substanz verantwortlich gemacht. PTU reagiert dabei mit dem Sel-Zwischenprodukt der Dio1 und bildet unter Abspaltung des Iodids als Endprodukt ein Selenylsulfid. Diese Verbindung ist sehr stabil und stellt damit eine irreversible Hemmung der Dio1 dar. Siehe auch Abb. 1-7.

Die Deiodase Typ 1 (Dio1) kann sowohl die 5'- als auch die 5-Deiodierung von T_4 katalysieren (K_m : 10^{-6} mol/l), um T_3 und rT_3 zu bilden. Die favorisierten Substrate der Dio1 sind rT_3 (5'-Deiodierung) und T_3-SO_4 (5-Deiodierung) mit einer K_m von 10^{-9} mmol/l [28, 29]. Die Dio1 kann durch PTU selektiv gehemmt werden, da Dio2 und Dio3 erst bei sehr hohen Konzentrationen eine Hemmung zeigen. Die Halbwertszeit der Dio1 beträgt 12 Stunden. Exprimiert wird die Dio1 hauptsächlich an der Plasmamembran von Zellen der Leber, Niere, Schilddrüse und euthyreoten Hypophyse [30]. Bei der Hyperthyreose steigt die Konzentration der Dio1 an und da PTU die Dio1 hemmt, ist diese Substanz in der Behandlung besonders effektiv.

Die Deiodase Typ 2 (Dio2) favorisiert T_4 und rT_3 als Substrat (K_m : 10^{-9} mol/l) und kann nur eine Deiodierung des „äußeren“ Ringes katalysieren. Ihre Halbwertszeit beträgt 20 bis 30 Minuten, da sie rasch ubiquitinyliert und abgebaut wird, ein Prozess der durch die Anwesenheit von T_4 und rT_3 noch beschleunigt wird („negatives feedback“). Die Dio2 wird hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum der Zellen von ZNS, Haut, Skelett- und Herzmuskel, braunem Fettgewebe und der Hypophyse exprimiert [31, 32].

Die Deiodase Typ 3 (Dio3) findet sich vornehmlich in Plazenta und adulten ZNS und in solchen Geweben, die wenig auf Schilddrüsenhormone in ihrem entsprechenden Differenzierungszustand reagieren [23]. Die Expression von Dio3 wird durch Steigerung der Transkription bei hoher T_3 Konzentration reguliert. Dadurch ergibt sich ein Rückkopplungsmechanismus, der eine T_3 Homöostase ermöglicht. Eine erhöhte Dio3-Aktivität findet sich in der fötalen Entwicklung. Das bei schwer kranken Menschen vorkommende Low- T_3 -/Low- T_4 -Syndrom geht auf eine Kombination aus erhöhter Dio3-Aktivität im erwachsenen Körper mit Neoexpression von Dio3 in Geweben wie Leber, Niere und Herz sowie einer verminderten hepatischen und renalen Dio1-Aktivität zurück. Dadurch kommt es in der Peripherie zu einem vermehrten Abbau von T_3 und T_4 bei erhöhtem rT_3 und normalem bis vermindertem TSH [33-35].

Ungefähr 40% des von der Schilddrüse produzierten T_4 wird peripher in T_3 umgewandelt und ebenfalls 40% in rT_3 . Insgesamt entstehen 40-85% des gesamten T_3 durch Umwandlung aus T_4 . Nach Applikation von PTU wird die periphere Produktion um ca. 20% (euthyreoter Zustand) bis 50% (hyperthyreoter Zustand) vermindert [36, 37].

Lange glaubte man durch die unterschiedliche Lokalisation der Dio1 (Plasmamembran) und Dio2 (Endoplasmatisches Retikulum) in der Zelle käme es zu einer differenzierten Verteilung der Produkte. Dabei wurde davon ausgegangen, dass T_3 aus Dio2-katalysierter Deiodierung vorwiegend die lokale Versorgung der Zelle übernimmt. T_3 , welches Dio1-katalysiert entstanden ist, sollte dagegen durch Sekretion ins Plasma überwiegend zur T_3 -Versorgung des Körpers beitragen [38].

Neueste Untersuchungen bei Nagetieren zeigten, dass die T_3 -Produktion der Schilddrüse bei Selenmangel bis zu 80% der Gesamt- T_3 -Menge ausmachen kann. Eindrucksvoll konnte dies an einem Maus-Knockout-Modell gezeigt werden, bei dem alle Selenoenzyme in den Hepatozyten fehlten [39, 40]. Die entsprechenden Mäuse hatten eine morphologisch komplett unauffällige Schilddrüse, normale Schilddrüsenhormonspiegel und normale TSH-Werte. Die Schilddrüse konnte die Funktion der hepatischen Dio1 fast vollständig übernehmen, aber es kam zu keiner Kompensation durch erhöhte Dio1 oder Dio2 Aktivität in anderen Geweben. Dies legt zumindest die Vermutung nahe, dass auch beim Menschen die Fähigkeit der Schilddrüse zur T_3 -Produktion unterschätzt wird [33]. Untersuchungen zur Enzymaktivität der Dio2 wiesen darauf hin, dass diese einen weitaus größeren Beitrag zum zirkulierenden T_3

leistete, als bisher angenommen [41]. Gerade im Zustand der Hypothyreose wird die Expression der Dio2 gesteigert und trägt dann wesentlich zum Gesamt-T₃ bei.

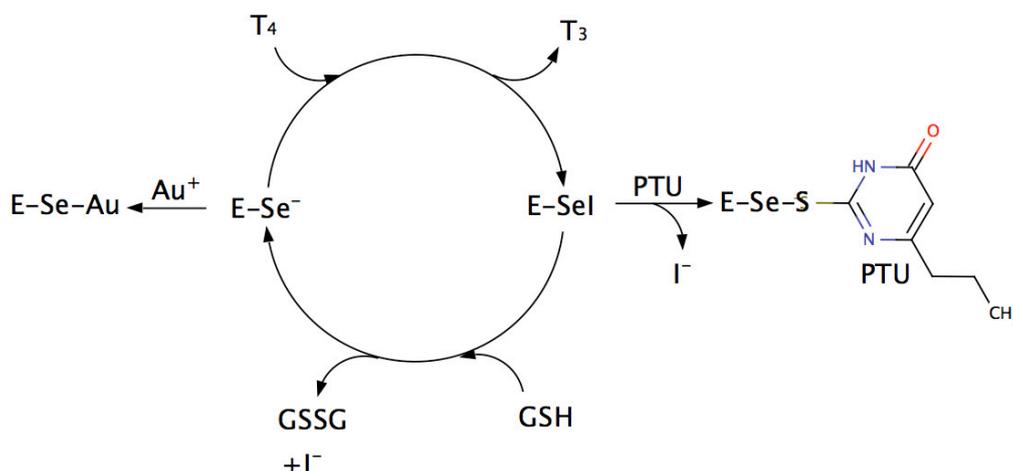
Tabelle 1-2: Es werden 3 Selenodeiodasen unterschieden. Sie enthalten Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum und können Iodothyronine deiodieren, unterscheiden sich aber hinsichtlich Vorkommen, Deiodierungsstelle und Funktion (nach P. Reed Larsen et al., Williams Textbook of Endocrinology, 2003 [11] und Köhrle et al., 2005 [42] und Bianco et al., 2006 [21]).

Parameter	Dio 1	Dio 2	Dio 3
Deiodierungsstelle	äußerer und innerer Phenol-Ring (5+5')	äußerer Phenol-Ring (5')	innerer Phenol-Ring (5)
Funktion	Quelle des Plasma T ₃ speziell bei Hyperthyreose	Plasma T ₃ , intrazelluläres T ₃ in bestimmten Geweben	Inaktivierung von T ₃ + T ₄ , Vermehrt in Schwangerschaft und Sepsis
Vorkommen	Leber, Niere, SD, euthyreote Hypophyse, nicht ZNS(?)	ZNS, hypothyreote Hypophyse, braunes Fettgewebe, Plazenta, SD, Skelett- + Herzmuskel	Plazenta, ZNS, Hä-mangiome, fötale Leber
Lokalisation in der Zelle	Plasmamembran / ER	Endoplasmatisches Retikulum (ER)	Plasmamembran?
Bevorzugte Substrate	rT ₃ (5'), T ₃ S (5)	T ₄ , rT ₃ (5')	T ₃ , T ₄ (5)
K _m (mol/l)	10 ⁻⁷ (rT ₃), 10 ⁻⁶ (T ₄)	10 ⁻⁹ (T ₄ and rT ₃)	10 ⁻⁹ (T ₃ and T ₄)
Molekulargewicht (Da)	29.000	30.500	31.500
PTU Hemmung	Hoch	Keine	Keine
Antwort auf erhöhtes T ₄	↑	↓	↑

SD: Schilddrüse, PTU: Propylthiouracil, rT₃: reverses T₃, ZNS: Zentrales Nervensystem

Abb. 1-7: Iodothyronin Deiodase Typ 1 – Mechanismus der Deiodierung von T₄ und Hemmung durch PTU:

Bei der Deiodierung von T₄ kommt es zum Transfer eines Iodioniums (I⁺) zum Selenolat-Anion (Se⁻) der Deiodase unter Bildung eines Selenyliodid-Zwischenproduktes (Sel). Dieses wird anschließend durch einen thiolgruppenhaltigen Cofaktor, wie z.B. Glutathion (GSH), wieder zu Se⁻ reduziert. Dabei wird Iodid (I⁻) freigesetzt. PTU bindet kovalent an E-Sel und hemmt damit die Dio1 irreversibel. (Abbildung nach Kuiper et al. [26] und Roy et al. [43])



1.1.5 Die Schilddrüse und Selen

Die Spurenelemente Iod und Selen sowie die Mineralien Eisen, Calcium und Magnesium sind für den Schilddrüsenstoffwechsel wichtig. Selen ist ein Halbmetall mit der Ordnungszahl 34 und findet sich in der 6. Hauptgruppe und der 4. Periode im Periodensystem. Es wurde 1817 von Jöns Jacob Freiherr von Berzelius im Bleikammerschlamm einer Schwefelsäurefabrik in Schweden entdeckt und nach der griechischen Mondgöttin Selene benannt. In der Natur kommt Selen vorwiegend als Metallselenit in schwefelhaltigen Erzen zusammen mit Kupfer, Blei, Zink, Gold und Eisen vor. Selen ist dem Schwefel in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften sehr ähnlich, zeichnet sich aber durch seine größere Elektronenhülle und der daraus resultierenden höheren Nukleophilie aus.

Zunächst wurde Selen als hoch giftig und kanzerogen eingestuft. Heute ist bekannt, dass Selen ein essentielles Spurenelement ist und im menschlichen Körper im Selenocystein, der 21. proteinogenen Aminosäure vorkommt. Selenocystein, ein reaktives Analogon des Cysteins, enthält statt eines Schwefel- ein Selenatom. Es hat eine niedrigere Säurekonstante ($pK_s = 5,3$), ist redoxaktiver als Cystein und Bestandteil einiger Enzyme, wie den Glutathion-Peroxidasen, Iodothyronin Deiodasen und einigen Thio-redoxin-Reduktasen. Im aktiven Zentrum der Enzyme steuert Selenocystein Redox-Reaktionen.

Selenocystein entsteht aus der Aminosäure Serin, indem diese an eine spezielle tRNA mit dem Anticodon ACU bindet. Anschließend wird diese tRNA selenyliert, d. h. Serin wird zu Selenocystein umgesetzt (Ersatz der Hydroxy- durch eine Selenol-Gruppe) und es entsteht tRNA^{Sec}. Diese hat das Anticodon ACU und paart mit dem Stoppcodon UGA. Für den Einbau eines Selenocysteins anstelle eines Translationsstopps müssen folgende Bedingungen erfüllt sein. Der normale Elongationsfaktor muss durch einen Sec-spezifischen (EF^{Sec}) ersetzt werden, die mRNA einen Stem-Loop (SECIS) ausbilden und ein daran bindendes spezifisches Selenocysteine Insertion Sequence Binding Protein (SBP2) vorhanden sein.

Der Thyreozyt exprimiert eine ganze Reihe verschiedener Selenoenzyme, dazu gehören die beiden Iodothyronin 5'-Deiodasen Typ 1 und Typ 2, GPx-1, GPx-3, TrxR, Sep15, SePP und SeW. Die Glutathion Peroxidase 3 (GPx-3) wird in das Schilddrü-

senfollikellumen sezerniert und sorgt dort vermutlich für den TSH-abhängigen Abbau von überschüssigem H_2O_2 , welches nicht für die Schilddrüsenhormonsynthese benötigt wird. Sep15 spielt möglicherweise beim Abbau von falsch glykolisiertem Tg eine wichtige Rolle [5].

Die Schilddrüse ist besonders reich an Selen. Dafür verantwortlich ist vermutlich der hohe Gehalt an GPx-3, aber auch zum geringen Teil das Selenocystein der Deiodasen. In Gegenden mit einem ausgeprägten Iod- und Selenmangel tritt der myxödematöse Kretinismus häufig auf (Zaire, China) [44]. Bei dieser Krankheit kommt es zur Ausbildung einer kleinen atrophischen Schilddrüse, die nur durch eine kombinierte rechtzeitige Substitution von Selen und Iod behandelt werden kann [5, 45]. Durch den Selenmangel kommt es zu einer verringerten GPx-Aktivität, wodurch die während der Schilddrüsenhormonsynthese gebildeten Sauerstoff-Peroxide nicht hinreichend reduziert werden und es zu Zellnekrosen kommt. Durch die Gabe von Selen normalisieren sich die GPx-Aktivität und die Schilddrüsengröße, durch Iodgabe ebenfalls die Hormonproduktion [5].

Ein milder Selenmangel scheint nach ersten Studien zu einer höheren Inzidenz und Aktivität einer Autoimmunthyreoiditis beizutragen. Ausgehend von dieser Annahme wurden inzwischen mehrere Studien durchgeführt. In einer prospektiven randomisierten geblindeten Studie von Gärtner et al. (2002) [46, 47] wurden Patienten mit einer floriden Autoimmunthyreoiditis mit 200 μ g Natriumselenit pro Tag versus Placebo behandelt. Während der Studienzeit von 3 Monaten wurden der Verlauf der TPO-Antikörper (TPO-AK), der Thyreoglobulin-Antikörper und die Schilddrüsenhormon-Konzentrationen im Serum sowie Echomuster und Perfusion der Schilddrüse in der Sonographie bestimmt. In der Gruppe der Selensubstituierten verringerte sich die Konzentration der TPO-AK auf 64% des Ausgangswertes. Die Patienten fühlten sich unter der Substitution wohler und bei zusätzlich bestehenden Autoimmunerkrankungen oder Allergien kam es zu einer Besserung der Symptomatik. Auch in einer zweiten 2002 von Duntas et al. [48] durchgeführten Studie kam es zu einem signifikanten Abfall der TPO-AK Konzentrationen im Serum nach 3 Monaten um 46% und nach 6 Monaten um 55,5%. In einer 2007 veröffentlichten Studie von Mazokopakis et al. [49] konnte eine Reduktion der TPO-AK im Serum um 13% nach 6 und 21% nach 12 Monaten festgestellt werden. Ähnlich positive Effekte auf die TPO-AK Konzentration im Serum konnte auch für die Selensubstitution bei postpartaler Autoimmun-Thyreoiditis gezeigt werden [50-53].

1.2 **Schilddrüsenerkrankungen**

1.2.1 **Iodmangel und Struma**

Für die Bildung der normalen Schilddrüsenhormonmenge werden täglich etwa 60 µg Iodid gebraucht. Nimmt man noch die Mengen, die täglich durch Darm oder Niere ausgeschieden werden mit in die Berechnung, liegt die tägliche Mindestversorgung bei ca. 100 µg Iodid, um alle Anzeichen eines Iodmangels auszugleichen. In Deutschland wird von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung eine Tageszufuhr von 200 µg Iodid für Erwachsene empfohlen (siehe Tabelle 1-3). Iodmangel ist ein häufiges Problem und betrifft die Bevölkerung vieler Regionen dieser Erde. Es wird geschätzt, dass weltweit ca. 1 Milliarde Menschen in mit Iod unterversorgten Gebieten leben [11]. Oft kommt es bei diesen Menschen zur Ausbildung einer TSH-induzierten kompensatorischen Vergrößerung der Schilddrüse (endemischer Kropf). Aber auch TSH unabhängig kann es bei Jodmangel zur Proliferation der Thyreozyten und Schilddrüsenfollikel kommen. Bei einem starken Iodmangel unter der Schwangerschaft kommt es durch einen Schilddrüsenhormonmangel beim Feten zu Entwicklungsverzögerungen und zu einer irreversiblen Schädigung des sich entwickelnden Zentralen Nervensystems sowie zu Missbildungen des Skeletts [54]. Iodmangelerkrankungen stellen daher die häufigste Ursache für Schilddrüsenerkrankungen und sogar den größten Teil aller Fälle von Funktionsstörungen des Hormonsystems beim Menschen dar.

Seit 2007 liegen die Ergebnisse der weltweit größten epidemiologischen Erhebung vor, die in Deutschland bei unter 100.000 vermeintlich gesunden Erwachsenen zwischen 18 und 65 Jahren von der Schilddrüsen-Initiative Papillon untersucht wurde. Im Bundesdurchschnitt hatten dabei 33,2% krankhafte Schilddrüsenveränderungen (vergrößerte Schilddrüse und/oder Knoten). Jährlich werden 120.000 Patienten an der Schilddrüse operiert und weitere 60.000 mit einer Radioiodtherapie behandelt, weil ihre Schilddrüsenerkrankung zu spät diagnostiziert wurde [55].

Iodid wird rasch und gut resorbiert. Im peripheren Blut hat Iodid normalerweise eine Konzentration von nur 10 bis 15 µg/l. Die normale Schilddrüse ist mit 8000 µg der größte Iodpool des menschlichen Körpers. Das meiste Iod findet sich dort gebunden in Form von MIT und DIT [11]. Bei der Unterversorgung des Körpers mit Iod kann die Schilddrüse die Schilddrüsenhormone nicht in adäquater Menge produzieren und es wird durch die Gegenregulation des Regelkreislaufes vermehrt TSH ausgeschüttet.

Dies führt zu einem Wachstum der Schilddrüse und damit zur Ausbildung einer Iodmangelstruma.

Tabelle 1-3: Von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. empfohlene tägliche Iodaufnahme sortiert nach Alter. Entnommen der Tabelle für „Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr“ online unter: <http://www.dge.de>

Alter	Iod: Deutschland, Österreich			Iod: WHO, Schweiz		
	µg/Tag	µg/MJ ¹ (Nährstoffdichte)		µg/Tag	µg/MJ ¹ (Nährstoffdichte)	
		m	w		m	w
Säuglinge						
0 bis unter 4 Monate ²	40	20	21	50	25	26
4 bis unter 12 Monate	80	27	28	50	17	17
Kinder						
1 bis unter 4 Jahre	100	21	23	90	19	20
4 bis unter 7 Jahre	120	19	21	90	14	16
7 bis unter 10 Jahre	140	18	20	120	15	17
10 bis unter 13 Jahre	180	19	21	120	13	14
13 bis unter 15 Jahre	200	18	21	150	13	16
Jugendliche u. Erwachsene						
15 bis unter 19 Jahre	200	19	24	150	14	18
19 bis unter 25 Jahre	200	19	25	150	14	19
25 bis unter 51 Jahre	200	20	26	150	15	19
51 bis unter 65 Jahre	180	20	24	150	16	20
65 Jahre und älter	180	22	26	150	18	22
Schwangere	230		25	200		22
Stillende	260		24	200		19

¹Berechnet für Jugendliche und Erwachsene mit überwiegend sitzender Tätigkeit (PAL-Wert 1,4)
²Hierbei handelt es sich um einen Schätzwert

Tabelle 1-4: Tägliche Iodaufnahme in verschiedenen Ländern der Erde. (Tabelle nach P. Reed Larsen et al., *Williams Textbook of Endocrinology*, 2003 [11] und *Daten von Meng/Skriba, 2002 [56], ** Daten von Thamm et al., 2007 [57])

Durchschnittliche tatsächliche Iodaufnahme	µg Iod/Tag
Nordamerika (1992)	75 – 300
Chile (1981)	<50 – 150
Belgien (1993)	50 – 60
Deutschland (1993)	20 – 70
Deutschland (1996)*	58 – 85
Deutschland (2000)*	112 – 126
Deutschland (2007)**	117
Schweiz (1993)	130 – 160

1.2.2 Hypothyreose

Die Hypothyreose wird üblicherweise als verminderte Schilddrüsenhormonwirkung definiert. Dem hormonellen Defizit können ätiologisch unterschiedliche Krankheitsbilder zugrunde liegen. Diese sind in Tabelle 1-5 zusammengefasst. Nach dem klinischen Ausmaß der Unterfunktion werden folgende Stadien unterschieden: latente oder subklinische Hypothyreose (TSH↑, fT3 + fT4 noch normal), manifeste Hypothy-

reose (TSH↑, fT3↓, fT4↓) und die hypothyreote Krise (Myxödem, klinische Beurteilung) [58]. Angeborene Hypothyreosen treten mit einer Prävalenz von 1:3000 Neugeborenen auf (Mädchen/Jungen 2:1) und stellen somit die häufigste angeborene Hormonstoffwechselstörung dar. Sie führen ohne sofortige Behandlung nach der Geburt zu einem Wachstums- und Reifungsrückstand (Knochen- und Zahnalter) sowie zur geistigen Retardierung und Schwerhörigkeit der betroffenen Kinder. Um eine bestehende Hypothyreose möglichst früh zu entdecken, wurde 1980 in Deutschland die Bestimmung des TSH-Spiegels im Rahmen des Neugeborenen-Screenings eingeführt. Bekommen die Kinder frühzeitig und in adäquater Dosierung Schilddrüsenhormone, so können sie sich in den allermeisten Fällen völlig normal entwickeln. Bei verspätetem Therapiebeginn sind bis dahin aufgetretene Behinderungen irreversibel [59, 60]. Von der erwachsenen europäischen Bevölkerung leidet ca. 1-2% an einer Schilddrüsenunterfunktion, wobei das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern 4:1 beträgt. Eine subklinische Hypothyreose haben ca. 7,5% der Frauen und 2,8% der Männer [61].

Die Beschwerden bei der Hypothyreose werden durch den Mangel an Schilddrüsenhormonen an den verschiedenen Organen des Körpers hervorgerufen. Es kommt zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels mit Antriebsarmut, Müdigkeit, Kälteempfindlichkeit, teigiger Haut und brüchigem Haar, Obstipation, rauher heiserer Stimme, Bradykardie, Hypotonie, Anämie sowie zur Einschränkung der Fruchtbarkeit, Libido und Potenz. Die Therapie der Hypothyreose besteht in der lebenslangen Substitution mit L-Thyroxin (ca. 1,5 – 2,0 µg pro kg KG/d) [62].

Tabelle 1-5: Ursachen der Hypothyreose (Modifiziert nach Steinbeck, Therapie Innerer Krankheiten, 11. Auflage, 2005, [58])

Primäre Hypothyreose	Angeborene Fehlbildungen
	Schilddrüsenagenesie, -aplasie, -dysplasie, dystrophe Lage
	Iodverwertungsstörungen
	Defekte von NIS, TPO, Tg, Iodkopplungsreaktion
	Transiente Hypothyreose bei Säuglingen
	Bei M. Basedow der Mutter, durch diaplazentare Übertragung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern, Iodmangel, Iodexzess
	Autoimmunthyreoiditis
	Atrophische Form Hypertrophische Form (Hashimoto-Thyreoiditis)
	Andere Thyreoiditiden
	Subakute Thyreoiditis de Quervain, Postpartumthyreoiditis, Silent Thyreoiditis, Riedel-Struma, zytokininduzierte Thyreoiditis
	Iatrogen
Z.n. Strumaresektion, Z.n. Radioiodtherapie, Z.n. Bestrahlung, Medikamenteneinnahme (Thyreostatika, Lithium, Amiodaron)	

	Strumige Substanzen
	Extremer Iodmangel
	Seltene Erkrankungen der Schilddrüse
	Amyloidose, Sarkoidose, Lymphome, Neoplasien
Sekundäre Hypothyreose	Erkrankungen der Hypophyse
	HVL-Insuffizienz, Hypophysentumoren, Hypophysitis
Tertiäre Hypothyreose	Erkrankungen des Hypothalamus
Resistenzsyndrome	Schilddrüsenhormonresistenz-Syndrome
	TSH-Rezeptor-Resistenz, TR β -Resistenz, G-Protein-Defekt (z.B. McCune-Albright-Syndrom), Mutationen im MCT-8-Transporter

1.2.3 Hyperthyreose

Bei der Hyperthyreose besteht ein Überschuss von Schilddrüsenhormonen an den Zielorganen. Es können verschiedene Ätiologien unterschieden werden. Am häufigsten sind eine Autonomie der Schilddrüse oder eine Autoimmunerkrankung wie der Morbus Basedow (Graves disease). Beide kommen etwa gleich häufig vor und machen zusammen ca. 95% der Hyperthyreosen in Deutschland aus [58].

Tabelle 1-6: Ursachen der Hyperthyreose

Häufige Ursachen	Funktionelle Autonomie der Schilddrüse M. Basedow
Weniger häufige Ursachen	Subakute Thyreoiditis (de Quervain) Postpartale Thyreoiditis Hyperthyreosis factitia Hashimoto-Thyreoiditis mit transienter hyperthyreoter Phase
Seltene Ursachen:	Metastatisches SD-Ca TSH-produzierender hypophysärer Tumor Hypophysäre Resistenz gegen T3, T4 Ektope Bildung von T3, T4 (z.B. Struma Ovarii) Blasenmole (HCG hat dieselbe α -Untereinheit wie TSH)

Beim Morbus Basedow handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung bei der vom Körper Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor gebildet werden. Durch diese kommt es zu einer Dauerstimulation der Schilddrüse und zur Aktivierung der Schilddrüsenhormonproduktion. In zwei Dritteln der Fälle manifestiert sich der M. Basedow vor dem 35. Lebensjahr, dabei sind Frauen in etwa fünfmal so häufig betroffen wie Männer. Klinisch auffällig ist neben den Symptomen der Hyperthyreose die Merseburger Trias mit Struma, Exophthalmus und Tachykardie sowie ein prätibiales Myxödem [62]. Die Behandlung erfolgt beim M. Basedow für 1 – 2 Jahre mit Thyreostatika, danach kann ein Auslassversuch gewagt werden, da Spontanremissionen beschrieben sind. Kommt es ohne Thyreostatika erneut zur Ausbildung einer Hyperthyreose, wird die Therapie zunächst medikamentös fortgesetzt, dann kann eine Strumektomie oder Radioiodthe-

rapie erfolgen. In Fällen von schwerer Ophthalmopathie kann eine langfristige medikamentöse Behandlung erwogen werden, da es häufig unter der Radioiodtherapie zur deutlichen Verschlechterung der Augenbeschwerden kommt [63].

Die funktionelle Autonomie der Schilddrüse ist eine Erkrankung der 2. Lebenshälfte. Es werden 3 Formen unterschieden: die unifokale, die multifokale und die disseminierte Autonomie. Bei der funktionellen Autonomie kommt es zu einer TSH-unabhängigen Schilddrüsenhormonproduktion. Das autonome Gewebe unterliegt nicht mehr der Steuerung durch den Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis. Trotz supprimierter TSH-Werte produziert dieses Gewebe weiterhin Schilddrüsenhormone in hohen Konzentrationen. Da diese Regionen bei der Szintigraphie vermehrt radioaktives Iod einlagern, werden sie als „heiße Knoten“ beschrieben. Klinisch imponiert die Hyperthyreose durch ein Struma (70-90% der Patienten), psychomotorischer Unruhe mit Tremor, einer Sinustachykardie, Haarausfall, Hypermetabolismus mit Gewichtsverlust, Wärmeintoleranz sowie Diarrhö [62]. Die Therapie der Autonomie besteht in der Wiederherstellung der euthyreoten Stoffwechsellaage durch Gabe von Thyreostatika und der anschließenden Strumektomie oder Radioiodtherapie. Eine post-interventionelle Hypothyreose kann leicht durch Gabe von L-Thyroxin behandelt werden.

1.3 Thyreostatika

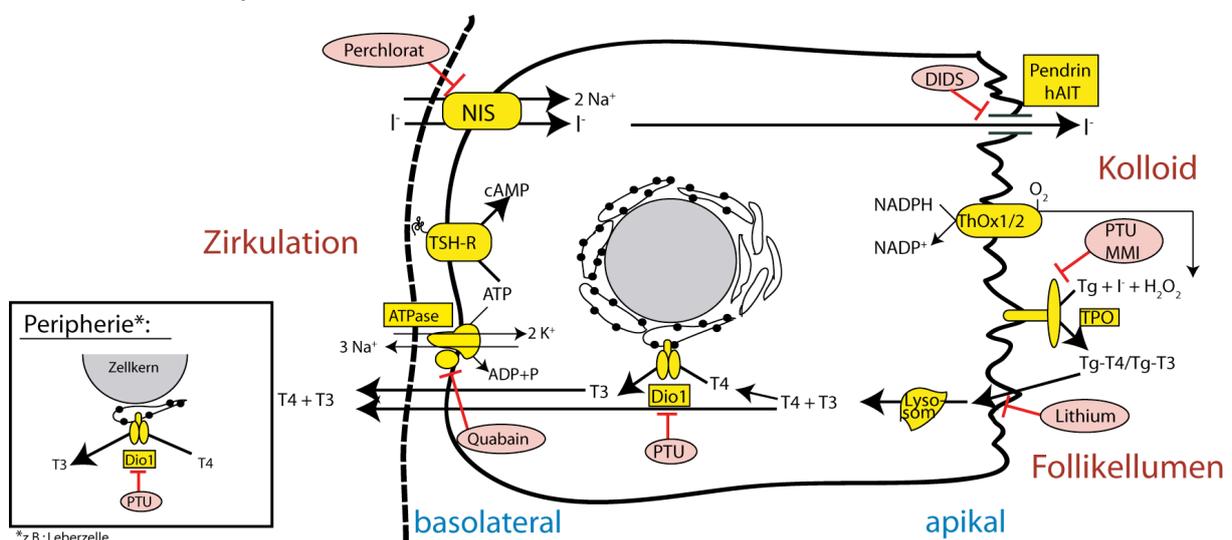
Thyreostatika sind Stoffe, welche die Schilddrüsenfunktion hemmen und zur Behandlung der Hyperthyreose eingesetzt werden. Zum einen gibt es die NIS-Blocker, welche die Aufnahme von Iod hemmen, zum anderen die Schilddrüsenhormon-Syntheseblocker, welche die Synthese von T_3 und T_4 unterbinden. Nach der Beobachtung, dass verschiedene Kohlsorten in Folge ihres Gehaltes an schwefelhaltigen Verbindungen bei Kaninchen Kropf erzeugten, wurde systematisch nach schwefelhaltigen Thyreostatika gesucht. Ausgehend von Thioharnstoff wurde eine Reihe wirksamer Thiamide gefunden. Thyreostatika sind mittlerweile schon seit über 50 Jahren zur Behandlung der Hyperthyreose im Einsatz und finden besonders bei der Therapie des Morbus Basedow weiterhin breite Anwendung [64]. Umfragen aus den 1990er Jahren zeigen, dass viele Endokrinologen in den USA und Europa Thyreostatika als Behandlungsmethode der ersten Wahl bei jungen Morbus Basedow Patienten sehen [65, 66]. Thyreostatika

werden auch heute initial zur Behandlung des Morbus Basedow eingesetzt. Bei Persistenz der Hyperthyreose über 12 Monate, fehlendem Ansprechen auf die medikamentöse Therapie oder einem Rezidiv wird je nach Risikoprofil und Wunsch des Patienten eine Radioiodtherapie oder Thyreoidektomie vorgenommen. Auch bei der Behandlung anderer Hyperthyreoseformen finden sie häufig initial bis zum Erreichen eines euthyreoten Zustands Anwendung, bevor mit einer Operation oder Radioiodtherapie fortgefahren wird [67]. Zur langfristigen medikamentösen Behandlung einer Hyperthyreose haben sich im Wesentlichen drei verschiedene Präparate auf dem Markt etabliert. Während in Europa und Asien häufiger Methimazol (MMI) eingesetzt wird, findet in den USA oft Propylthiouracil (PTU) Anwendung und in Großbritannien und den Ländern des ehemaligen British Commonwealth hauptsächlich Carbimazol [20].

1.3.1 Funktionsweise der Thyreostatika

Um die Funktionsweise der unterschiedlichen Thyreostatika zu verstehen, ist es hilfreich, zwischen den verschiedenen Substanzgruppen zu unterscheiden.

Abb. 1-9: Übersicht über die Angriffspunkte der verschiedenen Thyreostatika: PTU und MMI hemmen die TPO-vermittelte Iodisation, Perchlorat hemmt kompetitiv die Iodaufnahme.



1.3.1.1 NIS-Blocker

Die NIS-Blocker stellen eine Reihe einwertiger Anionen dar und können aufgrund ihres ähnlichen Ionenvolumens den aktiven Transport von Iodid in die Schilddrüse am Natrium-Iodid-Symporter kompetitiv hemmen, so dass die Iodidaufnahme der

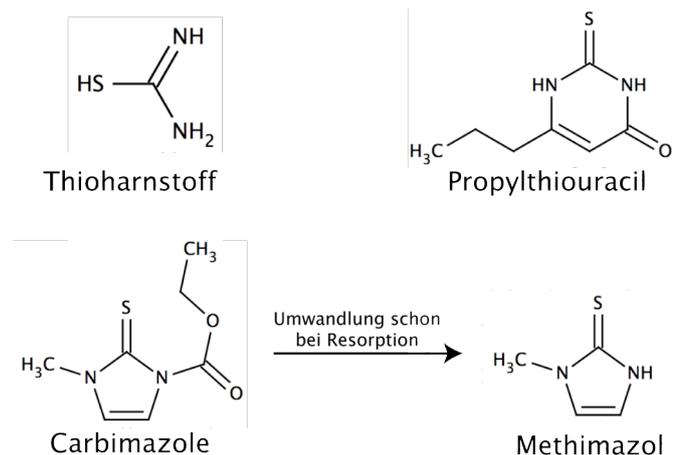
Schilddrüse vermindert wird. Zu dieser Gruppe gehören die Pseudohalogenide SCN^- , ClO_4^- und TcO_4^- . Perchlorat (ClO_4^- , Irenat[®]) wird nur verwendet, wenn Kontraindikationen gegen die Synthesehemmer bestehen oder die Gabe von iodhaltigen Kontrastmitteln bei latenter oder manifester Hyperthyreose erforderlich wird. Durch die vorherige Verabreichung von Perchlorat kann die unerwünschte Aufnahme von Iodid in die Schilddrüse effektiv vermindert werden. Perchlorat hat dosisabhängig beträchtliche Nebenwirkungen. Diese betreffen vor allem das blutbildende System (aplastische Anämien, Agranulozytosen, Thrombozytopenien), aber auch allergische Reaktionen, gastrointestinale Beschwerden sowie das nephrotische Syndrom sind beschrieben. Der strumige Effekt lässt sich über die verminderte periphere Hormonkonzentration und deren Wirkung auf den Schilddrüsenregelkreislauf erklären: Es kommt zu einem TSH Anstieg.

Zigarettenrauch enthält neben vielen anderen giftigen Verbindungen Blausäure und verschiedene Cyanide. Diese wirken ebenfalls als NIS-Blocker, so dass Rauchen die Iodidaufnahme der Schilddrüse beeinträchtigen kann.

1.3.1.2 Schilddrüsenhormon-Synthesehemmer

Zu den Synthesehemmern gehören die Substanzen PTU, MMI und dessen Prodrug Carbimazol. Diese gehören zur Gruppe der Thioamide und bestehen aus einer heterozyklischen Verbindung mit einer Sulfhydryl-Gruppe sowie einem Thioharnstoffrest.

Abb. 1-10: Chemische Strukturen der Thyreostatika PTU, MMI und Carbimazol im Vergleich mit Thioharnstoff.



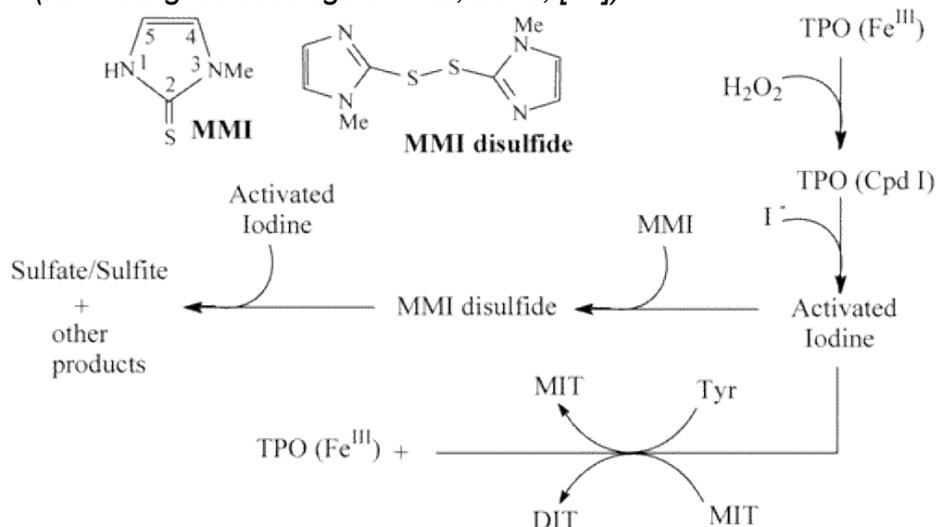
PTU, MMI und Carbimazol hemmen die Schilddrüsenhormonsynthese durch Störung der TPO-vermittelten Iodination von Tyrosin. Sie haben weder einen Effekt auf die Iodidaufnahme noch auf die Abgabe von Schilddrüsenhormonen. Der genaue Funktionsmechanismus der Hemmung ist noch nicht bekannt. Diskutiert werden zurzeit

hauptsächlich zwei verschiedene Theorien (siehe dazu auch die Beschreibung der Iodioxidation durch die TPO unter 1.1.3).

Im ersten Schritt wird der Fe^{III} -Kern der TPO durch endogenes H_2O_2 zum Compound I oxidiert, welches in zwei Isomeren vorkommt: Oxoferryl- π -Radikalkation und Protein-Radikal. Das π -Kation wird durch Bindung von Iodid zum Iodierungszwischenprodukt TPO-O-I Hypoiodid und reagiert anschließend mit dem Tg und übergibt dabei das Iod an die Tyrosylreste [19].

Bei der Theorie nach Aragoni et al. agieren MMI und PTU als alternatives Substrat für das Iodierungszwischenprodukt und binden das Iod, so dass es für eine Reaktion mit den Tyrosylresten des Tg nicht mehr zur Verfügung steht. Es wird vermutet, dass unter Bildung eines Zwischenproduktes das Iodid zunächst an das Schwefelatom der Thioharnstoffgruppe des Methimalzols bindet. Im nächsten Schritt entsteht aus zwei MMI-Molekülen ein MMI-Disulfid, welches dann weiter zu Sulfaten, Sulfiten und anderen Endprodukten abgebaut wird [68, 69].

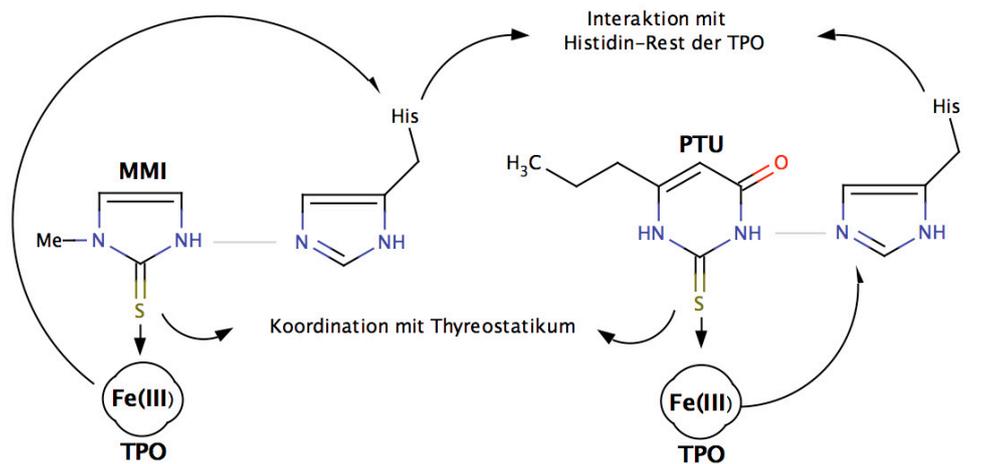
Abb. 1-11: Schematische Darstellung der Hemmung der TPO-Funktion durch MMI: Unter Einwirkung von MMI wird TPO-aktiviertes Iodid weggefangen und steht nicht für die Iodierung der Tyrosylreste zur Verfügung. Zwei MMI Moleküle werden zum Disulfid und schließlich zu Sulfaten, Sulfiten und anderen Produkten abgebaut. TPO Hypoiodid (TPO- Fe^{IV} -O-I) = Activated Iodine. (Abbildung nach: Aragoni et al., 2002, [68])



Eine andere Theorie geht ursprünglich auf Untersuchungen von Basosi et al. [70] zurück. Hier wird davon ausgegangen, dass MMI und PTU über ihre Thioamidgruppe mit dem Eisenkern der TPO interagieren und so die Funktion des Enzyms wirkungsvoll stören. Roy et al. [43] beschreiben das heute als kompetitive Koordination der Thioa-

midgruppe mit dem Fe^{III} -Kern der TPO. Unterstützt wird dieser Prozess zusätzlich durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Histidin-Rest des Enzyms.

Abb. 1-12: Hypothese der kompetitiven Hemmung der TPO:
 Durch Koordination der Thioharnstoffderivate MMI und PTU zum $\text{Fe}(\text{III})$ -Kern der TPO kommt es zur kompetitiven Inhibition der Hormonsynthese. Unterstützt wird dieser Prozess zusätzlich durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Histidin-Rest der TPO. (Abbildung nach: G. Roy et al., 2005, [43])



Einen Teil der antithyreoidalen Wirkung des PTU geht auf die Inhibition der Dio1 zurück. Dieses Enzym sorgt für die periphere Deiodierung von T_4 in das biologisch aktive T_3 . Insbesondere bei Hyperthyreose steigt die Dio1 Aktivität und folglich die Bildung von T_3 . Die Hemmung der Dio1 durch PTU wirkt dem effektiv entgegen. PTU reagiert mit dem Sel-Zwischenprodukt der Dio1 und bildet unter Abspaltung des Iodids als Endprodukt ein Selenylsulfid. Diese Verbindung ist sehr stabil und führt damit zur irreversiblen Hemmung der Dio1. Für weitere Informationen siehe auch Abschnitt 1.1.4 und Abbildung 1-7.

1.3.1.3 Iodid

Iodid führt in hohen Dosen zur sofortigen Hemmung der Iodorganifizierung und damit zur Reduktion der Schilddrüsenhormonsynthese. Zusätzlich wird die Freisetzung der Schilddrüsenhormone kurzfristig blockiert (Hemmung der Thyreoglobulinproteolyse). Der genaue Funktionsmechanismus ist bisher noch nicht bekannt. Denkbar ist eine Blockierung der Freisetzung von T_3 und T_4 durch Hemmung der Proteasen oder die Beeinträchtigung des Iodeinbaus in die Tyrosylreste des Tg. Dieser Mechanismus wird nach den Erstbeschreibern als Wolff-Chaikoff-Effekt bezeichnet. Zusätzlich kommt es über eine verminderte Genexpression des Natrium-Iodid-Symporters zur Blockierung der Iodidauf-

nahme in die Schilddrüse [71]. Anwendung findet die auch als „Plummern“ bekannte Gabe von hohen Iodiddosen nur noch selten in der Operationsvorbereitung bei konservativ nicht beherrschbarer Hyperthyreose.

1.3.1.4 Lithiumionen

Lithium in Form einiger seiner Salze wird häufig in der Therapie manischer und bipolarer Erkrankungen eingesetzt. Zur Rezidivprophylaxe wird es oft über Jahre hinweg von den Patienten eingenommen. Lithium wird in der Schilddrüse angereichert und inhibiert in der Folge die Iodidaufnahme des Thyreozyten. Zusätzlich hemmt Lithium die Kopplung von Iodid an den Tyrosylrest des Tg, verändert die Struktur des Tg und hemmt die Sekretion der Schilddrüsenhormone [72]. Die Sekretionshemmung stellt hierbei den wichtigsten Effekt dar. Die niedrigen Schilddrüsenhormonwerte führen zu einem TSH-Anstieg und zur Ausbildung einer hypothyreoten Struma [73]. Vor Beginn einer Lithiumtherapie sollten daher die Serumwerte von TSH, fT_3 , fT_4 und TPO-AK bestimmt und eine Sonographie der Schilddrüse durchgeführt werden. Jährlich sollten im Anschluss zumindest die TSH Serumspiegel kontrolliert werden. Außerdem kann mit Lithium-Salzen bei iodinduzierter Thyreotoxikose der Versuch unternommen werden, die Freisetzung von Thyroxin aus Tg zu hemmen, falls andere Therapiemaßnahmen fehlschlagen [74].

1.3.1.5 Benzophenon-2

Benzophenone werden als chemische UV-Filter in Sonnenlotionen, Lippenstiften, Cremes und Haarpflegemitteln eingesetzt. Diese Substanzen ziehen im Gegensatz zu physikalischen UV-Filtern wie Titandioxid oder Zinkoxid in die Haut ein und absorbieren aufgrund ihrer π -Bindungssysteme die UV-Strahlung. 12 Derivate der Grundstruktur Benzophenon (BP-1 bis BP-12) sind als UV-Filter im Gebrauch. Im europäischen Raum wird 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (BP-2) zum Produktschutz Plastik- und Gummierzeugnissen beigefügt und darf im asiatischen Raum als UV Schutz mit bis zu 10% Gehalt benutzt werden. In Europa ist BP-2 nicht auf der Positivliste für Sonnenschutzmittel (Council Directive 76/768/EEC) aufgeführt, darf aber Kosmetika zum Produktschutz beigefügt werden. Neuere Untersuchungen in vitro und an Ratten zeigen, dass BP-2 in der Lage ist, die TPO zu hemmen. In der Folge kam es zu einem signifikanten Abfall der T_4 -Konzentration und Anstieg der TSH-Konzentration im Serum [75]. Außerdem wurde für BP-2 eine estrogene Wirkung festgestellt [76, 77].

1.4 Fragestellung

Die Behandlung der Hyperthyreose stützt sich heute auf die drei therapeutischen Säulen: Thyreostatika, Radioiodtherapie und die operative Entfernung der Schilddrüse. Die relativ geringe biologische Wirksamkeit der Thyreostatika macht eine hohe Dosierung erforderlich, welche allerdings die Ursache des ungünstigen Nebenwirkungsprofils darstellen könnte. Für eine lebenslange Therapie werden sie daher nur ungern eingesetzt. Bei einigen Patienten erweisen sich die Substanzen zudem als komplett unwirksam. Besteht keine Hoffnung mehr auf Remission wird als Therapie der Wahl die Thyreoidektomie bzw. die Radioiodtherapie der Thyreostatikagabe vorgezogen.

Wünschenswert wäre es daher ein Thyreostatikum zu entwickeln, welches eine bessere Wirksamkeit bereits in niedrigerer Konzentration besitzt und bei weniger Nebenwirkungen ohne Bedenken lebenslang verabreicht werden kann. Die medikamentöse Behandlung mit diesem Thyreostatikum wäre dann den invasiven Methoden vorzuziehen. Ein erster entscheidender Schritt in diese Richtung war die Entdeckung durch das Forschungsteam um Dietrich Behne [78] im Jahr 1990 und Marla J. Berry [25] im Jahr 1991, dass die Typ I 5'-Deiodase (Dio1) ein Selenoenzym ist und in ihrem aktiven Zentrum Selenocystein anstelle von Cystein enthält. Vorarbeit wurde hierzu bereits 1990 durch Arthur et al. [79] geleistet. Daher wurde vermutet, dass selenhaltige Thyreostatika leichter als schwefelhaltige Derivate Bindungen mit dem aktiven Zentrum der Deiodasen eingehen und in der Folge zu einer verstärkten Inhibition führen könnten. Grundlage dieser Annahme ist, dass Selen durch seine höhere Nucleophilie eine „Enzym-Se—Se-R“-Bindung bereitwilliger eingehen könnte als Schwefel eine „Enzym-Se—S-R“-Bindung.

Es wurde damit begonnen, selenhaltige Derivate der bekannten Thyreostatika zu entwickeln und auf Ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen [25, 80].

Visser et al. berichteten in einer in vitro durchgeführten Studie von 1992 über eine 2-fach höhere Potenz des Propylselenouracils (PSeU) auf die Hemmung der Dio1 im Vergleich zum klassischen schwefelhaltigen PTU [81]. Auch für Methyl-2-Selenoimidazol (MSeI) wurde eine höhere Potenz der Hemmung der Dio1 in vitro im Vergleich zum klassischen MMI gefunden. Allerdings konnten diese Ergebnisse von

Taugog et al. [80] in vivo für die beiden Substanzen nicht bestätigt werden. Hier sind die klassischen schwefelhaltigen Derivate klar überlegen. PTU hemmt in vivo die Dio1 viel potenter als PSeU und auch MMI und MSeI hemmen die Dio1 nur in sehr hohen Konzentrationen [82]. In der Wirksamkeit hinsichtlich der Hemmung der TPO konnte in vivo kein Unterschied zwischen den Selen- und Schwefelderivaten gefunden werden [19].

Ziel dieser Arbeit war, neue schwefel- und selenhaltige Derivate der bekannten Thioharnstoff-Thyreostatika (MMI und PTU) hinsichtlich ihrer Wirkung auf die humane TPO und die Typ I 5'-Deiodase (Dio1) zu untersuchen. Die bisher eingesetzten Thyreostatika MMI und PTU inhibieren die Schilddrüsenhormon-Biosynthese durch Hemmung der TPO. Zusätzlich inhibiert PTU den Schilddrüsenhormon-Metabolismus durch Effekte auf die Dio1.

Es sollte festgestellt werden, in welcher Weise sich die chemische Modifikation dieser Substanzen, insbesondere das Ersetzen von Schwefel durch Selen, auf deren inhibitorische Eigenschaften auswirkt. Das langfristige Ziel ist, Medikamente mit einer optimierten anti-thyreoidalen Wirkung zu erhalten. Zusätzlich ist eine gegen die TPO gerichtete Wirkung von einer gegen die Dio1 gerichteten zu trennen, um auf diese Weise gezielt gegen die unterschiedlichen Symptome der Hyperthyreose vorgehen zu können. Außerdem könnte durch chemische Modifikation der Substanzen (z. B. Ersetzen der Schwefel- durch eine Selengruppe), welche zu einer besseren biologischen Aktivität führt, Nebenwirkungen eliminiert oder zumindest minimiert werden. Anhand von Proteinextrakten aus den humanen Zelllinien FTC-238/TPO und Hep-G2, welche enzymatisch aktive TPO bzw. Dio1 enthalten, sollten anhand verschiedener Assays die inhibitorischen Eigenschaften der neuen Thioharnstoff-Derivate überprüft und mittels Dosis-Wirkungskurven die IC50-Werte bestimmt werden.

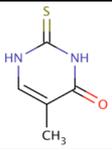
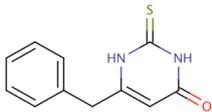
2. Material und Methoden

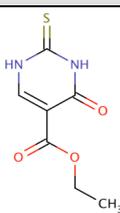
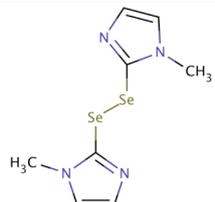
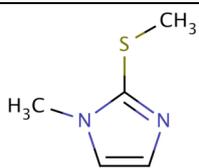
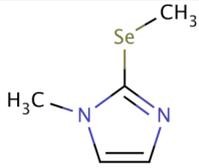
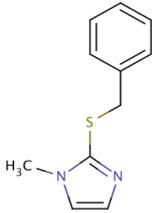
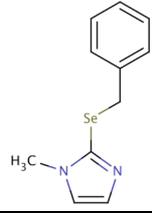
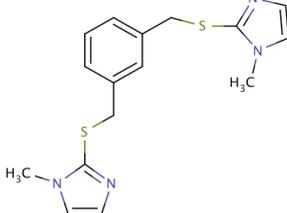
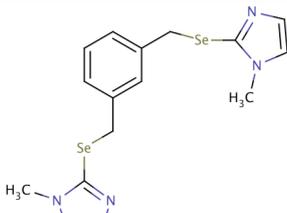
2.1 Material

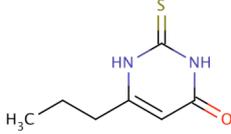
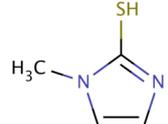
2.1.1 Die untersuchten Thioharnstoff- und Selenoharnstoffderivate

Die Thioharnstoff- und Selenoharnstoffderivate wurden durch Prof. G. Mugesh vom „Indian Institute of Science“ aus Bangalore in Indien synthetisiert und dem Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité freundlicherweise für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Substanzen wurden zunächst mit den Bezeichnungen c1 bis c10 durchnummeriert, so dass im weiteren Text die Substanzen unter diesen Bezeichnungen geführt werden. Die Derivate gelangten in teils fester, teils flüssiger Form zu uns. Da eine Lösung in H₂O nicht bei allen Substanzen möglich war, wurden alle zunächst in DMSO in einer Konzentration von 100 mM gelöst. Die weiteren Verdünnungen wurden in H₂O im Verhältnis von 1:10 bis zu einer Minimalkonzentration von 100 nM durchgeführt. Ausnahmen von dieser Regel bildeten die beiden Substanzen c2 (6-BTU) und c4. Bei der Substanz c2 wurde die Verdünnung bis zu 10 mM in DMSO durchgeführt, da eine Lösung in H₂O erst ab einer Endkonzentration von 1 mM möglich war. Die Substanz c4 konnte als höchste Konzentration nur als 25 mM Lösung in DMSO hergestellt werden, die Verdünnung auf 10 mM fand dann in H₂O statt.

Tabelle 2-1: Namen, Aggregatzustände, Molekularmassen und Strukturformeln der untersuchten Substanzen.

Nr.	Chemischer Name	Aggregatzustand bei 20°C	Molekularmasse (Da)	Strukturformel
c1 5-MTU	5-Methyl-2-thiouracil C ₅ H ₆ N ₂ OS	Fest	142,2	
c2 6-BTU	6-Benzyl-2-thiouracil C ₁₁ H ₁₀ N ₂ OS	Fest	218,3	

Nr.	Chemischer Name	Aggregatzustand bei 20°C	Molekular- masse (Da)	Strukturformel
c3 5-CETU	5-Carboethoxy-2-thiouracil $C_7H_8N_2O_3S$	Fest	200,2	
c4 (MSeI)	$C_8H_{10}N_4Se_2$	Fest	320,1	
c5	$C_5H_8N_2S$	Flüssig	128,2	
c6	$C_5H_8N_2Se$	Flüssig	175,1	
c7	$C_{11}H_{12}N_2S$	Flüssig	204,3	
c8	$C_{11}H_{12}N_2Se$	Flüssig	251,2	
c9	$C_{16}H_{18}N_4S_2$	Flüssig	330,5	
c10	$C_{16}H_{18}N_4Se_2$	Flüssig	424,3	

Nr.	Chemischer Name	Aggregatzustand bei 20°C	Molekularmasse (Da)	Strukturformel
PTU	6-n-Propyl-2-sulfanyl-pyrimidin-4-ol C ₇ H ₁₀ N ₂ OS	Fest	170,2	
MMI	1-methyl-3H-imidazole-2-thione C ₄ H ₆ N ₂ S	Fest	114,2	

2.1.2 Chemikalien für die Zellkultur

Tabelle 2-2: Chemikalien für die Zellkultur

Chemikalien	Firma	Artikelnummer	Menge
Iscoves Medium	Biochrom	FG 0465	500 ml
HBSS	Gibco	14175-046	100 ml
Trypsin / EDTA	Biochrom	L 2143	100 ml
Hematin	Sigma	H 3281	250 mg
Penicillin / Streptomycin 10000µg/ml	Biochrom	A 2213	100 ml
FCS (fötale Kälberserum)	Biochrom	S 0115	500 ml
Geneticin G 418	Calbiochem	3458 12	20 ml
DMEM / F-12 (1:1) + L-Glutamin + 15mM HEPES	Gibco	31330	500 ml
Natrium-Selenit (Na ₂ SeO ₃)	Sigma	S 5261	100 g

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

Tabelle 2-3: Materialien für die Zellkultur

Materialien	Firma	Artikelnummer
Zellkulturflaschen T 75	Biochrom	P 90750
Zellkulturflaschen T 150 „peel off“	Biochrom	P 90551
Sterile Einmal-Pipetten 2 ml	Biochrom	P 94002
Sterile Einmal-Pipetten 5 ml	Biochrom	P 94005
Sterile Einmal-Pipetten 10 ml	Biochrom	P 94010
Sterile Einmal-Pipetten 25 ml	Biochrom	P 94025
Zellschaber	Biochrom	P 99030
15 ml Rührchen	Biochrom	P 91015
50 ml Rührchen	Biochrom	P 91050

2.1.4 Geräteliste für die Zellkultur

Folgende Geräte wurden für die Durchführung der Aufzucht und Ernte der FTC-238/TPO und Hep-G2 Zellen verwendet:

- *Brutschrank (Fa. Heraeus, Typ: HB 2448 K GS) 37°C, 5% CO₂*
 - Aufzucht der Zellen -
- *Sterilwerkbank mit Absaugvorrichtung (Fa. Heraeus: Laminair HB 2448)*
 - steriles Arbeiten mit Zellen -
- *Wasserbad (Fa. GFL 1083), 37°C*
 - zum Temperieren der Zellkulturmedien -
- *Routine-Mikroskop (Fa. Hund, Wetzlar, Typ: Wilovert 30)*
 - visuelle Kontrolle der Zellen -
- *Zentrifuge (Fa. Heraeus: Megafuge 1,0 R, Rotor: BS 4402/A)*
 - zum Abzentrifugieren der geernteten Zellen -

2.1.5 Chemikalien und Materialien für die Extraktpräparation

Tabelle 2-4: Materialien für die Extraktpräparation

Materialien	Firma	Artikelnummer
Digitonin	Sigma	D 5628
Hematin	Sigma	H 3281
Kaliumiodid	Merck	1.05043
TrisHCl	Merck	1.08382.2500
Ultrazentrifugen-Röhrchen, Typ: 11 x 34 mm	Beckmann	347287

2.1.6 Geräteliste für die Extraktpräparation

- *Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf 5417R)*
 - für Zentrifugationsschritte -
- *Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann: Optima MAX 130.000 rpm) und Rotor für Ultrazentrifuge: MLA-130*
 - Ultrazentrifugation zur Gewinnung des TPO-Extraktes -
- *Ultraschallprozessor (Fa. B. Braun: Labsonic M)*
 - zum Homogenisieren der geernteten Zellen -
- *Photometer (Fa. Eppendorf: BioPhotometer)*
 - für die Proteinbestimmung -
- *Pipetten: 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl Eppendorf Research-Pipetten*
- *PC mit Software*
 - für die Auswertung: Microsoft Exel, Eppendorf BioPhotometer-PC-online -

Tiefkühler -20°C: Lagerung von Probenmaterial

Tiefkühler -80°C: Lagerung von Probenmaterial

Kühlschrank 4°C: Lagerung von Reagenzien und Medien

2.1.7 Chemikalien für den Guaiacol Assay

Tabelle 2-5: Chemikalien für den TPO Assay

Chemikalien	Firma	Artikelnummer	Menge
Guaiacol	Sigma	G 5502	250 g
H ₂ O ₂	Merck	1.88597.1000	1 l
DMSO	Sigma	D 5879	250 ml
K ₂ HPO ₄	Roth	6875	1 kg
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873.1000	1 kg

2.1.8 Geräteliste für den Guaiacol Assay

- *Photometer HITACHI Typ: U-2001*
- für die Messung der TPO-Enzymaktivität -
- *Pipetten: 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl Eppendorf Research-Pipetten*
- *PC mit Software: Microsoft Exel 2004, Hitachi UV-Solutions, GraphPad Prism 4.0*

2.1.9 Chemikalien für den Deiodase-1 Assay

Tabelle 2-6: Chemikalien für den Deiodase-1 Assay

Chemikalien	Firma	Artikelnummer
L-3,3',5'-[¹²⁵ I]-Triiodthyronin (¹²⁵ I-rT3)	PerkinElmer	NEX109250UC
Sephadex LH20	Amersham Biosciences	17-0090-01
Salzsäure (HCl)	Merck	1.09063.1000
Stickstoff (N ₂)	Linde	
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck	K32910263405
Dowex	BioRad	142-1241
Ethanol 100%	J. T. Baker	0629006006
Amminiumhydroxyd-Lösung (NH ₄ OH)	Fluka	09856
D(+)-Saccharose	Roth	4661.1
Hepes	Merck	1.10110
EDTA-Na-Dihydrat	Sigma	E-5134
Dithiothreitol (DTT)	Sigma	D-9779
K ₂ HPO ₄	Roth	6875.1
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873.1000
NaOH	Merck	OC 332254
6n-Propyl-2-thiouracil (PTU)	ICN Pharma	102748
3,3',5'-Triiodthyronin	Formula	Bestellung über Dr. Thoma
Sephadex LH20	Amersham Biosciences	17-0090-01
BSA	Serva	11930
Trichloressigsäure	Fulka	91232

2.1.10 Materialien für den Deiodase-1 Assay

Tabelle 2-7: Materialien für den Deiodase-1 Assay

Materialien	Firma	Artikelnummer
Filter, 10 µl Porengröße	MoBiTec	M2210
Sarpettenspitze 2ml, PP	Sarstedt	91.778.003
Röhrchen 15 ml	TPP	91015
Glaseröhrchen (Borosilikatglas) 16x100 mm	Corning Inc.	99445-16
Zählröhrchen, 5 ml, 75x12 mm	Sarstedt	55.476

2.1.11 Geräteliste für den Deiodase-1 Assay

Gammazähler (LKB - Wallac, 1277 Gammamaster, automatic gamma counter)

Zentrifuge für Eppendorf Tubes (Eppendorf Zentrifuge 5415C)

Vortex-Mixer (NeoLab, 7-2020)

Heizplatte (A. Hartenstein, L32)

Zentrifuge für 16x100 mm Glaseröhrchen (Heraeus Sepathech, Cryofuge 5000)

2.1.12 Lösungen für den Deiodase-1 Assay

1. Dowex-50 WX-2-Säulen:

300 ml Dowex wurden mit 10%iger Essigsäure auf 500 ml aufgefüllt und gut verrührt. Die Säulen wurden luftblasenfrei mit einer Pipette so befüllt, dass für ein Volumen von 2,0 ml Platz blieb.

2. Essigsäure (10%):

Für die 10 %ige Essigsäure wurden 100 ml Eisessig (100%) mit destilliertem H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

3. EtOH:NH₄OH (49:1) – Elutionslösung für den Tracer:

Für die Elutionslösung wurden 98,0 ml Ethanol mit 2,0 ml Ammoniumhydroxid-Lösung (NH₄OH) gemischt.

4. Homogenisationspuffer:

21,39 g	D(+)-Saccharose (250 mM)
1,19 g	HEPES (20mM)
0,50 ml	0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 (1 mM)
<u>249,5 ml</u>	<u>H₂O</u>
= 300 ml	Gesamtvolumen

Saccharose und HEPES wurden in destilliertem H₂O gelöst, der pH-Wert bei 7,4 eingestellt, die Lösung auf ein Volumen von 249,5 ml gebracht und mit 0,5 ml der EDTA-Lösung versetzt. Der Puffer wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Jeweils kurz vor Gebrauch wurde 1 µl DTT (1 mol/l) je ml Homogenisationspuffer frisch dazugegeben, um eine Endkonzentration von 1 mM zu erreichen.

5. KPO₄-Puffer + 10 mM EDTA, pH 6,8:

Puffer A (pH 9,04): Für diesen Puffer wurden 43,55 g K₂HPO₄ und 0,93 g EDTA-Na-Dihydrat gemischt und in destilliertem H₂O gelöst. Das Gesamtvolumen betrug 250 ml.

Puffer B (pH 4,40): 34,03 g KH₂PO₄ wurden mit 0,93 g EDTA-Na-Dihydrat gemischt und mit destillierten H₂O auf 250 ml aufgefüllt.

Zur Herstellung des KPO₄-Puffers wurden 200 ml von Puffer A vorgelegt und anschließend durch Titrieren mit Puffer B auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt.

6. NaOH-Lösung (40 mM):

Es wurden 1,6 g NaOH mit destilliertem H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

7. NaOH-Lösung (100 mM):

Es wurden 4,0 g NaOH mit destilliertem H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

8. PTU-Stammlösung (100 mM):

Zur Herstellung der PTU-Stammlösung wurden 1,7 g PTU (6-n-Propyl-2-thiouracil) in 80 ml 40 mM NaOH für 2 Stunden gelöst und anschließend solange tropfenweise mit 0,1 M NaOH-Lösung versetzt bis die Lösung klar wurde. Es wurde darauf geachtet, dass der pH-Wert der Lösung unter 9,0 lag. Verdünnungen der Stammlösung fanden in 40 mM NaOH statt.

9. rT_3 -Stammlösung

Es wurde durch Lösen von rT_3 (M_r 651,0) in 40 mM NaOH eine 10 mM rT_3 -Stammlösung hergestellt.

10. Sephadex LH20 (für 100 ml)

20 g Sephadex LH20 wurden mit ca. 80 ml 0,1 N HCl gemischt und auf ein Volumen von 100 ml gebracht.

11. Stopp-Lösung (für 100 ml)

Für die Stopplösung wurden 10 g BSA mit 10 ml 100 mM PTU-Stammlösung gemischt und mit destilliertem H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

12. TCA-Lösung (10%)

100 g Trichloressigsäure wurden durch Zugabe von H_2O auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml gebracht.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der FTC-238/TPO Zelllinie

Die für diese Untersuchungen verwendete FTC-238/TPO Zelllinie wurde von Petra Ambrugger et al. (2003) etabliert und mir freundlicherweise für meine Versuche überlassen [75, 83].

Die humane follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-238 wurde aus dem Gewebe einer Lungenmetastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eines 42-jährigen Mannes isoliert und als Zelllinie etabliert. Die FTC-238 Zellen können endogen keine TPO mehr exprimieren. Ambrugger et al. bezogen diese Zellen von P. Goretzki, Städtische Kliniken Neuss - Lukaskrankenhaus GmbH, Neuss, Deutschland.

Mit dem Ziel, die FTC-238 Zellen humane TPO exprimieren zu lassen, wurde zunächst der eukariotische high copy number Vektor pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) von Ambrugger et al. mit einer cDNA, welche für humane TPO kodiert, ligiert und in *Escherichia coli* vermehrt. Anschließend wurden die FTC-238 Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion für drei Tage in Selektionsmedium mit 700 µg/µl G418 (PAA Laboratories, Coelbe, Deutschland) inkubiert. 12 Einzelklone wurden isoliert, ausgesät und im Guaiacol Assay [84] auf ihre TPO-Aktivität untersucht. Der Klon mit der höchsten Aktivität wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt, expandiert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.2 Kultivierung der FTC-238/TPO Zellen

Die kryokonservierten FTC-238/TPO Zellen wurden aufgetaut und in einer T75-Zellkulturflasche in 15 ml Iscoves Selektions-Zellkulturmedium ausgesät. Dieses enthielt neben 10% FCS auch 2 mg/ml Penicillin / Streptomycin sowie 1,4 mg/ml G 418. Die Zellen wurden in einem Brutschrank vom Typ HB 2448 K GS der Firma Heraeus bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und täglich mikroskopisch untersucht, um Kontaminationen auszuschließen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zellen konnten nach dreitägigem Wachstum jeweils im Verhältnis 1:8 gesplittet werden. 48 Stunden vor der

Ernte wurde zu den Zellen Hematin gegeben. Dafür wurden 0,25 mg/ml Hematin in 1M NaOH gelöst und 20 µl davon in 500 ml Medium gegeben.

2.2.3 TPO Extraktpräparation

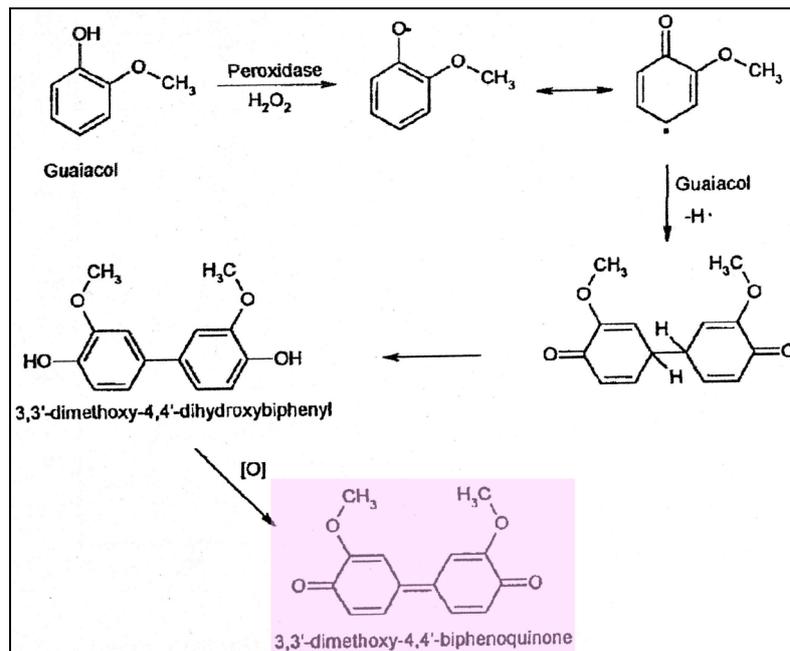
Zum Ernten der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen auf Eis gebettet und zweimal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 3 ml eiskaltem PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber der Firma Biochrom abgeschabt und in 50 ml Röhren vereinigt. Dann wurden sie in einer Zentrifuge (Fa. Heraeus, Rotor Typ: BS 4402/A) bei 4°C und 1000 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Der Niederschlag wurde anschließend in jeweils 3,5 ml einer Lösung aus 50 mM TrisHCl und 1 mM KI bei pH 7,2 resuspendiert. Die Suspensionen wurden gleichmäßig portioniert und mit einer Ultraschallnadel mit 20 Impulsen von je 0,6 sec. Dauer und einer Amplitude von 100% sonifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspensionen als Zeichen für die Zerstörung der Zellmembran möglichst klar wurden. Anschließend wurden die Proben vereinigt und auf zehn 1,5 ml Ultrazentrifugen-Röhren (Fa. Beckmann) aufgeteilt. Die Zellsuspensionen wurden dann bei 4°C für eine Stunde bei 31.000 rpm (100.000 x g) zentrifugiert. Später wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Der Niederschlag wurde in je 1,3 ml 1%igem Digitonin resuspendiert und 24 h bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die zweite Zentrifugation bei 4°C und 31.000 rpm für eine Stunde. Die Überstände mit den solubilisierten Zellmembranbestandteilen, also auch der TPO, wurden entnommen und vereinigt. Die enthaltene Proteinmenge wurde mit Hilfe des BioRad Protein Assays nach der Methode von Bradford [85] bestimmt. Die Extrakte wurden anschließend aliquotiert und zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.2.4 Beschreibung des Guaiacol Assays

Der Guaiacol Assay ist ein klassisches Verfahren zur Untersuchung von verschiedenen Peroxidasen [84, 86]. Bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau wurde die Aktivität der Schilddrüsen-Peroxidase (TPO) durch den Umsatz von Guaiacol gemessen. Guaiacol fungiert in diesem Fall als Substrat für die TPO. Die TPO oxidiert Guaiacol, als Co-substrat dient dabei H₂O₂. Bei der Reaktion entsteht dann aus jeweils zwei Guaiacol-

Molekülen 3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenol. Diese Verbindung besitzt konjugierte Doppelbindungen und stellt damit chemisch gesehen einen Farbstoff dar. Der Umsatz der TPO kann daher durch Messung der photometrischen Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 470 nm bestimmt werden.

Abb. 2-1: Umsatz von Guaiacol durch die humane TPO unter Entstehung eines Farbstoffes und messbarer Änderung des Absorptionsspektrums mit einem Maximum bei 470 nm. (nach Doerge et al., 1997, [86])



Alle Messungen fanden bei einer Wellenlänge von 470 nm statt. Die Proteinmenge wurde so gewählt, dass während der Reaktion eine Delta optische Dichte (ΔOD) von ca. 0,1/min erreicht wurde und die Reaktion während der zur Auswertung verwendeten Zeit (20 – 50 sec.) linear verlief. Die eingesetzte Proteinmenge unterschied sich entsprechend der spezifischen Aktivität der eingesetzten Extraktpräparationen. Die Aktivität der Extrakte war aber innerhalb der Aliquote einer Zellaufzucht und Extraktpräparation konstant.

In jede Küvette wurden 500 μl 100 mM KPO_4 -Puffer und 400 μl 100 mM Guaiacol gegeben. Bei den Kontrollgruppen wurden jeweils 10 μl H_2O oder 10 μl DMSO hinzugegeben. Zu allen anderen Küvetten wurden 10 μl Stammlösung der zu untersuchenden Substanz in den entsprechenden Konzentrationen gegeben, um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen. Destilliertes H_2O wurde zum Erreichen des benötigten Ge-

samtvolumens von 1 ml entsprechend dazugegeben. Es konnten jeweils 2 Proben gleichzeitig gemessen werden. Die beiden Küvetten wurden in die Kammern eins und zwei des Photometers (HITACHI Typ: U-2001) gegeben und die Reaktion durch die Zugabe von 25 μl H_2O_2 gestartet. Vor Beginn der Messung wurden die Proben möglichst zügig und ausreichend gemischt. Die Messung fand über einen Zeitraum von 120 sec. statt, wobei die beiden Proben wechselweise alle 10 sec. gemessen wurden.

Tabelle 2-8: Reagenzien für den TPO Assay

Substanz	Menge
100 mM KPO_4 -Puffer (pH 7,4)	500 μl
100 mM Guaiacol	400 μl
TPO-„Inhibitor“ (c1-c10)	10 μl
100-200 μg TPO-Extrakt (auf Eis)	Variiert je nach eingesetztem Extrakt
H_2O	ad 1 ml
30%iges H_2O_2 1:1000	25 μl
Gesamtvolumen pro Küvette	1000 μl

Die gemessenen Absorptionswerte wurden mit der Software „UV Solutions“ der Firma HITACHI aufgezeichnet und anschließend in „Microsoft Excel“ exportiert. Zur Berechnung der einzelnen ΔOD zwischen 20 und 50 sec. sowie des durchschnittlichen ΔOD in dieser Zeit wurde das von mir programmierte AppleSkript-Programm „TPO Auswertung“ benutzt, welches die Daten entsprechend formatiert und die notwendigen Formeln in Microsoft Excel automatisch einfügt.

Die durchschnittlichen ΔODs der einzelnen Proben mit den unterschiedlichen Substanzkonzentrationen von c1 bis c10 und die Duplikate wurden mit den jeweiligen Tageskontrollen verglichen und in Teilen von Hundert dargestellt. Zur Auswertung wurden die Daten von Microsoft Excel in GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, California, USA) überführt. Mit GraphPad Prism 4.0 wurden dann sigmoidale Dosis-Wirkungskurven erstellt und die IC_{50} -Werte für die einzelnen Substanzen berechnet.

2.2.5 Kultivierung der Hep-G2 Zellen

Hep-G2 Zellen sind humane Leberzellen, welche unter anderem auch die humane Dio1 exprimieren. Die Zelllinie wurde 1975 aus Tumorgewebe eines hepatozellulären Karzinoms eines 15-jährigen argentinischen Jungen etabliert (ATCC[®] Nummer: HB-8065[™]).

Die Hep-G2 Zellen wurden in DMEM / F-12 - Medium mit 10% FCS und 100 nM Selen in einem Brutschrank vom Typ HB 2448 K GS der Firma Heraeus bei 37°C und 5 % CO₂ angezüchtet und täglich mikroskopisch untersucht. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Wachstumszeit bis zur Konfluenz betrug ca. 5 Tage, die Zellen konnten dann im Verhältnis 1:4 gesplittet werden.

2.2.6 Hep-G2 Extraktpräparation

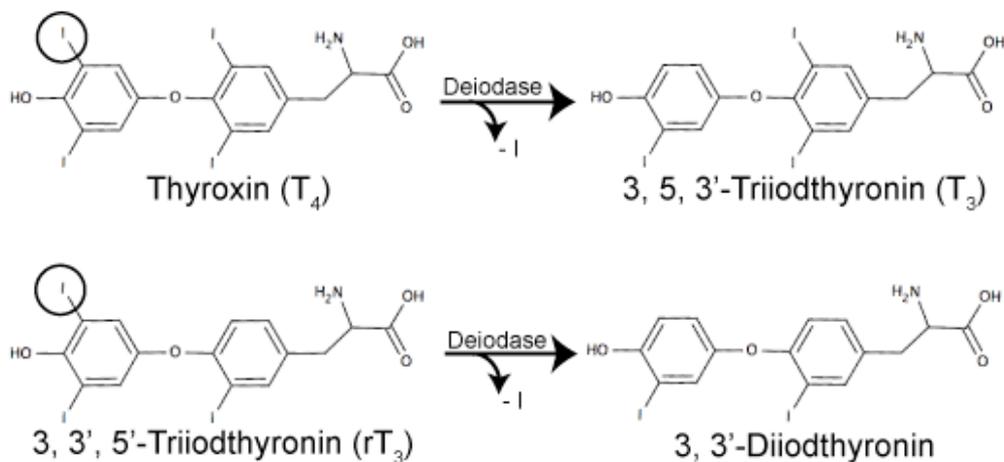
Für die Versuche wurden rund 120 große Zellkulturflaschen T150 mit Hep-G2 Zellen angezüchtet. Die Zellen wurden dann trypsinisiert und in 3 ml Homogenisationspuffer gerntet und in einem Reagenzglas gesammelt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in Homogenisationspuffer resuspendiert und 5- bis 10-mal durch eine 20 G Kanüle gezogen. Die Suspension wurde auf 2 ml Tubes (Fa. Eppendorf) portioniert und mit einer Ultraschallnadel mit 25 Impulsen von je 0,6 sec. Dauer, 200 W und einer Amplitude von 100% sonifiziert und anschließend bei 10 000 x g bei 4°C für 10 Minuten in einer vorgekühlten Zentrifuge (Fa. Eppendorf Typ 54172) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde erneut in Homogenisationspuffer mit 1 mM DTT aufgenommen, mit einer 20 G Kanüle gemischt und ein zweites Mal mit 25 Impulsen von 0,6 sec. Dauer sonifiziert. Die Proben wurden zusammengeführt, eine Proteinbestimmung nach Bradford [85] durchgeführt und abschließend durch Zugabe von Homogenisationspuffer mit 1 mM DTT auf die gewünschte Proteinkonzentration von 1,25 µg/µl (=50 µg in 40 µl) eingestellt, aliquotiert und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

2.2.7 Beschreibung des Deiodase-1 Assays

Es sind drei verschiedene Deiodasen im menschlichen Körper beschrieben. Mit dem hier eingesetzten Assay kann parallel die Aktivität der Dio1 und Dio2 bestimmt werden. Durch Zugabe von PTU wird spezifisch die Dio1 gehemmt. Beim Vergleich der Proben mit und ohne PTU kann sowohl die Einzelaktivität der Dio1 als auch der Dio2 bestimmt werden. Die Aktivität der Dio2 entspricht dabei der nach Hemmung durch PTU verbleibenden Restaktivität.

Die Grundidee des Assays beruht auf der Fähigkeit der Deiodasen, vom T_4 ein Iodatom abzuspalten, um es so in die biologisch aktive Form T_3 umzuwandeln [87]. Die Deiodasen sind auch in der Lage, vom rT_3 ein Iodatom abzuspalten. Um diese Umwandlung detektierbar zu machen, wird radioaktiv markiertes rT_3 verwendet. Nach verschiedenen Aufreinigungs- und Auftrennungsschritten wird das abgespaltene radioaktive ^{125}I mittels eines Gamma-Zählers nachgewiesen. Anhand des gemessenen Zerfalls, der eingesetzten Proteinmenge und der Inkubationszeit lässt sich dann die Enzymaktivität rechnerisch bestimmen.

Abb. 2-2: Die Dio1 spaltet sowohl vom T_4 als auch vom rT_3 jeweils das Iodatom an der 5'-Position ab. Durch Verwendung eines radioaktiv markierten Iodthyronins lässt sich die Enzymaktivität bestimmen.



Die Messung der Proben erfolgte als Triplikat, d. h. für jede Bestimmung im Assay wurden gleichzeitig drei identische Proben gemessen und deren Messwerte für die Berechnung des Endwertes in diesem Versuch gemittelt. Der Assay wurde für jede gemessene Konzentration jeder Substanz mindestens dreimal wiederholt.

Da die Hep-G2 Zellen keine Dio2 exprimieren, konnte auf die Messung eines zusätzlichen Triplikates je Probe mit PTU verzichtet werden. In die Eppendorf Tubes wurden jeweils 40 μl Hep-G2 Extrakt, entsprechend ca. 50 μg Protein und 10 μl Stammlösung der zu untersuchenden Substanz in den entsprechenden Konzentrationen gegeben. Für die Kontrolle ohne Inhibitor wurde statt der Substanz 10 μl H_2O verwendet. Für die Positivkontrolle wurde 40 μl (entsprechend ca. 20 μg Protein) Mäuseleberextrakt verwendet. Zur Negativkontrolle wurde destilliertes H_2O verwendet, welches erst nach Stoppen der Reaktion mit 40 μl Proteinextrakt vermischt wurde.

1. Aufreinigung des Tracers:

Als Tracer wurde radioaktiv markiertes rT_3 verwendet:

L-3,3',5'-[^{125}I]-Triiodothyronin (^{125}IrT₃)	
Molekularmasse:	$M_r = 649$
Spezifische Aktivität:	800 μ Ci/ μ g [750-1250 μ Ci (27,8-46,3 MBq)/ μ l] (310 μ Ci/ml = 310 μ Ci/380 pmol; 100 μ l = 38 pmol)
Konzentration:	11,9 MBq/ml (321 μ Ci/ml)

Der Tracer wurde vor dem Versuch durch Adsorptionschromatographie über eine Sephadex-LH20-Säule aufgereinigt, um möglicherweise angefallene Abbauprodukte und spontan abgespaltenes Iodid zu entfernen. Dazu wurde eine Sarpette mit einem Filter (Porengröße 10 μ m) versehen und anschließend 600 μ l Sephadex (LH-20 in 0,1 N HCl) luftblasenfrei eingefüllt. Es folgte ein Spülvorgang mit 3,0 ml 0,1 N HCl bevor der Tracer direkt auf die Säule gegeben wurde. Die Menge des eingesetzten ^{125}I rT₃ richtete sich nach seiner Aktivität und lag bei frischer Aktivität bei 0,2 μ l / Probe. Im weiteren Verlauf wurde die Menge dahingehend angepasst, dass der Messwert für 100% bei 30.000 bis 80.000 cpm / 50 μ l lag. Es folgte je ein Spülvorgang mit 3,0 ml 0,1 N HCl und 3,0 ml H₂O. Der Durchfluss wurde in einem 15 ml Röhrchen aufgefangen und verworfen. Anschließend wurde ein Glasröhrchen unter die Sarpette mit dem gebundenen ^{125}I rT₃ gestellt und der Tracer mit 1,0 ml EtOH:NH₄OH (49:1) eluiert. Um den Eluierungsprozess zu unterstützen wurde das Glasröhrchen samt Sarpette bei 1000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert (Heraeus Sepatech Cryofuge 5000). Das Glasröhrchen samt Tracer wurde nun in ein ca. 60°C warmes Wasserbad gestellt und der Inhalt unter kontinuierlichem N₂-Strom eingedampft.

2. Substrat-Mix herstellen:

Der Substrat-Mix wurde für die Anzahl der zu messenden Proben für jeden Versuch frisch angesetzt. Die einzusetzende Menge an nicht-radioaktivem „kaltem“ rT_3 ist dabei abhängig vom Gewebe, welches untersucht wird. Für die Hep-G2-Zellen wurde 1,0 μ l 0,1 mM rT_3 verwendet. Für jede Probe wurden 50,0 μ l Substrat-Mix benötigt.

Tabelle 2-9: Auflistung der Inhaltsstoffe zur Herstellung des Substrat-Mixes.

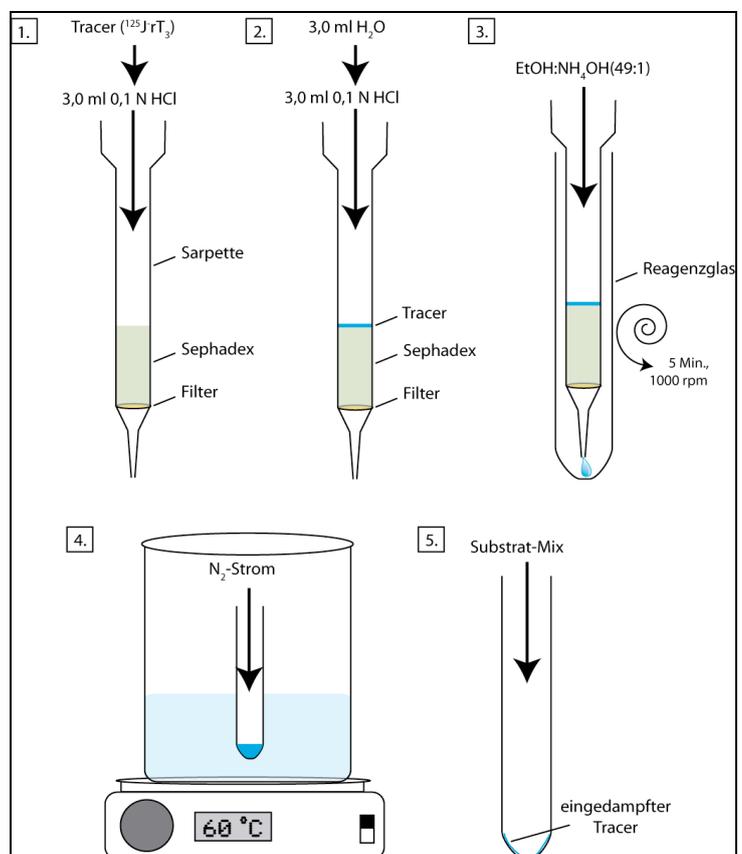
<u>Zusammensetzung Substrat-Mix (50,0 µl pro Probe):</u>	
x · 10,00 µl	1 M KPO ₄ – Puffer + 10 mM EDTA, pH 6,8
x · 2,00 µl	1 M DTT
x · 0,41 µl	40 mM NaOH
x · 1,00 µl	0,1 mM rT ₃
x · 36,59 µl	ddH ₂ O

Abb. 2-3: Vorbereiten des ¹²⁵I-rT₃-Tracers

1.-3. Aufreinigen des Tracers über eine Sephadex-LH-20-Säule.

4. Eindampfen des Tracers unter kontinuierlichem N₂-Strom im ca. 60 °C warmen Wasserbad.

5. Resuspension des eingedampften Tracers mit dem Substrat-Mix.



3. Messen des Tracers

Der eingedampfte Tracer wurde mit dem Substrat-Mix resuspendiert und sorgfältig gemischt. Es wurden dreimal 50,0 µl des Tracer-Substrat-Mixes entnommen und in jeweils 2,0 ml 10%iger Essigsäure gelöst und für 10 Min. im Gamma Counter gemessen, um den absoluten Zerfall des Tracers zu bestimmen (=100%-Wert). Dieser sollte im Toleranzbereich von 30.000 bis 80.000 cpm pro Reaktionsansatz (= 50 µl) liegen.

4. Starten der Reaktion

Es wurden jeweils 50 µl des Tracer-Substrat-Mixes nacheinander zu den Proben gegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 37°C im Wasserbad für 120 Min. inkubiert.

5. Stoppen der Reaktion

Die Proben wurden in der gleichen Reihenfolge nach 120 Min. aus dem Wasserbad genommen und die Aktivität der Deiodasen durch Zugabe von 50,0 µl 4°C kalter Stopp-Lösung (1 g BSA + 1 ml 0,1 M PTU + 9 ml H₂O) gestoppt. Die Proben wurden dann auf Eis gestellt und den Kontrollen 40 µl Proteinhomogenat hinzugefügt. Anschließend wurde zur Ausfällung der enthaltenen Proteine zu jeder Probe 400,0 µl eiskalte 10%ige Trichlor-essigsäure (TCA) gegeben. Die Proben wurden durch Vortexen gemischt und für 5 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert (Fa. Eppendorf Typ 5415C).

6. Auftrennung über Dowex-Säulen

Die Dowex-50 WX-2-Säulen wurden mit 2 x 2,0 ml 10%iger Essigsäure gespült und der Durchfluss verworfen. Es wurde darauf geachtet, dass die Säulen alle gleich hoch befüllt waren. Unter die Dowex-50 WX-2-Säulen wurden dann die Zählröhrchen gestellt. 480,0 µl des Überstandes der zentrifugierten Proben wurden auf die Dowex-Säulen gegeben und dann mit 2,0 ml 10%iger Essigsäure zur Abtrennung der freien ¹²⁵I⁻Ionen eluiert. Der Durchfluss wurde in den Zählröhrchen aufgefangen, gut gemischt und zur Messung der radioaktiven Aktivität im Gamma Counter für 600 sec. gemessen.

7. Berechnung der Enzymaktivität

Der gemessene radioaktive Zerfall ist ein Maß für die Aktivität der Deiodasen. Zur Berechnung der Enzymaktivität wird zunächst der „Background“, welcher dem radiolytischen Zerfall von ¹²⁵I-rT₃ entspricht, von der gemessenen Aktivität subtrahiert und zur Menge und Aktivität des eingesetzten kalten rT₃ (aus dem Substrat-Mix) bezogen auf Reaktionszeit und Proteinmenge ins Verhältnis gesetzt.

$$A_{\text{DIO}} = \frac{2 \cdot (\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Background}}) \cdot n_{\text{rT3 Substrat-Mix}} \cdot \frac{550}{480}}{\text{cpm}_{\text{rT3 Substrat-Mix}} \cdot m_{\text{Protein}} \cdot t}$$

$$[A_{\text{DIO}}] = \left[\frac{(\text{cpm} - \text{cpm}) \cdot \text{mol}}{\text{cpm} \cdot \text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \left[\frac{\text{mol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right]$$

$$\text{spez. Aktivität} \left[\frac{\text{fmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \frac{2 \cdot \text{nmol}_{\text{rT3}} \cdot 1000 \cdot 1000 \cdot (\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Background}})}{\text{cpm}_{100\% \text{-Wert}} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{min} \cdot \frac{480}{550}}$$

Erläuterung zur Berechnung:

Der phenolische Ring von rT₃ kann sich um die Diphenylether-O-C₁-Bindung frei drehen, daher können Dio1 und Dio2 sowohl das 5`- als auch das 3`-Iodatom abspalten. Da rT₃ nur in 5`-Position radioaktiv markiert ist, kommt statistisch auf ein ¹²⁵I ein nicht markiertes Iod-Atom. Dies ist in der Formel mit dem Faktor 2 berücksichtigt. In die Berechnung geht zudem nur die Menge an „kaltem“ (nicht radioaktiv markiertem) rT₃, die dem Substratmix zugegeben wurde, mit ein. Die Menge an radioaktivem rT₃ ist im Vergleich zum „kalten“ rT₃ verschwindend gering und kann vernachlässigt werden. Weiter wird der Faktor 480/550 einbezogen, weil vom Gesamtvolumen von 550 µl des Versuches nur 480 µl auf die Dowex 50-Säulen aufgetragen werden.

Die spezifische Aktivität der ungehemmten Ansätze entspricht der Aktivität der Dio1, da die Hep-G2-Zellen nur diese exprimieren. Wäre zusätzlich Dio2 enthalten, müsste die spezifische Aktivität der durch PTU gehemmten Ansätze (=Dio2-Aktivität) von Ersteren subtrahiert werden, um ein Maß für die Dio1-Aktivität zu bekommen.

Tabelle 2-10: Pipettierschemata für die Proben mit den Substanzen c1-c10, die Kontrollen mit H₂O sowie die Kontrollen mit den Protein-Standards aus Mäuse-Leber für den Deiodase-1 Assay.

Pipettierschema „Probe“ für den Deiodase-1 Assay			
Probe	Hep-G2 Extrakt (50 µg)	40,00 µl	50,00 µl
	Substanz c1 – c10 in unterschiedlichen Konzentrationen	10,00 µl	
Tracer-Substrat-Mix	1 M KPO ₄ -Puffer + 10 mM EDTA, pH 6,8	10,00 µl	50,00 µl
	1 M DTT	2,00 µl	
	40 mM NaOH	0,41 µl	
	0,1 mM rT ₃	1,00 µl	
	H ₂ O	36,59 µl	
	Bei frischer Aktivität 0,2 µl Tracer je Probe (¹²⁵ I-rT ₃) aufgereinigt und eingedampft (Trockensubstanz)		
Start der Reaktion: Inkubation für 120 Min bei 37°C			
Stopp der Reaktion: Zugabe von Stopp-Lösung und TCA			
Stopp-Lösung	BSA	5 mg	50 µl
	0,1 M PTU	5 µl	
	H ₂ O	45 µl	
TCA	4°C kalte 10%ige Trichloressigsäure	400 µl	400 µl
Gesamtvolumen			550 µl

Pipettierschema „H ₂ O-Kontrolle“ für den Deiodase-1 Assay			
Kontrolle	H ₂ O	10,00 µl	10,00 µl
Tracer-Substrat-Mix	1 M KPO ₄ -Puffer + 10 mM EDTA, pH 6,8	10,00 µl	50,00 µl
	1 M DTT	2,00 µl	
	40 mM NaOH	0,41 µl	
	0,1 mM rT ₃	1,00 µl	
	H ₂ O	36,59 µl	
	Bei frischer Aktivität 0,2 µl Tracer je Probe (¹²⁵ I-rT ₃) aufgereinigt und eingedampft (Trockensubstanz)		
Start der Reaktion: Inkubation für 120 Min bei 37°C			
Stopp der Reaktion: Zugabe von Stopp-Lösung und TCA			
Stopp-Lösung	BSA	5 mg	50 µl
	0,1 M PTU	5 µl	
	H ₂ O	45 µl	
Protein	Hep-G2 Extrakt	40 µl	40 µl
TCA	4°C kalte 10%ige Trichloressigsäure	400 µl	400 µl
Gesamtvolumen			550 µl

Pipettierschema „Protein-Standard“ für den Deiodase-1 Assay			
Standard	Maus-Leber Extrakt (20 µg) = Protein-Standard	40,00 µl	50,00 µl
	H ₂ O	10,00 µl	
Tracer-Substrat-Mix	1 M KPO ₄ -Puffer + 10 mM EDTA, pH 6,8	10,00 µl	50,00 µl
	1 M DTT	2,00 µl	
	40 mM NaOH	0,41 µl	
	0,1 mM rT ₃	1,00 µl	
	H ₂ O	36,59 µl	
	Bei frischer Aktivität 0,2 µl Tracer je Probe (¹²⁵ I-rT ₃) aufgereinigt und eingedampft (Trockensubstanz)		
Start der Reaktion: Inkubation für 120 Min bei 37°C			
Stopp der Reaktion: Zugabe von Stopp-Lösung und TCA			
Stopp-Lösung	BSA	5 mg	50 µl
	0,1 M PTU	5 µl	
	H ₂ O	45 µl	
TCA	4°C kalte 10%ige Trichloressigsäure	400 µl	400 µl
Gesamtvolumen			550 µl

2.2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde durch einen modifizierten Bradford-Proteinassay von Bio-Rad bestimmt [85]. Die Messung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand der Standardkurve aus einer IgG-Proteinstandardlösung (unterschiedliche Konzentrationen von ca. 1,3 bis 1,9 mg/ml) wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.9 Software

Zur Erstellung dieser Dissertation und Verarbeitung der ihr zugrunde liegenden Daten wurden folgende Programme benutzt:

- Microsoft Excel 2004 für Mac (Microsoft Corporation, USA)
- Microsoft Excel für Windows (Microsoft Corporation, USA)

-
- Microsoft Word 2004 für Mac (Microsoft Corporation, USA)
 - Microsoft FormelEditor 2004 für Mac (Microsoft Corporation, USA)
 - EndNote 9.0 (Thomson Reuters Corporation, USA)
 - Marvin Sketch a molecule (ChemAxon Ltd., Ungarn)
 - AppleSkript-Programm „TPO-Auswertung“ erstellt mit AppleSkript (Apple Inc., USA)
 - GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, California, USA)
 - Adobe Illustrator CS3 (Adobe Systems, Inc., USA) zur Erstellung der zahlreichen Grafiken und Schaubilder

2.2.10 Statistik

2.2.10.1 Zielgrößen (target variables)

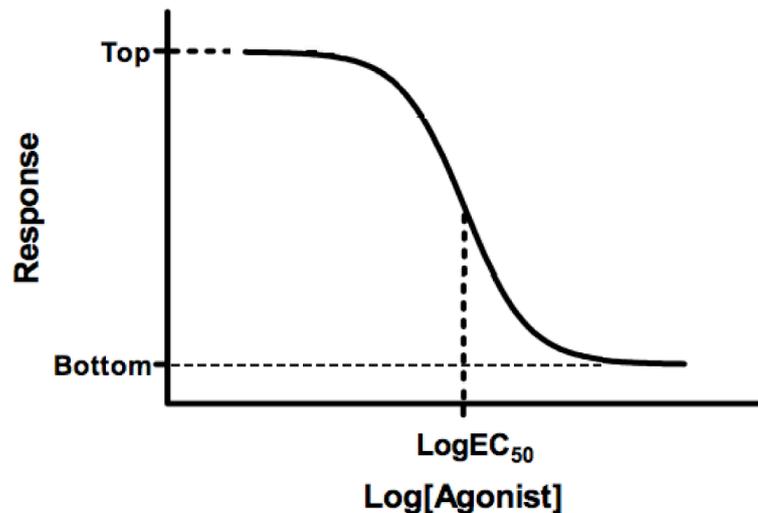
Zur Beurteilung der inhibitorischen Potenz der untersuchten Substanzen auf die Schilddrüsenhormone wurden die humane TPO und die Dio1 als Zielgrößen ausgesucht, da sie die beiden zentralen Enzyme des Schilddrüsenhormonstoffwechsels darstellen und als Angriffspunkte der klassischen Thyreostatika bekannt sind. Mit dem Guaiacol und dem Deiodase-1 Assay stehen außerdem zwei etablierte Verfahren zur Untersuchung der Aktivität dieser beiden Enzyme zur Verfügung. Die Funktionsweise der Thyreostatika und deren Wirkung auf die TPO und Dio1 ist im ersten Kapitel dieser Arbeit bereits ausführlich beschrieben worden.

2.2.10.2 Statistisches Modell

Die photometrisch bzw. durch radioaktiven Zerfall gemessenen Werte wurden zur Auswertung zunächst mit Microsoft Excel aufgezeichnet und zur weiteren Bearbeitung in GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, California, USA) überführt. Mit GraphPad Prism 4.0 wurden dann sigmoidale Dosis-Wirkungskurven durch nichtlineare Regression („curve fitting“) erstellt. Sie zeigen die Aktivität des jeweiligen Enzyms als Funktion des Logarithmus der Konzentrationen der untersuchten Substanzen. Hierfür wurde folgende Drei-Parameter-Gleichung verwendet:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{\text{LogEC50} - X}}$$

Abb. 2-4: Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve



Die Variable „Bottom“ steht bei dieser Gleichung für den Y-Wert auf Höhe des unteren Plateaus der Kurve, während die Variable „Top“ den Y-Wert des oberen Plateaus angibt. $\text{Log}(\text{EC}_{50})$ entspricht dem X-Wert bei genau halbmaximaler Wirkung, also genau auf halben Wege zwischen „Top“ und „Bottom“. „ $\text{Log}(\text{EC}_{50})$ “ ist der Logarithmus des EC_{50} , welcher in dieser Arbeit der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) entspricht. Allgemein wird als IC_{50} die Konzentration eines Inhibitors angegeben, bei der eine halbmaximale Hemmung zu beobachtet ist.

Bei der hier verwendeten Formel für logistische Regression entsprechen „Top“, „Bottom“ und „ $\text{Log}(\text{EC}_{50})$ “ den drei Parametern. Durch Variation der drei Parameter wird der Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungskurve den gemessenen Datenpunkten möglichst genau angepasst.

R^2 ist ein Maß für die Güte der Kurvenanpassung. Der Wert für R^2 kann zwischen 0 und 1,0 liegen und bleibt ohne Einheit. Je höher der Wert ist, desto besser entspricht die Kurve dem tatsächlichen Datenverlauf. Die Methodik der nichtlinearen Regressionsanalyse stellt für die hier ermittelten Datensätze ein hinreichend zutreffendes Modell dar, da bei den inhibitorisch wirksamen Substanzen für R^2 Werte zwischen 0,8 und 1,0 ermittelt wurden. Überwiegend wurden sogar Werte von 0,96 bis 1,0 erreicht.

In einzelnen Fällen wurden aus experimentellen Gründen nicht genügend Datenpunkte zur exakten Berechnung des „Bottom“-Plateaus der Dosis-Wirkungskurve bestimmt.

Dies betrifft vor allem diejenigen Substanzen, welche erst in hohen Konzentrationen eine Hemmung auf die untersuchten Enzyme zeigten. Eine Untersuchung von Substanzkonzentrationen über 10 mM fand aus Gründen der Löslichkeit, Toxizität und Auswirkungen auf den pH-Wert nicht statt. Auch Überlegungen, dass solch hohe Substanzkonzentrationen in vivo normalerweise nicht zu erreichen und wahrscheinlich mit einer hohen Toxizität verbunden wären, führten zur Begrenzung der Untersuchungen auf die angegebenen Konzentrationen. Die berechneten IC₅₀-Werte sind in diesen Fällen nur als Trendgröße zu verstehen.

2.2.10.3 Vergleich und statistische Tests

Die im Kapitel „Ergebnisse“ dargestellten Dosiswirkungskurven und die damit verbundenen Angaben zur inhibitorischen Potenz der untersuchten Substanzen wurden durch Paarvergleiche nach der Methode von Bonferroni überprüft und in ihrem Ergebnis bestätigt. Bei der Bonferroni-Korrektur wird die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen neutralisiert.

Allgemein wurde bei einem $p < 0,05$ von statistischer Signifikanz ausgegangen. Bei multiplen Vergleichen wurde eine entsprechende Alphafehler-Korrektur vorgenommen.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, neue selen- und schwefelhaltige Derivate der bekannten Thyreostatika zu untersuchen und hinsichtlich ihrer Wirkung auf humane TPO und auf humane Dio1 zu testen. Insgesamt wurden dafür zehn Thioharnstoff- bzw. Selenharnstoffderivate ausgewählt. Hintergrund für die Auswahl der hier eingesetzten Assays war die Wirkungsweise der klassischen Thyreostatika. MMI und PTU inhibieren die Schilddrüsenhormonsynthese durch Hemmung der TPO und PTU inhibiert zusätzlich den Schilddrüsenhormon-Metabolismus durch Effekte auf die Dio1. Es war zu erwarten, dass auch die Derivate dieser Substanzen am ehesten Effekte auf diese beiden Enzyme zeigen würden.

Der Guaiacol Assay ist ein klassisches Verfahren zur Untersuchung von Peroxidasen. Guaiacol dient den Peroxidasen als Ersatzsubstrat für natürliche Substrate und stellt über einen Farbumschlag einen Indikator dar. Es wurden bereits zahlreiche Ergebnisse mit diesem Verfahren für die Inhibition der TPO durch Thyreostatika sowie durch endokrine Disruptoren veröffentlicht [75, 84, 86].

Der Deiodase-1 Assay ist ein radioenzymatischer Assay, bei dem mit Hilfe von radioaktiv markiertem rT_3 die Aktivität der Dio1 ermittelt werden kann. Dies ist möglich, da die Dio1 von rT_3 ein Iodatom abspaltet, um $3,3'$ - T_2 zu bilden. Das abgespaltene 125 Iod kann nach relativ einfachen Aufreinigungs- und Auftrennungsschritten mittels Gammazähler detektiert und die Enzymaktivität rechnerisch bestimmt werden. Der Deiodase-1 Assay ist hoch sensitiv und spezifisch. Durch seinen funktionsbasierten Aufbau spiegeln die Ergebnisse weitestgehend die Deiodasefunktion in vivo wieder.

Alle beschriebenen Versuche wurden im Zeitraum von Mai 2006 bis Februar 2007 im Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité in Berlin durchgeführt.

3.1 *Guaiacol Assay*

Ziel dieses Experiments war es, bei den untersuchten zehn Substanzen, mögliche hemmende Effekte gegenüber der humanen TPO aufzudecken. Dafür wurden jeweils 100 μ g TPO-Extrakt (aus FTC-238/TPO Zellen) mit den Substanzen c1 bis c10 versetzt. Als Substrat für die TPO wurde Guaiacol eingesetzt, welches durch die TPO so

umgesetzt wurde, dass es zu einem Farbumschlag der Lösung kam. Dieser konnte durch Messung der photometrischen Absorption bei 470 nm mit einem Photometer bestimmt werden. Eine Hemmung der TPO bewirkte also eine Änderung in der Geschwindigkeit des Farbumschlages der Lösung und wurde somit berechenbar. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H_2O_2 gestartet und über einen Zeitraum von 120 sec. aufgezeichnet.

Jede Substanz wurde in 6 bis 9 verschiedenen Konzentrationen von 1 mM bis 1 nM überprüft. Dabei wurde jede Konzentration mindestens sechsmal im Assay untersucht und die gemessenen Werte anschließend gemittelt. Als Kontrolle fungierte im Assay ein ungehemmter TPO-Ansatz, bei dem anstelle der Substanzen einmal H_2O und zum anderen DMSO in gleicher Menge eingesetzt wurde. So wurden je sechs Kontrollen mit H_2O und je sechs Kontrollen mit DMSO vor Beginn, während des Verlaufs und am Ende des Versuchs gemessen. Die Kontrollmessungen mit DMSO erfolgten dabei, um zu zeigen, dass DMSO keinen Einfluss auf das Ergebnis des Assays hat. Dies war nötig, da die zu untersuchenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen DMSO enthielten.

Aus den gemessenen Absorptionswerten wurden die durchschnittlichen ΔOD zwischen 20 und 50 sec. berechnet. Anschließend wurden die durchschnittlichen ΔODs der einzelnen Proben mit den unterschiedlichen Substanzkonzentrationen von c1 bis c10 und die Duplikate mit den jeweiligen Tageskontrollen verglichen und in Teilen von Hundert dargestellt. Mit GraphPad Prism 4.0 wurden dann sigmoidale Dosis-Wirkungskurven erstellt und die IC_{50} -Werte für die einzelnen Substanzen berechnet.

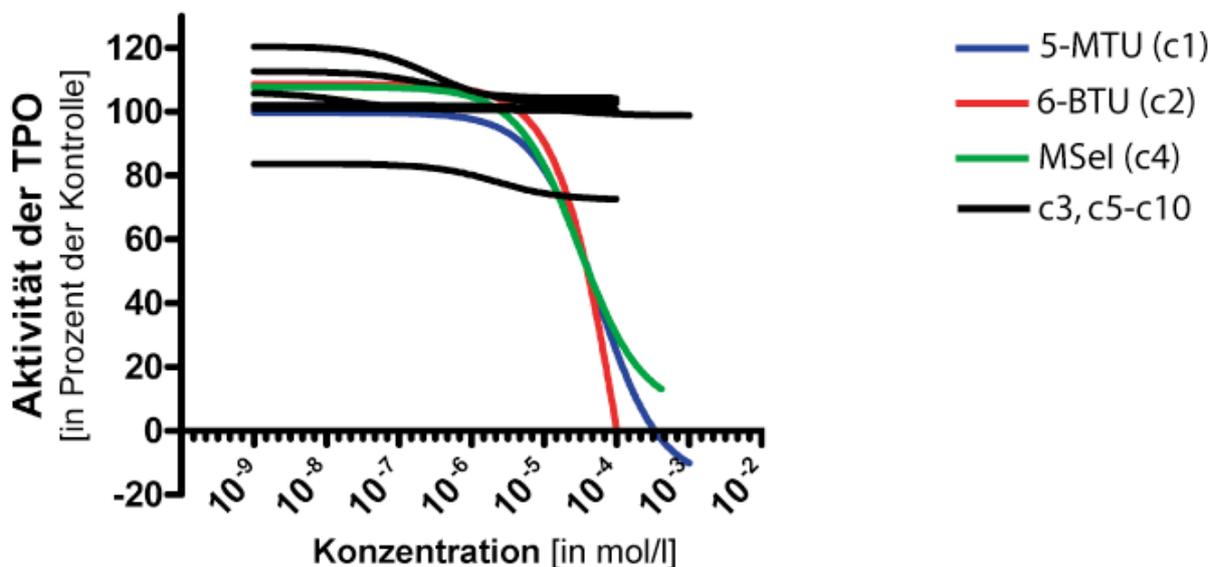
3.1.1 Übersicht über die Ergebnisse im Guaiacol-Assay

In Abbildung 3-1 ist die gemessene Aktivität der TPO unter zunehmender Konzentration der Substanzen c1 bis c10 dargestellt. In diesem Versuch wurden jeweils 100 μg TPO-Extrakt mit den jeweiligen Substanzen in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-3} mol/l versetzt. Unter Einwirkung von 5-MTU (c1), 6-BTU (c2) und MSeI (c4) fand sich oberhalb von 10^{-6} mol/l eine deutliche Hemmung der TPO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle und damit in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie bei den klassischen Substanzen PTU und MMI. Bei den Derivaten c3 und c5 - c10 konn-

te in den untersuchten Konzentrationen keine signifikante Hemmung der humanen TPO festgestellt werden.

Die Hemmung der TPO erfolgte durch MMI etwa 3,4-, 6- bzw. 13-mal potenter als durch die Substanzen MSeI (c4), 5-MTU (c1) und 6-BTU (c2). Allerdings hemmten die gleichen Substanzen die TPO effektiver als PTU. Die Substanz MSeI (c4) etwa 4-mal, 5-MTU (c1) etwa 2,3-mal und 6-BTU (c2) ungefähr genauso potent wie PTU.

Abb. 3-1: Übersicht über die Ergebnisse im Guaiacol-TPO Assay: Gemessen wurde hier die Aktivität der TPO unter Einfluss ansteigender Konzentrationen der Substanzen c1 bis c10 im Vergleich zur Kontrolle. Während bei den Substanzen c3 sowie c5-c10 keine signifikante Hemmung bei den untersuchten Konzentrationen festgestellt werden konnte, wurde bei c1, c2 und c4 eine signifikante Hemmung der TPO durch Substanzkonzentrationen oberhalb von $10^{-6}M$ festgestellt. Für c1 wurde ein IC_{50} -Wert von $55 \mu M$, für c2 von $121 \mu M$ und für c4 von $31 \mu M$ festgestellt. Der IC_{50} -Wert gibt hierbei die Konzentration an, welche eine 50%ige Hemmung der TPO in vitro bewirkt.



In Tabelle 3-1 sind die gemessenen IC50-Werte der Substanzen 5-MTU (c1), 6-BTU (c2) und MSeI sowie im Vergleich dazu von PTU und MMI dargestellt. Die IC50-Werte wurden anhand der Ergebnisse im Guaiacol-Assay berechnet.

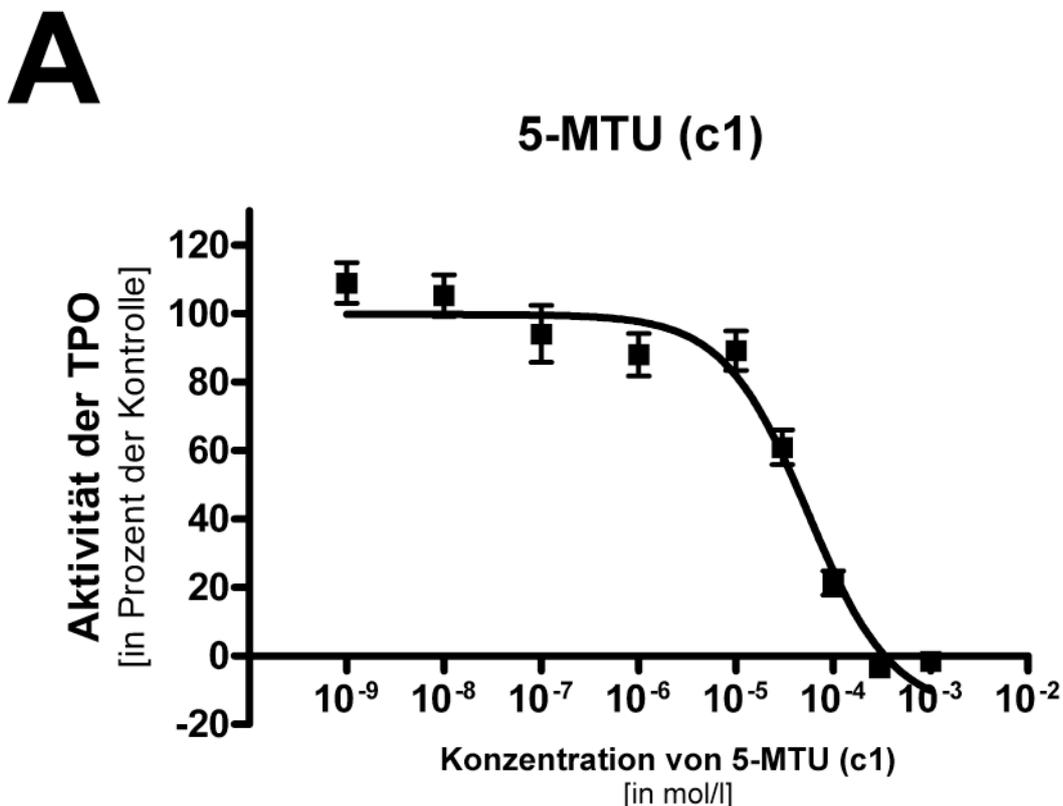
Tabelle 3-1: Übersicht über die im Guaiacol-TPO-Assay bestimmten IC50-Werte der wirksamen Substanzen c1, c2 und c4 sowie PTU und MMI.

Thyreperoxidase (TPO)		
Substanz	IC50-Wert	
5-MTU (c1)	$5,49 \times 10^{-5} \text{ M}$	$54,9 \mu\text{M}$
6-BTU (c2)	$1,213 \times 10^{-4} \text{ M}$	$121,3 \mu\text{M}$
MSeI (c4)	$3,12 \times 10^{-5} \text{ M}$	$31,2 \mu\text{M}$
PTU	$1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$	$125 \mu\text{M}$
MMI	$9,20 \times 10^{-6} \text{ M}$	$9,2 \mu\text{M}$

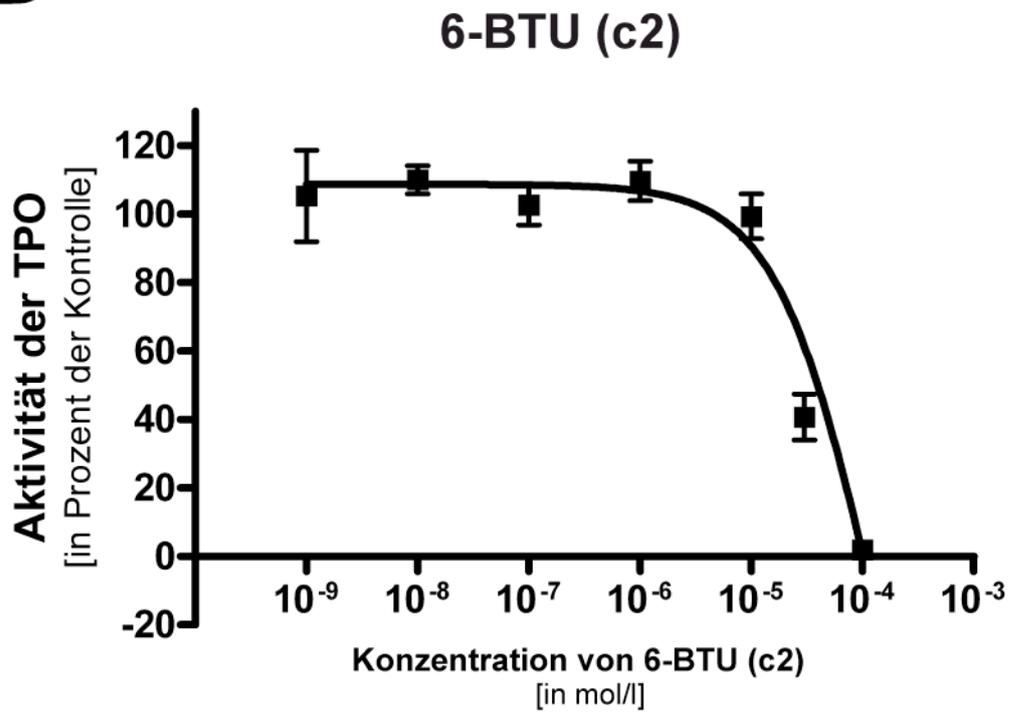
3.1.2 Einzeldarstellungen der Ergebnisse im Guaiacol-Assay

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Guaiacol-Assays nach Erstellung von sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven und Berechnung der IC50-Werte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 als Einzeldarstellung für jede untersuchte Substanz abgebildet.

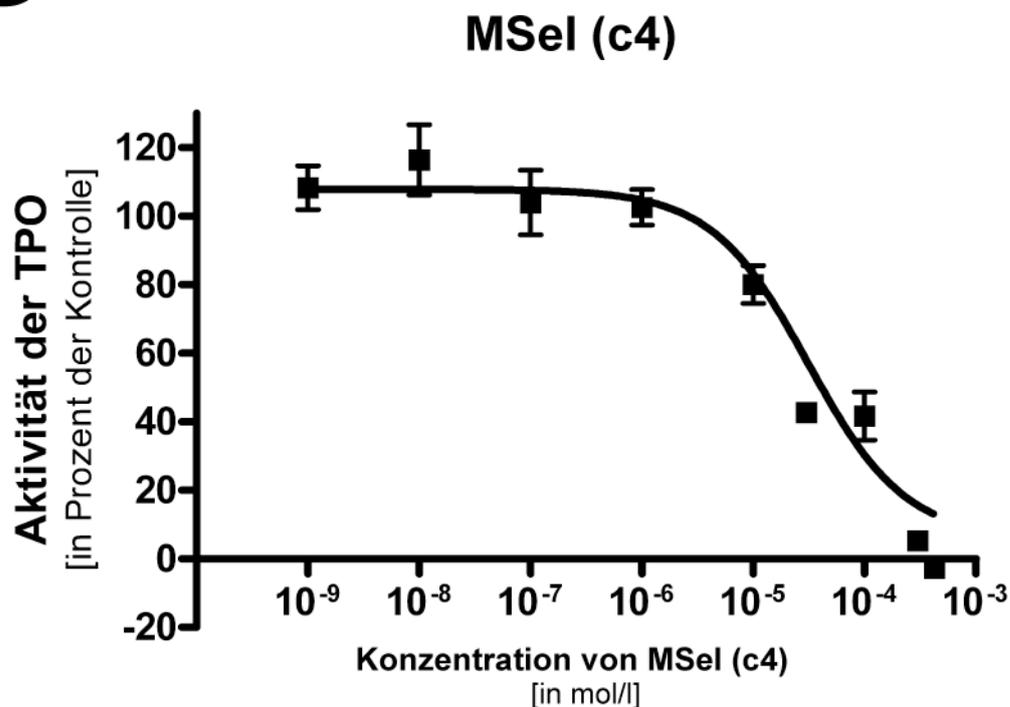
Abb. 3-2: Einzeldarstellung der Ergebnisse des Guaiacol-TPO Assays mit den Substanzen c1 bis c10.



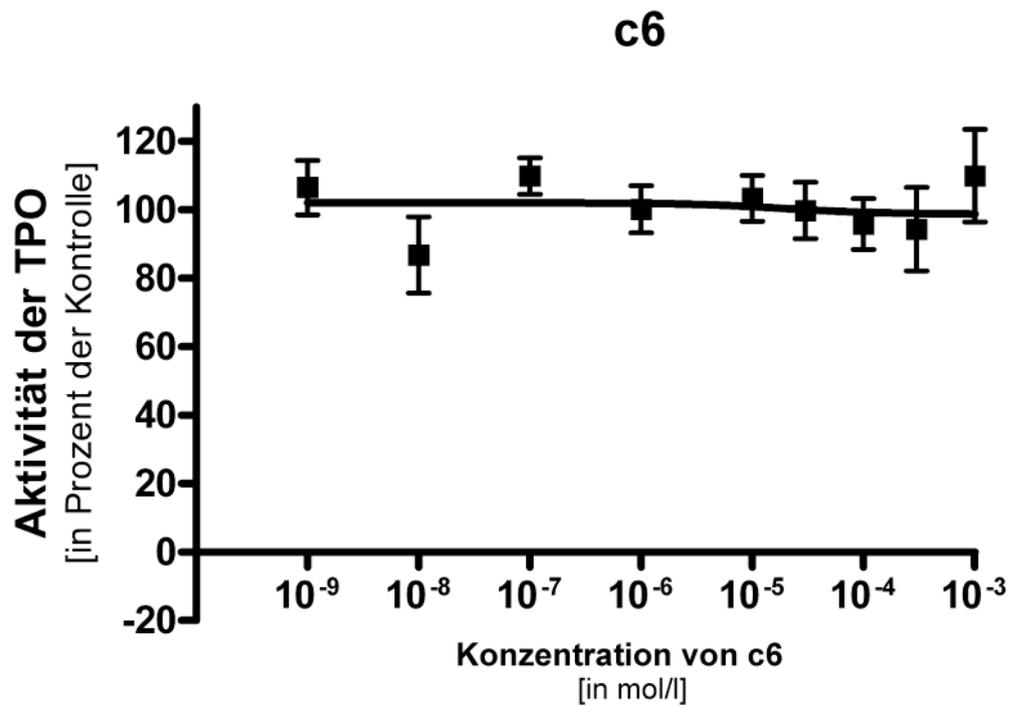
A: Die Substanz 5-MTU (c1) wurde in den Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-3} M gemessen. Dabei konnte eine deutliche Hemmung der TPO-Aktivität bei Konzentrationen über 10^{-5} M gemessen werden. Rechnerisch ergab sich ein IC50-Wert für 5-MTU (c1) von 54,9 μ M.

B

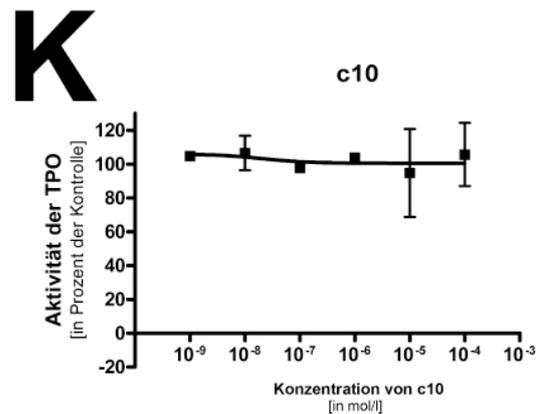
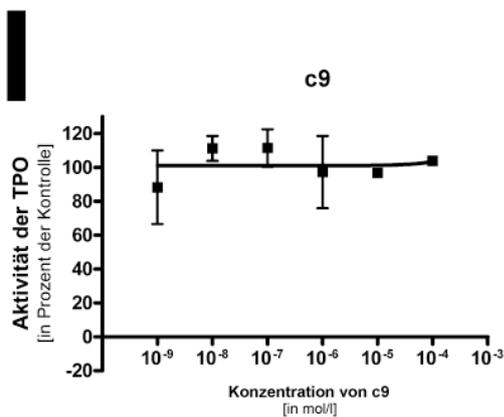
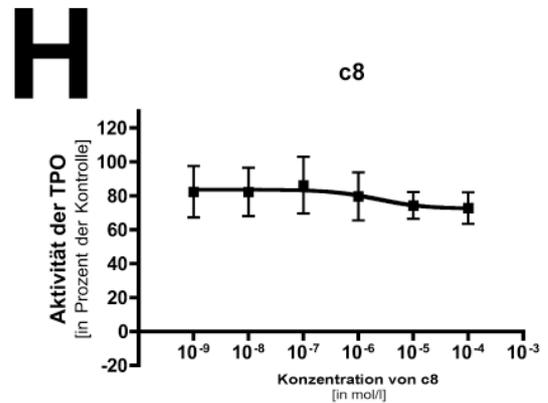
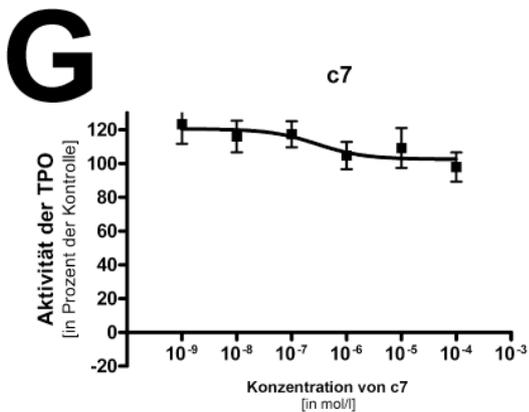
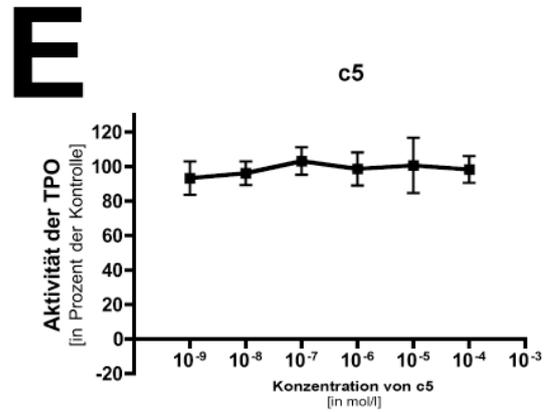
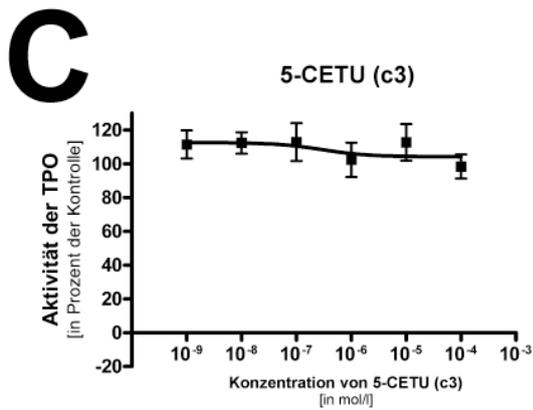
B: Die Substanz 6-BTU (c2) wurde in den Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-4} M gemessen. Eine deutliche Hemmung der TPO-Aktivität fand sich bei Konzentrationen über 10^{-5} M. Der IC₅₀-Wert für 6-BTU (c2) liegt bei 121,3 μ M.

D

D: Die Substanz MSeI (c4) wurde in den Konzentrationen von 10⁻⁹ bis 2,5 x 10⁻⁴ M gemessen. Eine deutliche Hemmung der TPO-Aktivität konnte bei Konzentrationen über 10⁻⁶ M nachgewiesen werden. Aus den vorliegenden Daten ergab sich ein IC₅₀-Wert von 31,2 μM für die Substanz MSeI (c4).

F

F: Die Substanz c6 wurde in den Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-3} M gemessen. Eine signifikante Hemmung der TPO-Aktivität konnte nicht festgestellt werden.



C + E + G-K: Die Substanzen 5-CETU (c3), c5 und c7-c10 wurden in den Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-4} M gemessen. Die Hemmung der TPO-Aktivität durch diese Substanzen war nicht signifikant.

3.1.3 Ergebnisse der statistischen Analyse des Guaiacol Assays

Die Tabelle 3-2 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Berechnungen zur nichtlinearen Regression der im Guaiacol Assay gemessenen Datenpunkte unter Verwendung der im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebenen Drei-Parametergleichung. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurven.

Tabelle 3-2: Ergebnisse der nichtlinearen Regression ausgehend von den Daten des Guaiacol Assays.

	5-MTU (c1)	6-BTU (c2)	5-CETU (c3)	MSeI (c4)	c5
Sigmoidal dose-response					Not converged
Best-fit values					
Bottom	-16,08	-129,6	104,2	6,115	
Top	99,78	108,7	112,7	107,9	
LogEC50	-4,261	-3,917	-6,531	-4,507	
EC50	5,49E-05	1,21E-04	2,94E-07	3,11E-05	
Std. Error					
Bottom	9,901	113	6,423	10,61	
Top	3,192	3,563	6,543	3,803	
LogEC50	0,131	0,3625	2,349	0,1763	
95% Confidence Intervals					
Bottom	-36,20 to 4,030	-357,9 to 98,71	90,86 to 117,6	-15,27 to 27,50	
Top	93,30 to 106,3	101,5 to 115,9	99,05 to 126,3	100,2 to 115,5	
LogEC50	-4,527 to -3,994	-4,649 to -3,185	-11,42 to -1,645	-4,862 to -4,151	
EC50	2,973E-05 to 1,013E-04	2,244E-05 to 6,538E-04	3,833E-12 to 0,02263	1,374E-05 to 7,055E-05	
Goodness of Fit					
Degrees of Freedom	35	41	21	45	
R ²	0,8771	0,8045	0,04429	0,7822	
Absolute Sum of Squares	7314	14161	6564	15820	
Sy.x	14,46	18,58	17,68	18,75	
Number of points Analyzed	38	44	24	48	24
	c6	c7	c8	c9	c10
Sigmoidal dose-response	Not converged			Not converged	
Best-fit values					
Bottom		102,6	72,43		106,1
Top		120,6	83,71		100,6
LogEC50		-6,542	-5,654		-7,702
EC50		2,87E-07	2,22E-06		1,99E-08
Std. Error					
Bottom		6,784	11,92		13,86
Top		6,959	7,543		6,682
LogEC50		1,17	2,506		5,186
95% Confidence Intervals					
Bottom		88,81 to 116,4	47,64 to 97,21		74,75 to 137,4
Top		106,4 to 134,7	68,02 to 99,40		85,48 to 115,7
LogEC50		-8,925 to -4,160	-10,87 to -0,4429		-19,43 to 4,029
EC50		1,189E-09 to 6,914E-05	1,362E-11 to 0,3606		3,684E-20 to 10702
Goodness of Fit					
Degrees of Freedom		33	21		9
R ²		0,1061	0,03645		0,02005
Absolute Sum of Squares		17381	12804		2464
Sy.x		22,95	24,69		16,55
Number of points Analyzed	38	36	24	12	12

3.2 *Deiodase-1 Assay*

Der Deiodase-1 Assay wurde verwendet, um eine hemmende Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Dio1 nachzuweisen. Es wurde 50 µg Hep-G2-Extrakt als Deiodase-Quelle verwendet. Gemessen wurde die Dio1-Aktivität unter Einfluss ansteigender Konzentrationen der Substanzen c1 bis c10.

Alle Substanzen zeigten eine hemmende Wirkung auf die Dio1 in Konzentrationen über 10^{-3} mol/l. Unter Einwirkung der Substanzen 5-MTU (c1), 6-BTU (c2) und 5-CETU (c3) ist diese Hemmung auch schon in wesentlich geringeren Konzentrationen zu beobachten. Die Substanzen 5-MTU (c1) und 6-BTU (c2) hemmen bei gleicher Konzentration die Dio1 potenter und 5-CETU (c3) gleich gut wie PTU.

Der ermittelte IC50-Wert für 5-MTU (c1) liegt bei $7,03 \times 10^{-7}$ mol/l, für 6-BTU (c2) bei $1,24 \times 10^{-7}$ mol/l, für 5-CETU (c3) bei $1,74 \times 10^{-6}$ mol/l und für PTU bei $1,72 \times 10^{-6}$ mol/l.

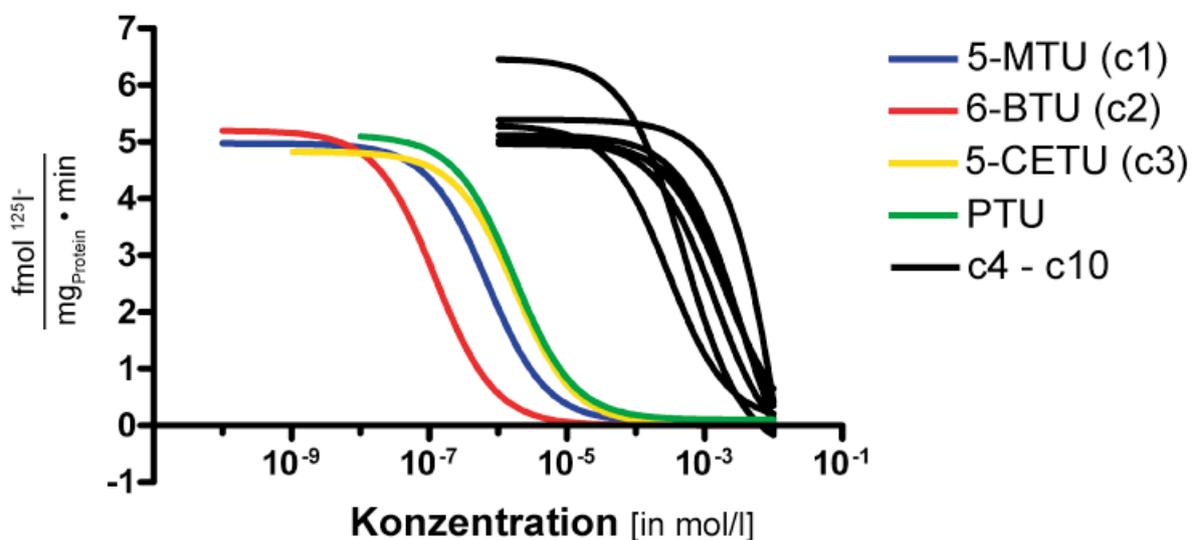
Von den weniger potenten Substanzen hat MSeI (c4) (IC50: 414,3 µM) den niedrigsten und c10 (IC50: 21,3 mM) den höchsten IC50-Wert.

3.2.1 Übersicht über die Ergebnisse im Deiodase-1 Assay

In Abbildung 3-3 ist die gemessene Aktivität der Dio1 unter zunehmender Konzentration der Substanzen c1 bis c10 dargestellt. In diesem Versuch wurden jeweils wie unter 3.2 beschrieben 50 µg Hep-G2-Extrakt mit den jeweiligen Substanzen in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-2} mol/l untersucht.

Abb. 3-3: Übersicht über die Ergebnisse im Deiodase-1 Assay: Gemessen wurde hier die Aktivität der Typ I 5'-Deiodase in 50 µg Hep-G2-Extrakt unter Einfluss ansteigender Konzentrationen der Substanzen c1 bis c10.

Wirkung von c1-c10 + PTU auf die Dio1-Aktivität in 50µg Hep-G2-Extrakt



In Tabelle 3-3 sind die gemessenen IC50-Werte aller gemessenen Substanzen sowie im Vergleich dazu von PTU dargestellt. Die IC50-Werte wurden anhand der Ergebnisse im Deiodase-1 Assay berechnet.

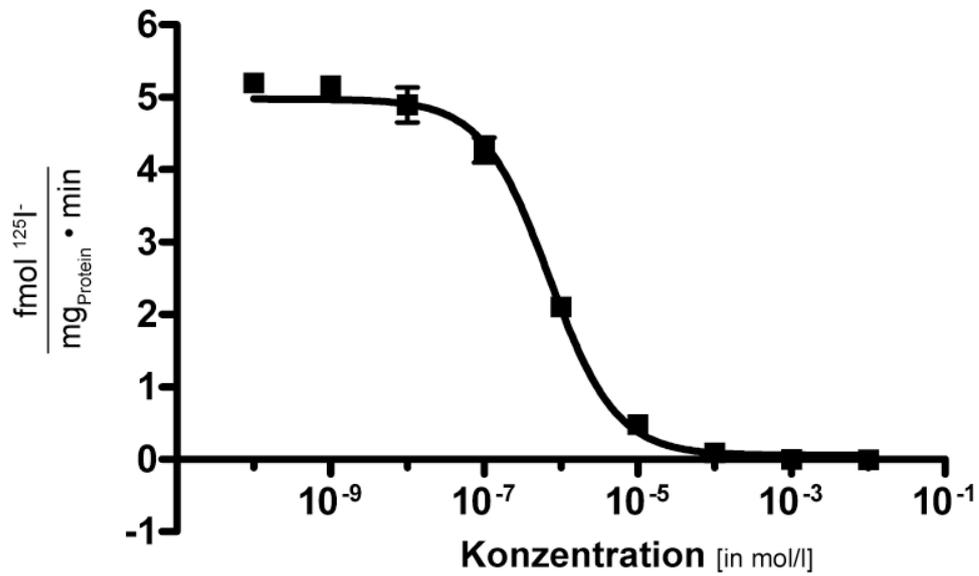
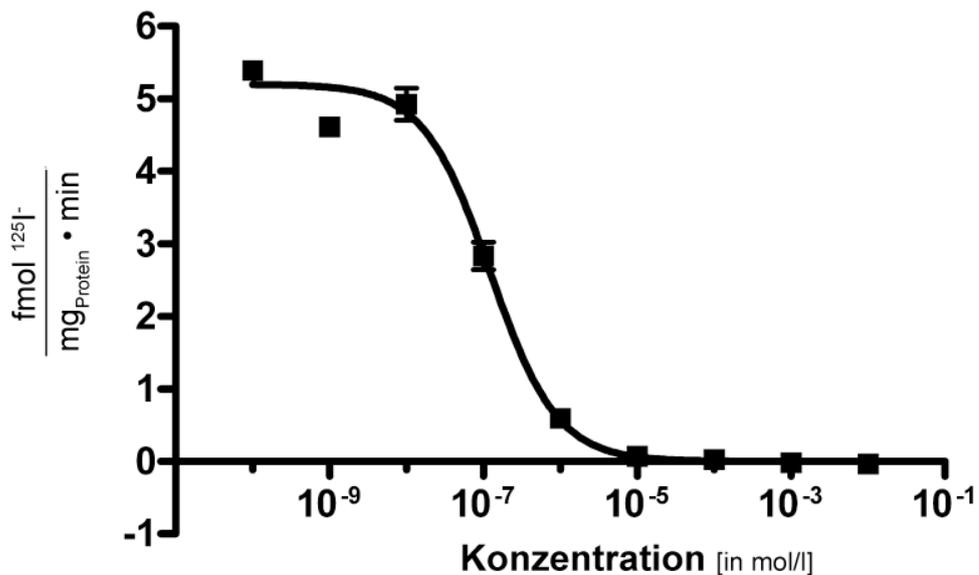
Tabelle 3-2: Übersicht über die im Deiodase-1 Assay bestimmten IC50-Werte der Substanzen c1 bis c10 sowie PTU.

Typ I 5'-Deiodase (Dio1)		
Substanz	IC50-Wert	
5-MTU (c1)	7,0 x 10 ⁻⁷ M	704 nM
6-BTU (c2)	1,2 x 10 ⁻⁷ M	124 nM
5-CETU (c3)	1,7 x 10 ⁻⁶ M	1,74 µM
MSeI (c4)	4,1 x 10 ⁻⁴ M	413 µM
c5	2,0 x 10 ⁻³ M	2,00 mM
c6	3,4 x 10 ⁻³ M	3,39 mM
c7	2,9 x 10 ⁻³ M	2,94 mM
c8	5,2 x 10 ⁻⁴ M	518 µM
c9	1,4 x 10 ⁻³ M	1,41 mM
c10	2,1 x 10 ⁻² M	21,3 mM
PTU	1,7 x 10 ⁻⁶ M	1,72 µM

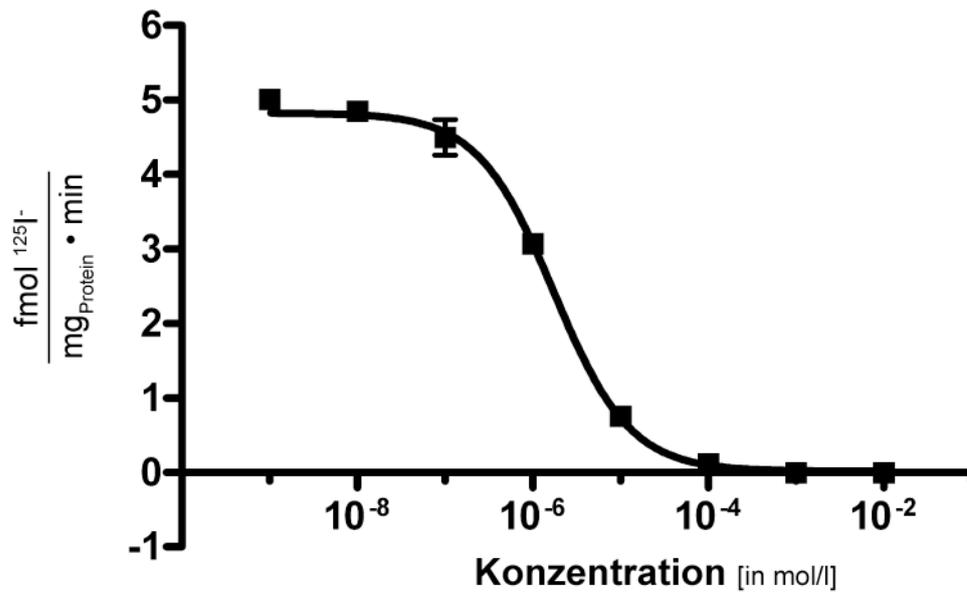
3.2.2 Einzeldarstellungen der Ergebnisse im Deiodase-1 Assay

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Deiodase-1 Assays nach Erstellung von sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven und Berechnung der IC50-Werte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 als Einzeldarstellung für jede untersuchte Substanz abgebildet.

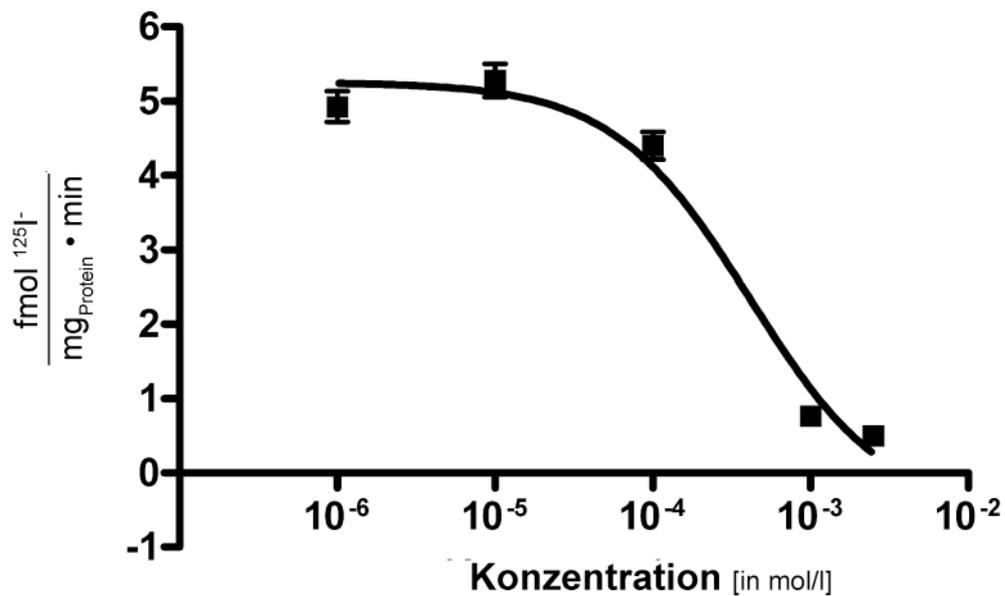
Abb.: 3-4: Einzeldarstellung der Ergebnisse des Deiodase-1 Assays mit den Substanzen c1 bis c10. Gemessen wurde die Aktivität der Dio1 in 50 µg Hep-G2-Extrakt unter ansteigenden Substanzkonzentrationen.

A**Wirkung von 5-MTU (c1) auf die Dio1-Aktivität****B****Wirkung von 6-BTU (c2) auf die Dio1-Aktivität**

A-B: Die Substanzen 5-MTU (c1) und 6-BTU (c2) wurden in Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-2} M gemessen. Eine deutliche Hemmung der Dio1 fand sich bei Konzentrationen über 10^{-8} M. Der IC₅₀-Wert für 5-MTU (c1) wurde mit $7,0 \times 10^{-7}$ M und für 6-BTU (c2) mit $1,2 \times 10^{-7}$ M berechnet.

C**Wirkung von 5-CETU (c3) auf die Dio1-Aktivität**

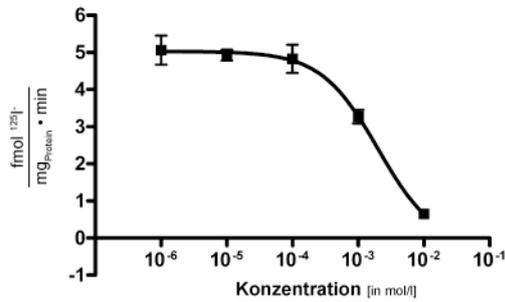
C: Die Substanz 5-CETU (c3) wurde in Konzentrationen von 10⁻⁹ bis 10⁻² M gemessen. Eine deutliche Hemmung der Dio1 fand sich bei Konzentrationen über 10⁻⁸ M. Der ermittelte IC50-Wert für 5-CETU (c3) liegt bei 1,7 x 10⁻⁶ M.

D**Wirkung von MSeI (c4) auf die Dio1-Aktivität**

D: Die Substanz MSeI (c4) wurde in Konzentrationen von $1,0 \times 10^{-6}$ bis $2,5 \times 10^{-3}$ M gemessen. Eine deutliche Hemmung der Dio1 fand sich bei Konzentrationen über 10^{-5} M. Der IC₅₀-Wert für MSeI (c4) liegt bei $4,1 \times 10^{-4}$ M.

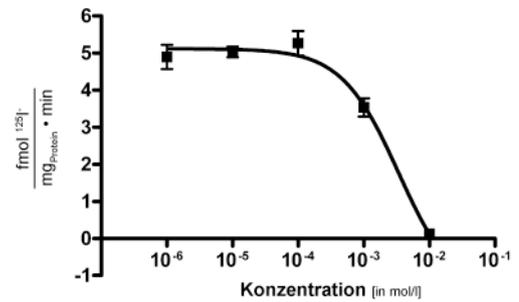
E

Wirkung von c5 auf die Dio1-Aktivität



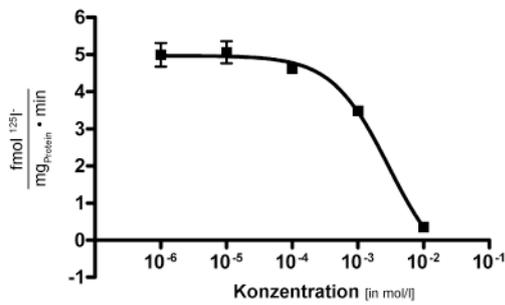
F

Wirkung von c6 auf die Dio1-Aktivität



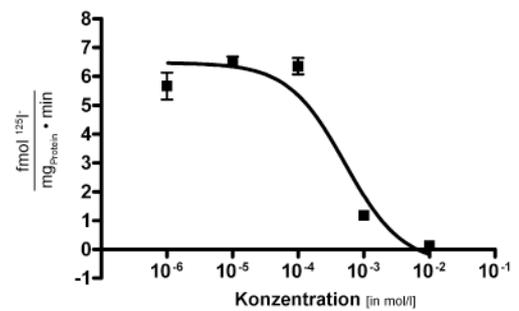
G

Wirkung von c7 auf die Dio1-Aktivität



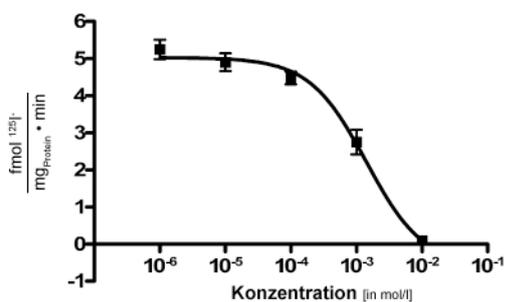
H

Wirkung von c8 auf die Dio1-Aktivität



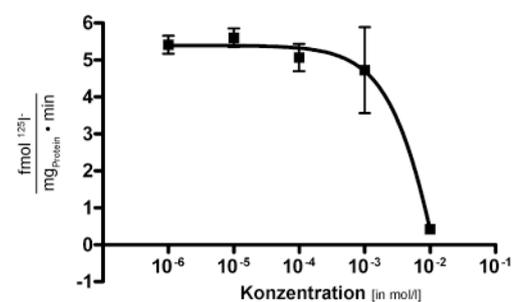
I

Wirkung von c9 auf die Dio1-Aktivität



K

Wirkung von c10 auf die Dio1-Aktivität



E-K: Die Substanzen c5 - c10 wurden in Konzentrationen von 10⁻⁶ bis 10⁻² M gemessen. Eine signifikante Hemmung der Dio1 fand sich bei Konzentrationen über 10⁻⁴ M. Die rechnerisch ermittelten IC50-Werte sind der Tabelle 3-2 zu entnehmen.

3.2.3 Ergebnisse der statistischen Analyse des Deiodase-1 Assays

Die Tabelle 3-4 zeigt die Ergebnisse der statistischen Berechnungen zur nichtlinearen Regression der im Deiodase-1 Assay gemessenen Datenpunkte unter Verwendung der im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebenen Drei-Parametergleichung. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die Erstellung der entsprechenden Dosis-Wirkungskurven.

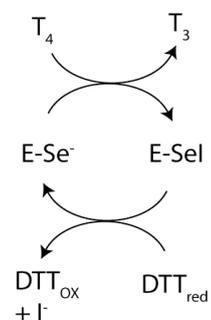
Tabelle 3-4: Ergebnisse der nichtlinearen Regression ausgehend von den Daten des Deiodase-1 Assays.

	c1	c2	c3	c4	c5	c6
Sigmoidal dose-response						
Best-fit values						
Bottom	0,05354	-8,19E-04	0,01547	-0,5608	-0,2296	-1,566
Top	4,974	5,200	4,825	5,253	5,026	5,118
LogEC50	-6,153	-6,908	-5,759	-3,386	-2,699	-2,471
EC50	7,035E-07	1,24E-07	1,74E-06	4,11E-04	2,00E-03	3,38E-03
Std. Error						
Bottom	0,06884	0,06142	0,06428	0,4426	0,4653	0,7688
Top	0,09386	0,1169	0,09756	0,1734	0,152	0,1558
LogEC50	0,0501	0,04875	0,04816	0,1429	0,1409	0,1609
95% Confidence Intervals						
Bottom	-0,08674 to 0,1938	-0,1274 to 0,1257	-0,1182 to 0,1492	-1,525 to 0,4038	-1,244 to 0,7844	-3,241 to 0,1092
Top	4,783 to 5,166	4,959 to 5,440	4,622 to 5,028	4,875 to 5,631	4,694 to 5,357	4,779 to 5,458
LogEC50	-6,255 to -6,051	-7,009 to -6,808	-5,859 to -5,659	-3,697 to -3,074	-3,006 to -2,392	-2,822 to -2,120
EC50	5,561E-07 to 8,899E-07	9,800E-08 to 1,556E-07	1,383E-06 to 2,193E-06	2,009E-04 to 8,428E-04	9,871E-04 to 4,060E-03	1,508E-03 to 7,578E-03
Goodness of Fit						
Degrees of Freedom	32	25	21	12	12	12
R ²	0,9843	0,9873	0,9899	0,9702	0,9519	0,9595
Absolute Sum of Squares	2,382	1,442	0,9246	1,989	2,134	2,31
Sy.x	0,2728	0,2402	0,2098	0,4071	0,4217	0,4388
Number of points Analyzed	35	28	24	15	15	15
	c7	c8	c9	c10	PTU	
Sigmoidal dose-response						
Best-fit values						
Bottom	-1,006	-0,5052	-0,5921	-10,16	0,1019	
Top	4,970	6,473	5,025	5,393	5,124	
LogEC50	-2,531	-3,289	-2,850	-1,672	-5,761	
EC50	2,94E-03	5,14E-04	1,41E-03	0,02127	1,73E-06	
Std. Error						
Bottom	0,5094	0,7248	0,3624	34,74	0,06405	
Top	0,1200	0,4204	0,1447	0,3238	0,0895	
LogEC50	0,1245	0,2193	0,1084	1,421	0,04719	
95% Confidence Intervals						
Bottom	-2,116 to 0,1044	-2,219 to 1,209	-1,382 to 0,1975	-95,17 to 74,86	-0,07594 to 0,2796	
Top	4,709 to 5,231	5,479 to 7,467	4,710 to 5,340	4,601 to 6,186	4,875 to 5,372	
LogEC50	-2,802 to -2,260	-3,808 to -2,770	-3,086 to -2,614	-5,149 to 1,804	-5,892 to -5,630	
EC50	1,576E-03 to 5,496E-03	1,557E-04 to 1,697E-03	8,199E-04 to 2,434E-03	7,104E-06 to 63,67	1,283E-06 to 2,345E-06	
Goodness of Fit						
Degrees of Freedom	12	7	12	6	4	
R ²	0,9717	0,9319	0,9665	0,8589	0,9983	
Absolute Sum of Squares	1,36	5,145	1,877	3,446	0,05203	
Sy.x	0,3367	0,8574	0,3955	0,7578	0,114	
Number of points Analyzed	15	10	15	9	7	

3.2.4 Auswirkungen der Dithiothreitol-Konzentration auf den Deiodase-1 Assay

Dithiothreitol (DTT) wurde dem Deiodase-1 Assay zugesetzt, um eine Oxidation des Selenozysteins im aktiven Zentrum der Dio1 zu verhindern. Jene Struktur ist unter aeroben Bedingungen besonders empfindlich gegenüber einer Reaktion mit Sauerstoff. DTT kann als Reduktionsmittel aggressive Sauerstoffverbindungen effektiv abfangen und schützt somit die Dio1. Außerdem wird durch DTT das Selenyliodid-Zwischenprodukt (E-Sel) wieder zu $E-Se^-$ reduziert und dadurch die Funktionsfähigkeit der Dio1 aufrechterhalten (siehe auch Abschnitt 1.1.4 und Abb. 1-7). Es konnte bisher noch nicht endgültig gezeigt werden, welcher Cofaktor im Körper für die Regeneration der Dio1 verantwortlich ist. Vermutet wird, dass Glutathion oder ein vergleichbares Redoxsystem diese Aufgabe übernimmt. Glutathion selbst wird dabei oxidiert und geht von seiner monomeren Form GSH in das Dimer GSSG über. Durch das Enzym Glutathion-Reduktase können aus einem GSSG-Dimer unter Verbrauch von NADPH wieder zwei reduzierte GSH hergestellt werden. Im Deiodase-1 Assay übernimmt DTT die Funktion des Glutathions. Da aber in vitro die Fähigkeit der Regeneration fehlt, wird ein Überschuss an DTT verwandt, um eine einwandfreie Funktion der Dio1 sicherzustellen. Konzentrationsabhängig kann es durch DTT selbst jedoch auch zu einer Hemmung der Enzymfunktion der Dio1 kommen und damit eine Inhibition im Deiodase-1 Assay vorgetäuscht werden. Um diesen Effekt zu zeigen und eine deutliche Beeinflussung der Ergebnisse durch selbigen auszuschließen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

Abb. 3-5: Funktion des DTT im Deiodase-1 Assay: Die Reduktion des Selenyliodid-Zwischenprodukts (E-Sel) der Dio1 zum $E-Se^-$ findet durch Oxidation von DTT unter Abspaltung von Iodid statt.



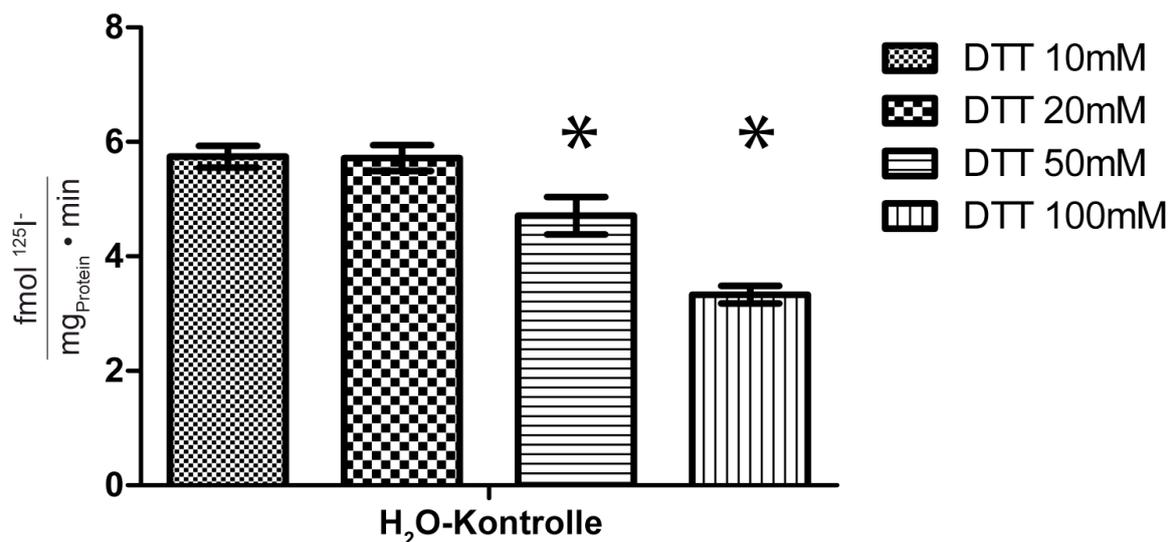
Der Deiodase-1 Assay ergab für alle zehn der untersuchten Substanzen einen inhibitorischen Effekt auf die Dio1. Bei vier der Substanzen gelang dies schon in niedrigen Konzentrationen, aber auch die verbleibenden sechs Verbindungen zeigten eine Inhibition der Dio1 in hohen Konzentrationen. Eine mögliche Erklärung dafür

hibition der Dio1 in hohen Konzentrationen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass bei hohen Substanzkonzentrationen die DTT-Konzentration relativ erniedrigt ist und eine reaktionsbedingte Inaktivierung der Dio1 stattfindet. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden exemplarisch die potenteste (c4) und die schwächste Substanz (c9) der weniger potenten Verbindungen ausgewählt und die Messung im Deiodase-1 Assay unter Verwendung verschiedener DTT-Konzentration wiederholt. Eine Erhöhung der DTT-Konzentration sollte dann zur Veränderung der IC50-Werte führen.

3.2.4.1 Variation der DTT-Konzentration im nativen Deiodase-1 Assay

Bei dieser Versuchsreihe wurde den Proben im Deiodase-1 Assay kein Inhibitor zugesetzt, sondern es wurde analog 10 μ l H₂O verwendet. Der übrige Ablauf der Versuche erfolgte wie unter Material und Methoden zum Deiodase-1 Assay beschrieben. Die DTT-Konzentration wurde im Substratmix auf 20, 40, 100 und 200 mM eingestellt. Daraus ergab sich eine Gesamtkonzentration im Deiodase-1 Assay für DTT von 10, 20, 50 und 100 mM, da zu 50 μ l des Substratmixes jeweils 40 μ l Hep-G2-Extrakt und 10 μ l H₂O gegeben wurden und sich somit eine 1:1 Verdünnung ergab.

Abb. 3-6: Variation der DTT-Konzentration im nativen Deiodase-1 Assay: Die jeweilige DTT-Endkonzentration betrug dabei 10, 20, 50 und 100 mM.



Wie erwartet zeigte DTT eine inhibitorische Wirkung auf den Deiodase-1 Assay. Allerdings ergab sich eine signifikante Hemmung erst oberhalb von 50 mM und damit bei mehr als der doppelten Konzentration von der in den Hauptversuchen eingesetzt-

ten Menge DTT. Auf der anderen Seite erbrachte die Halbierung der eingesetzten DTT-Konzentration auch keine weitere Steigerung der Dio1-Aktivität im Deiodase-1 Assay. Somit zeigte sich, dass durch die in den Versuchen eingesetzte DTT-Konzentration keine signifikante Beeinflussung der Ergebnisse zu erwarten war. Der K_M -Wert der Dio1 liegt in menschlichen Leberzellen bei 2,0 mM, damit lagen alle untersuchten Konzentrationen im gesättigten Bereich.

3.2.4.2 Variation der DTT-Konzentration unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c4.

Bei dieser Versuchsreihe wurde den Proben im Deiodase-1 Assay die Substanz c4 in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt. Diese wurden so gewählt, dass eine maximale Inhibition durch diese Substanz erreicht wurde. Anschließend wurden diese Proben mit verschiedenen Substratmischen versetzt. Diese unterschieden sich hinsichtlich ihrer DTT-Konzentrationen. In den Substratmix-Stammlösungen wurden jeweils Konzentrationen von 20, 40, 100 und 200 mM für DTT eingestellt. Daraus ergab sich eine Gesamtkonzentration im Deiodase-1 Assay für DTT von 10, 20, 50 und 100 mM.

Abb. 3-7: Variation der DTT-Konzentration (10 bis 100 mM) im Deiodase-1 Assay unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c4 (2,5 mM bis 1 μ M).

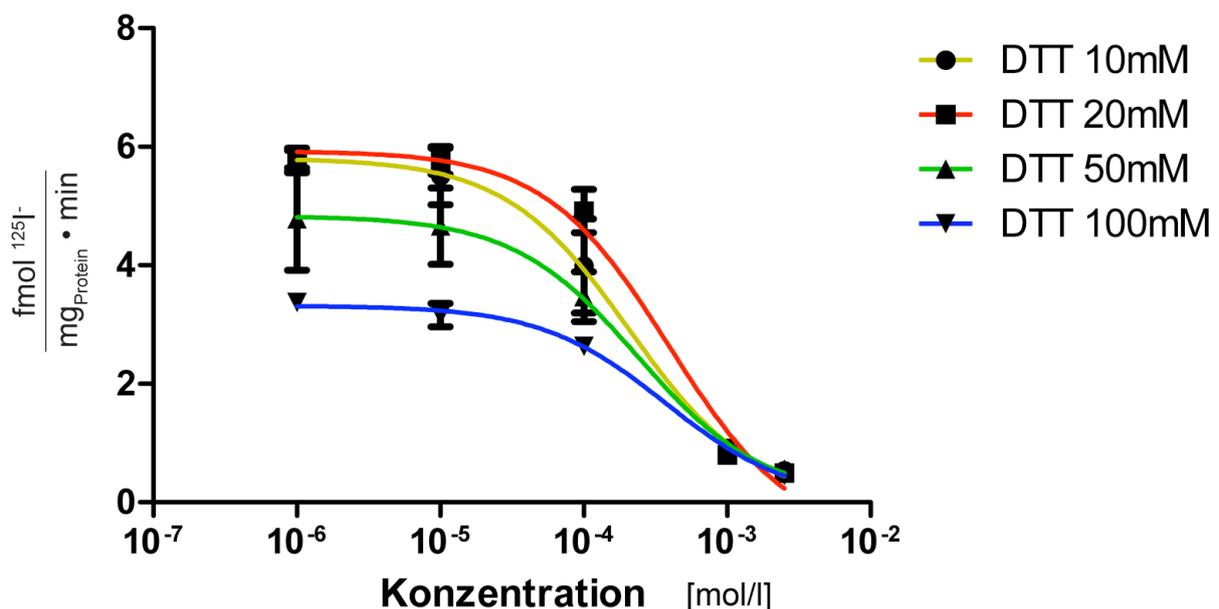


Tabelle 3-3: *Im Deiodase-1 Assay bestimmte IC50-Werte für die Substanz c4 unter Einfluss verschiedener DTT-Konzentrationen (10, 20, 50 und 100 mM).*

Substanz c4	
DTT-Konzentration	IC50-Wert
10 mM	2,1 x 10 ⁻⁴ M
20 mM	3,9 x 10 ⁻⁴ M
50 mM	2,4 x 10 ⁻⁴ M
100 mM	3,7 x 10 ⁻⁴ M

Die Ergebnisse zeigten, dass sich unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an DTT, die berechneten IC50-Werte nur geringfügig ändern. Diese Varianz ist sicherlich auch als Ausdruck der kleineren Fallzahl im Vergleich zu den Hauptversuchen zu interpretieren. Große Veränderungen, wie sie bei einem deutlichen Einfluss der DTT-Konzentration auf die Ergebnisse im Deiodase-1 Assay zu erwarten wären, konnten nicht bestätigt werden.

3.2.4.3 Variation der DTT-Konzentration unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c9.

In dieser Versuchsreihe wurde den Proben im Deiodase-1 Assay die Substanz c9 in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Diese wurden so gewählt, dass eine maximale Inhibition durch diese Substanz erreicht wurde. Anschließend wurden diese Proben mit verschiedenen Substratmischen versetzt. Diese unterschieden sich hinsichtlich ihrer DTT-Konzentrationen. In den Substratmix-Stammlösungen wurden jeweils Konzentrationen von 20, 40, 100 und 200 mM für DTT eingestellt. Daraus ergab sich eine Gesamtkonzentration im Deiodase-1 Assay für DTT von 10, 20, 50 und 100 mM.

Abb. 3-8: Variation der DTT-Konzentration (10 bis 100 mM) im Deiodase-1 Assay unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c9 (10 mM bis 1 μ M).

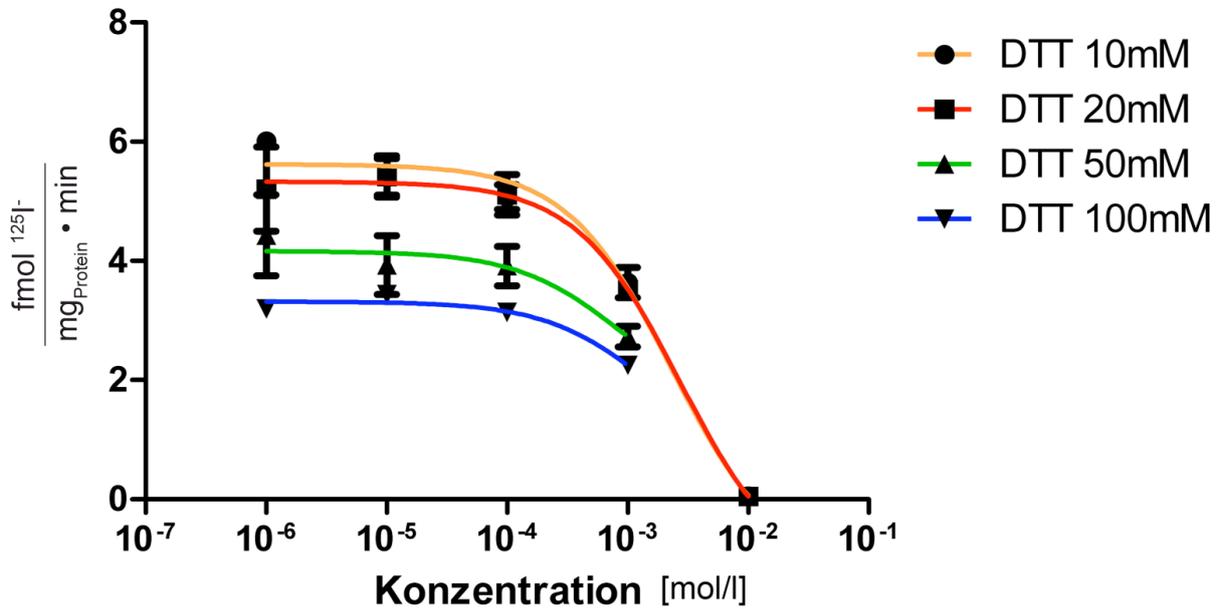
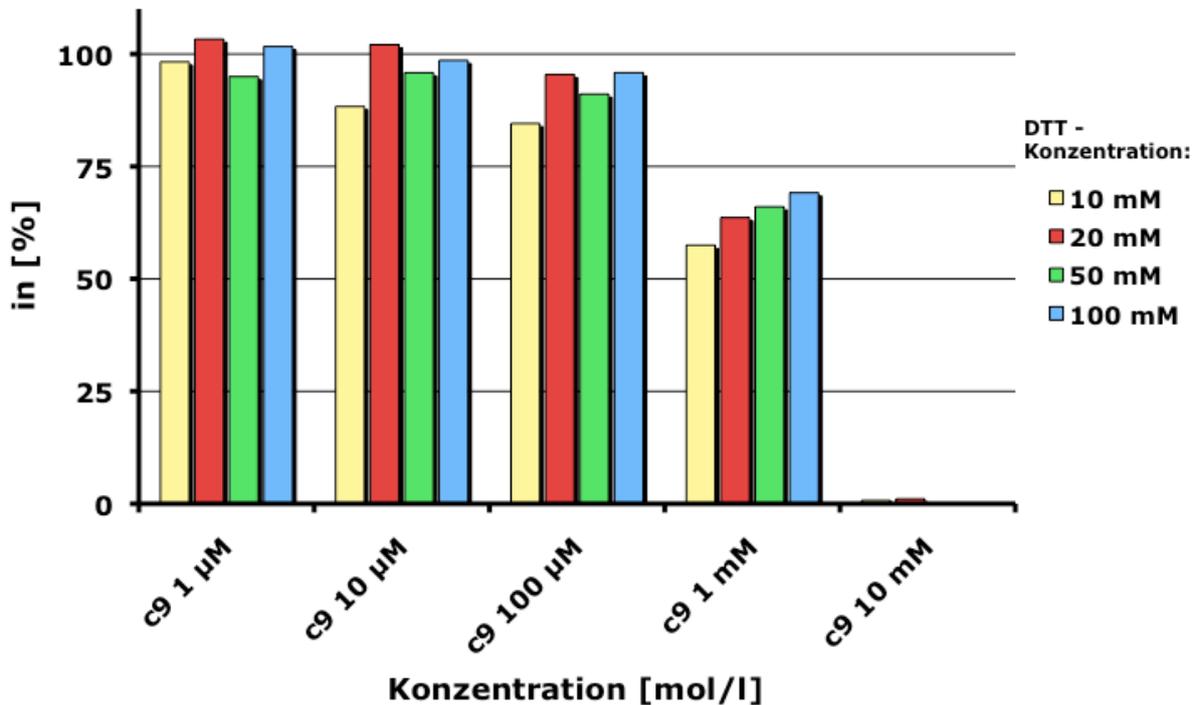


Abb. 3-9: Variation der DTT-Konzentration (10 bis 100 mM) im Deiodase-1 Assay unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz c9 (10 mM bis 1 μ M). Darstellung der Ergebnisse als Fraktion der jeweiligen H₂O-Kontrollen.



Es zeigte sich, dass bezogen auf die jeweiligen Kontrollen ohne Inhibitor mit einer DTT-Konzentration von 20 mM keine signifikante Änderung der Fähigkeit der Hemmung der Dio1 durch die Substanz c9 unter verschiedenen DTT-Konzentrationen stattfand. Damit konnte, insbesondere unter Miteinbeziehung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.3.1, für c4 ausgeschlossen werden, dass die DTT-Konzentration für die gezeigte Inhibition der Dio1 in hohen Konzentrationen durch die Substanzen c4 bis c10 verantwortlich war.

Da alle Substanzen, wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit H₂O auf die erforderlichen Endkonzentrationen verdünnt wurden, musste eine Beeinflussung der Versuche durch DMSO ausgeschlossen werden. Hierfür wurden bei allen Versuchen routinemäßig Kontrollen, welche entweder nur H₂O oder ausschließlich DMSO enthielten, mit untersucht. DMSO wurde diesen Kontrollen unverdünnt zugefügt. Die Endkonzentration von DMSO lag in den Kontrollen damit höher als in den Proben. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die in den Testsubstanzen enthaltenen DMSO-Konzentrationen konnte so ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass vier der zehn untersuchten neuen schwefel- und selenhaltigen Derivate der bekannten Thioharnstoff-Thyreostatika gleich gute oder sogar eine bessere Wirkung im Hinblick auf die Hemmung der zwei Schlüsselenzyme TPO und Dio1 im Vergleich zu den klassischen Verbindungen MMI und PTU haben. Die beiden schwefelhaltigen Substanzen 5-MTU (c1) und 6-BTU (c2) sind im Vergleich zu PTU in vitro effizientere Inhibitoren der Dio1. Obwohl 5-MTU (c1), 6-BTU (c2) und MSel (c4), die Selenvariante des MMI, weniger effiziente Inhibitoren der TPO als das MMI sind, zeigten sie trotzdem eine bessere Inhibition für die TPO als PTU. Besonders hervorzuheben ist die Substanz 5-CETU (c3), die eine exklusive Hemmung der Dio1 zeigte. Die Hemmung der Dio1 war dabei ebenso potent wie mit PTU. Damit ist 5-CETU (c3) die erste bekannte Substanz, die nur eine inhibitorische Wirkung auf die Dio1, nicht jedoch auf die TPO zeigte. Dadurch ist zumindest in vitro die Möglichkeit gegeben, eine selektive Hemmung der Dio1 ohne gleichzeitige Hemmung der TPO zu erreichen.

4.1 *Evaluation der schwefelhaltigen Derivate*

Die klassischen Thyreostatika MMI und PTU stellen die bekanntesten klinisch relevanten Derivate der Thioharnstoffe dar. MMI und PTU inhibieren die Schilddrüsenhormonsynthese durch Hemmung der TPO, PTU inhibiert zusätzlich den Schilddrüsenhormon-Metabolismus durch Effekte auf Dio1. Von den untersuchten Thioharnstoffderivaten zeigten 5-MTU (c1) und 6-BTU (c2) den größten inhibitorischen Effekt auf die TPO und waren sogar in vitro effizientere Inhibitoren als MMI und PTU. Die Substanz 5-CETU (c3) zeigte keine Hemmung der TPO, konnte aber in vitro die Dio1 ebenso potent inhibieren wie PTU. 5-MTU (c1) und 6-BTU (c2) wiesen die effizienteste Hemmung der Dio1 auf. Die übrigen untersuchten Thioharnstoffderivate zeigten keine signifikante Inhibition der TPO und nur eine schwache hemmende Wirkung auf die Dio1 in sehr hohen Konzentrationen (IC₅₀: 1,4 bis 3 mM).

4.1.1 Wirkung der schwefelhaltigen Derivate auf die TPO

Der Mechanismus der Inhibition der TPO durch die schwefelhaltigen Thyreostatika ist noch nicht vollständig geklärt. Es existieren jedoch mehrere Theorien zur genauen Funktionsweise, wovon die zwei geläufigsten in der Einleitung dieser Arbeit in Abschnitt 1.3.1.2 genauer beschrieben sind.

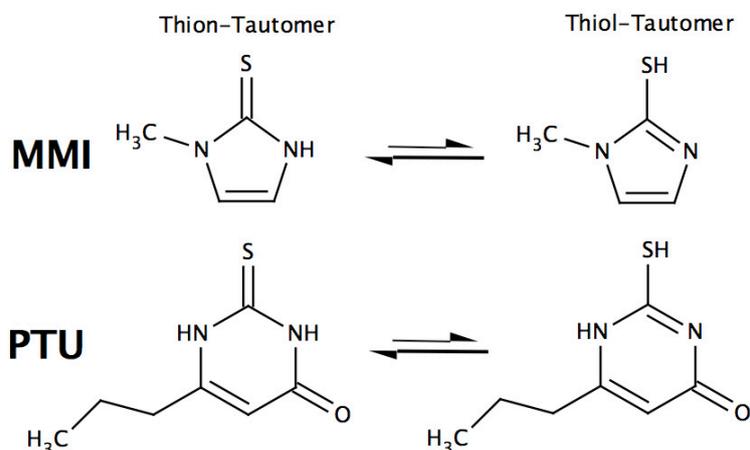
Bei der Theorie nach Aragoni et al. [68] wird davon ausgegangen, dass MMI und PTU als alternative Substrate für das Iodierungszwischenprodukt agieren und dabei das aktivierte Iod an das Schwefelatom der Thioharnstoffgruppe bindet und nicht mehr für die Reaktion mit den Tyrosylresten zur Verfügung steht. Anschließend bildet sich unter Iodidabspaltung ein Methimazoldisulfid.

Die zweite Theorie geht von einer Interaktion der Thioharnstoffgruppe mit dem Eisenkern der TPO aus. Durch diese kompetitive Koordination kommt es zu einer Störung der Enzymfunktion [43, 70].

In beiden Theorien scheint für die Funktionsweise der Thyreostatika die Thioharnstoffgruppe von essentieller Bedeutung zu sein. Alle sechs der hier untersuchten schwefelhaltigen Derivate (5-MTU (c1), 6-BTU (c2), 5-CETU (c3), c5, c7 und c9) haben eine solche Thioharnstoffgruppe. Jedoch zeigten nur zwei der Substanzen (c1 und c2) eine Hemmung der TPO in den untersuchten Konzentrationen.

Betrachtet man die chemische Struktur der Substanzen fallen einige Unterschiede auf. Von den Substanzen MMI, PTU, 5-MTU (c1), 6-BTU (c2) und 6-CETU (c3) existieren jeweils zwei Tautomere, die einer Thion- und einer Thiolform entsprechen. Das Thion ist dabei das energetisch deutlich favorisierte Tautomer [88, 89]. Beim MMI entspricht die Energiedifferenz zwischen dem Thion- und dem Thiol-Tautomer 13,2 KJ/mol [89].

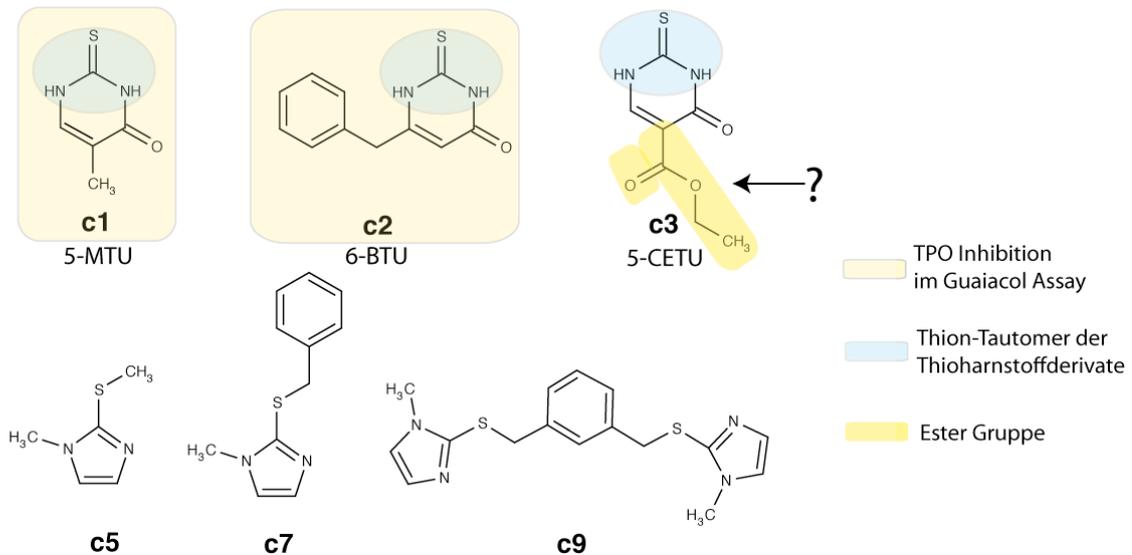
Abb. 4-1: Darstellung der Strukturformeln der Tautomere des Methimazols (MMI) und des Propylthiouracils (PTU): Das Thion-Tautomer ist dabei die energetisch favorisierte Form und für das inhibitorische Potenzial der Substanzen verantwortlich.



Bei der Analyse der Strukturformeln der Substanzen fällt auf, dass die beiden Substanzen 5-MTU und 6-BTU, welche die TPO in den untersuchten Konzentrationen signifikant hemmen, ebenfalls in der Thionform vorkommen. Die Verbindungen c5, c7 und c9 kommen dagegen nicht als Thion vor und zeigten erwartungsgemäß auch keine Inhibition der TPO.

Allerdings zeigte 5-CETU (c3) entgegen der Erwartung keine Inhibition der TPO im Guaiacol Assay, obwohl es eine Thioharnstoffgruppe besitzt und auch als Thion- und Thiol-Tautomer existiert. Bei der Betrachtung der Unterschiede in der Molekülstruktur fällt auf, dass 5-CETU eine Estergruppe an Position 5 des Pyrimidinringes als Substituenten besitzt. Der Pyrimidinring zeigt durch sein delocalisiertes π -Elektronensystem eine Mesomerie, bei Substitution des Pyrimidinrings mit einer „-COOR“-Gruppe kann diese an der Mesomerie teilnehmen. Da die Estergruppe eine Doppelbindung besitzt, entzieht sie dem mesomeren System Elektronenpaare. Durch diesen -M-Effekt auf den Pyrimidinring, könnte es sein, dass 5-CETU bevorzugt als Thiol-Tautomer auftritt. Die Thiolform zeigt jedoch keine ausreichende kompetitive Koordination zum Eisenkern der TPO.

Abb. 4-2: Auswirkungen der chemischen Struktur auf die inhibitorische Wirkung gegenüber der humanen TPO:
 Strukturformeln der Thioharnstoffderivate 5-MTU (c1), 6-BTU (c2), 5-CETU (c3), c5, c7 und c9. Die Substanzen 5-MTU und 6-BTU zeigen im Gegensatz zu 5-CETU, c5, c7 und c9 eine Inhibition der TPO im Guaiacol Assay. Vermutung der fehlenden Inhibition von 5-CETU aufgrund eines –M-Effektes durch die Estergruppe und dadurch Begünstigung der Thiolform, welche keine ausreichende Koordination zum Eisenkern der TPO zeigt.



4.1.2 Wirkung der schwefelhaltigen Derivate auf die Dio1

5-MTU (c1), 6-BTU (c2) und 5-CETU (c3) zeigten eine gleich gute oder potentere Inhibition der Dio1 als PTU. Diese Inhibition geht wahrscheinlich auf die gleiche „Enzym-Se-S-R“-Bindung zurück, über die auch PTU die Dio1 irreversibel hemmt [26, 90, 91]. 6-BTU hemmte die Dio1 etwa 14-mal besser, 5-MTU mehr als doppelt und 5-CETU genauso effektiv wie PTU. Die Substanzen c5, c7 und c9 zeigten ebenfalls eine Hemmung der Dio1 im Deiodase-1 Assay. Jedoch waren für diese Substanzen erheblich höhere Konzentrationen notwendig bis es zu einer Hemmung kam. Die entsprechenden IC50-Werte lagen in einem Bereich zwischen 1,4 und 2,9 mM und hemmten damit die Dio1 ca. 1.000-mal weniger potent als PTU.

Da die Substanzen c5, c7 und c9 über kein endständiges Schwefelatom verfügen, ist ein anderer Reaktionsmechanismus verglichen mit den anderen schwefelhaltigen

Verbindungen wahrscheinlich. Möglich wäre eine Reaktion mit einer anderen SH-Gruppe der Dio1 oder auch kovalent mit einer anderen funktionellen Gruppe des Enzyms. Denkbar wäre ebenfalls eine Interaktion mit freien Iodid-Ionen.

4.2 Evaluation der selenhaltigen Derivate

4.2.1 Wirkung der selenhaltigen Derivate auf die TPO

Die selenhaltigen Derivate c6, c8 und c10 zeigten im Guaiacol Assay keine Hemmung der humanen TPO in den untersuchten Konzentrationen. Einzig MSeI (c4), die selenhaltige Variante des MMI zeigte eine signifikante Inhibition der TPO. Dabei hemmte MMI die TPO etwa 3,4-mal besser als MSeI.

Taurog et al. berichteten 1994 für MSeI im Guaiacol Assay etwa 20% der inhibitorischen Potenz von MMI gefunden zu haben [82]. Die dieser Dissertationsschrift zugrunde liegenden Daten zeigen, dass MSeI etwa 30% der hemmenden Wirkung von MMI hat. Dabei ist anzumerken, dass Taurog et al. TPO von Schweinen verwendet haben. In dem hier beschriebenen Guaiacol Assay wurde hingegen ausschließlich humane TPO verwendet (siehe hierzu auch 2.2.1).

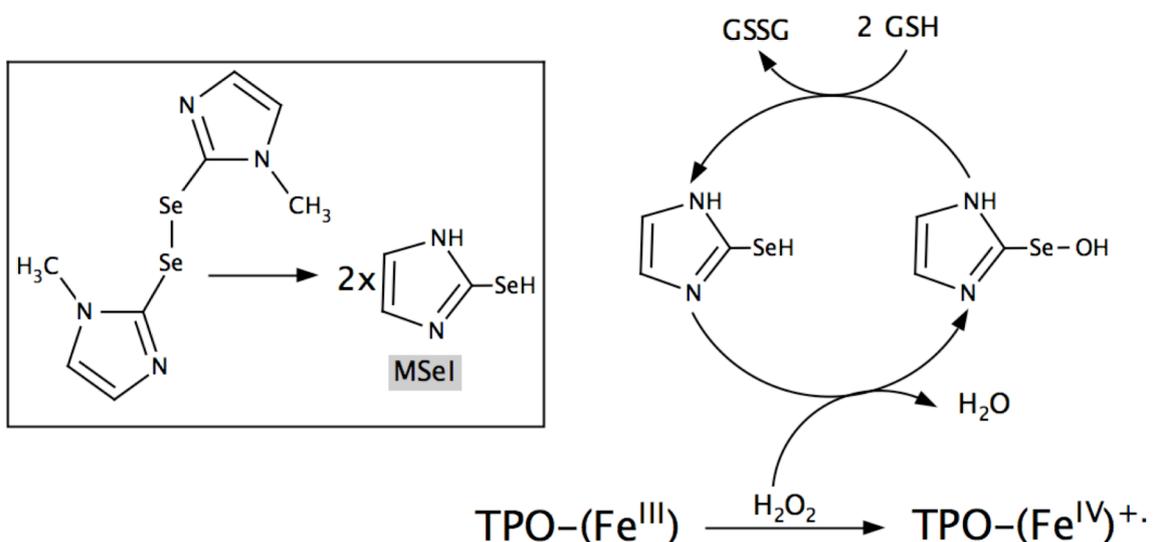
Da MSeI in wässriger Lösung vermutlich recht schnell hauptsächlich in die Selenolform überführt wird, welche keine Koordination zum Eisenkern der TPO zeigt [43], sowie aufgrund der unterschiedlichen inhibitorischen Potenz von MMI und MSeI gegenüber der TPO, postulierten Roy und Mugesh (2005), dass der Hemmung durch MSeI ein anderer Reaktionsmechanismus zugrunde liegen muss [91]. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden Vergleichsexperimente mit Ebselen und Selenazol durchgeführt. Durch die Abwesenheit einer Thiongruppe, welche für die hemmende Wirkung der Thyreostatika verantwortlich gemacht wird, sollten diese Substanzen eigentlich keine inhibitorische Wirkung zeigen. Roy und Mugesh fanden jedoch für MSeI, Ebselen und Selenazol ähnliche IC₅₀-Werte für die Hemmung der Lactoperoxidase (LPO), einem engen Verwandten der TPO. In einem weiteren Experiment

konnten sie zeigen, dass die Hemmung bei diesen Substanzen über eine GPx-ähnliche Wirkung funktioniert [91]. Roy und Mugesh haben für ihre Experimente ausschließlich LPO verwendet. Diese diente ihnen als Mitglied der gleichen Peroxidasefamilie zu der auch die TPO und die Myeloperoxidase (MPO) gehören, als Modell für die TPO. Versuche mit der eigentlichen TPO haben Roy und Mugesh nicht durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurde in den für diese Dissertationsschrift durchgeführten Versuchen ausschließlich humane TPO verwendet.

Die Schilddrüsenhormonsynthese würde demnach über eine Reduktion der H_2O_2 Konzentration durch MSeI gehemmt werden. H_2O_2 wird im ersten Schritt der Schilddrüsenhormonsynthese gebraucht, um den Eisenkern der TPO zu oxidieren (siehe auch 1.3.1.2). Reagiert nun MSeI mit H_2O_2 , indem es durch dieses oxidiert wird, steht das H_2O_2 für die Aktivierungsreaktion der TPO als Cosubstrat nicht mehr ausreichend zur Verfügung und es kommt zu einer indirekten Hemmung der Hormonsynthese. Das oxidierte MSeI wird durch reduziertes Glutathion wieder in seine reduzierte Form überführt und steht für eine erneute Reaktion mit H_2O_2 zur Verfügung.

Abb. 4-3: *Mechanismus der Inhibition der TPO durch MSeI:*

Die Substanz c4 wandelt sich in wässriger Lösung unter Einwirkung von H_2O_2 durch Reduktion in zwei Moleküle MSeI um. MSeI reagiert mit dem im ersten Schritt der Schilddrüsenhormonsynthese gebrauchten H_2O_2 , welches nun nicht mehr für die Aktivierungsreaktion der TPO zur Verfügung steht. Dadurch kommt es zu einer indirekten Hemmung der Hormonbiosynthese. $\text{M}(\text{SeOH})\text{I}$ wird durch zwei Moleküle GSH wieder zu MSeI reduziert und steht danach für eine erneute Reaktion zur Verfügung. GSH/GSSH = reduziertes/ oxidiertes Glutathion, TPO = Thyroperoxidase. (Abbildung abgewandelt nach G. Roy and G. Mugesh, 2005, [43])



Es ist außerdem bekannt, dass hohe H_2O_2 -Konzentrationen im Thyreozyten zur Schädigung der Schilddrüse führen können und mit der Entstehung des myxödematösen Kretinismus in Verbindung gebracht werden [92, 93]. MSeI könnte hierbei als Antioxidans fungieren und die Thyreozyten zusätzlich vor oxidativem Stress schützen.

In einer aktuelleren Arbeit von 2006 beschrieben Mishra et al. [94], dass MSeI hauptsächlich weder als echtes Selenon noch in der Selenolform vorliegt, sondern eher als Zwitterion existiert, in welchem das Selenatom eine überwiegend negative Ladung trägt. Die hemmende Wirkung des PTU auf die TPO scheint wesentlich von der Anwesenheit einer n-Propylgruppe abzuhängen, bei den Selenderivaten hingegen findet sich keine Abhängigkeit der Inhibition durch diese Gruppe. Dies kann als weiterer Hinweis auf einen alternativen Reaktionsmechanismus der selenhaltigen Thyreostatika verstanden werden.

Eine Entwicklung von Medikamenten auf Basis der Selenoharnstoffderivate hätte den entscheidenden Vorteil, dass diese die TPO reversibel inhibieren. Sie wären in ihrer Wirkung kontrollierbarer und somit von großer Bedeutung für die gezielte Therapie der Hyperthyreose.

Die Blockierung der Schilddrüsenhormonsynthese wirkt sich immer auf den gesamten Körper aus. So muss berücksichtigt werden, dass eine starke Inhibition der Hormonsynthese mit nachfolgend niedrigen Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum durchaus das Wachstum der Schilddrüse mit Ausbildung einer Struma bedingen kann. Gerade die optimale Einstellung auf gleichmäßige TSH-Werte im normalen Referenzbereich gestaltet sich oft schwierig. Es kann daher durchaus sinnvoll sein, die Schilddrüsenhormonsynthese durch hohe Thyreostatika-Konzentrationen komplett zu hemmen und dem Patienten lieber gleichzeitig Hormone in Form von L-Thyroxin per os zuzuführen. Diese Form der Behandlung eignet sich besonders bei Patienten die langfristig medikamentös behandelt werden müssen, etwa weil Kontraindikationen gegen oder strikte Ablehnung für Operation und Radioiodtherapie bestehen.

4.2.2 Wirkung der selenhaltigen Derivate auf die Dio1

Die Entdeckung, dass die Dio1 ein Selenoenzym ist, führte zu der Vermutung, dass selenhaltige Derivate der bekannten Thyreostatika eine verstärkte inhibitorische Wirkung auf die Dio1 zeigen könnten [25, 95]. Dabei wurde davon ausgegangen, dass sich durch die höhere Nucleophilie des Selens im Vergleich zum Schwefel eine „Enzym-Se-Se-R“-Bindung leichter und bereitwilliger einstellt als eine „Enzym-Se-S-R“-Bindung [95]. Erste Untersuchungen in diese Richtung fanden in den 1990er Jahren statt. Visser et al. berichteten 1992, dass nach ihren Untersuchungen die Selenvariante des PTU ein doppelt so potenter Inhibitor der Dio1-Aktivität sei wie das klassische schwefelhaltige PTU [81]. Allerdings konnten Taurog et al. drei Jahre später in ihren Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Substanzen in Bezug auf ihre hemmende Wirkung finden [80]. Überlegungen, diesen Unterschied zu erklären, waren die unterschiedlichen Konzentrationen mikrosomaler Proteine (5 µg/ml vs. 25 µg/ml) in den Assays sowie Unterschiede im Herstellungsverfahren der Selenvariante des PTU. Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete jedoch auch, dass MMI die Dio1 nicht hemmt, während das selenhaltige MSel einen signifikanten inhibitorischen Effekt in hohen Konzentrationen (100 bis 300 µM) zeigte [82].

Auch bei den hier getesteten selenhaltigen Derivaten (c4, c6, c8 und c10) konnte eine signifikante inhibitorische Wirkung auf die Dio1 festgestellt werden. Diese lag jedoch in einem Bereich von 0,41 bis 21,3 mM und reichte damit, entgegen anfänglicher Erwartung, bei weitem nicht an die Potenz schwefelhaltiger Thyreostatika heran. Der Austausch der Schwefelatome durch Selen brachte also nicht die gewünschte Steigerung der inhibitorischen Wirkung mit sich.

In dem hier verwendeten Deiodase-1 Assay wurde ausschließlich humane Deiodase verwendet. Die Ergebnisse dürften also relativ gut Rückschlüsse auch auf das Geschehen in menschlichen Schilddrüsenzellen und anderen Dio1 positiven Geweben *in vivo* zulassen.

Die Substanz c4 wandelt sich in diesem Assay vermutlich unter Einwirkung des Reduktionsmittels DTT in zwei Moleküle MSel um, welche dann eine inhibitorische Potenz auf die Dio1 zeigen. DTT ist ein Reduktionsmittel, welches im Deiodase-1 As-

say die Regeneration der Dio1 durch Reduktion ermöglichen und die Oxidierung des Selenocysteins im aktiven Zentrum der Dio1 verhindern soll. Es wird jedoch auch häufig verwendet, um Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten zu spalten. Dadurch lässt sich auch die Fähigkeit zur Spaltung von Diselenidbindungen erklären.

Zwar konnte die inhibitorische Potenz von PTU mit den hier getesteten Selenoharnstoffderivaten nicht erreicht werden, allerdings zeigte MSel (c4) im Gegensatz zu MMI sehr wohl eine signifikante Inhibition. Auch wenn diese etwa um den Faktor 240 niedriger lag als für PTU. Daraus lässt sich ableiten, dass die Theorie von der Entstehung einer „Enzym-Se-Se-R“-Bindung richtig ist. Allerdings sind weitere Experimente nötig, um MSel zum Beispiel durch Änderung der Seitengruppen so zu optimieren, dass es eine noch stärkere inhibitorische Wirkung zeigt. Ebenso muss der Frage nachgegangen werden, ob eine ähnliche inhibitorische Wirkung auch in vivo erreicht werden kann.

4.2.3 Chemische Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Selenoharnstoff-Derivate und mögliche Auswirkungen auf ihre inhibitorische Wirkung

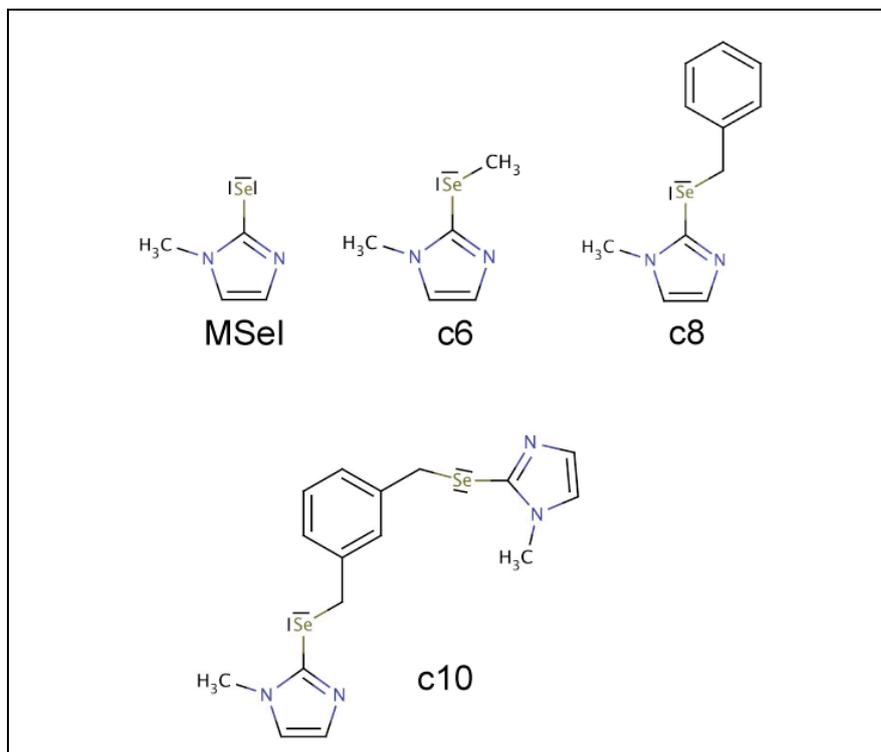
Bei Betrachtung der Selenoharnstoff-Derivate fällt auf, dass nur MSel (nach Spaltung in wässriger Lösung) ein freies endständiges Selenatom besitzt. Bei den Substanzen c6, c8 und c10 ist dieses innerhalb des Moleküls gelegen. Eine mögliche Reaktion könnte in diesem Fall also über die zwei freien Elektronenpaare des Selens stattfinden. Allerdings zeigten diese Substanzen im Guaiacol Assay keine Inhibition der TPO. Verantwortlich für die fehlende Wirkung könnte die beschriebene Lage des Selens innerhalb des Moleküls sein.

Im Deiodase-1 Assay fand sich dagegen eine Hemmung durch c6, c8 und c10 in hohen Konzentrationen. Ursächlich für diese inhibitorische Wirkung könnte sein, dass sich hier trotz der intramolekularen Lage des Selens eine Koordination zwischen den freien Elektronenpaaren des Selens der Substanzen und der Dio1 ausbilden. Es könnte alternativ auch zu einer Bindung über eine SH- oder andere funktionelle Gruppe zwischen der Dio1 und den Substanzen kommen. Die weniger potente Inhi-

bition würde sich dann über eine energetisch schlechter ausbildende Bindung der Substanzen im Vergleich zu MSeI und seinem endständigen „reaktiveren“ Selenatom erklären. Der Beweis hierfür bleibt aber noch zu erbringen.

Die Selenoharnstoff-Derivate haben außerdem gemeinsam, dass sie unter Einfluss von Sauerstoff im Gegensatz zu den Thioharnstoff-Derivaten langsam oxidieren. Dies hat nach Berechnungen von Roy et al. jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse in den benutzten Assays, da diese Oxidation im Verhältnis zu den Versuchszeiten zu langsam abläuft [43].

Abb. 4-4: Strukturformeln der Selenoharnstoff-Derivate MSeI, c6, c8 und c10 mit Darstellung der freien Elektronenpaare der Selenatome als mögliche Stellen zur Ausbildung einer „Enzym-Se-Se-R“-Bindung.



4.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Thyreostatika

Die Behandlung der Hyperthyreose stützt sich auf drei therapeutische Säulen: die medikamentöse Therapie durch Thyreostatika, die Radioiodtherapie und die Thyreoidektomie. Die Thyreostatika MMI und PTU können die Schilddrüsenhormonbiosynthese effektiv inhibieren und wirken damit einer bestehenden Hyperthyreose entgegen. Dabei werden die Thyreostatika meist zur Vorbereitung einer geplanten Operation oder Radioiodtherapie gegeben, da diese Eingriffe zur Vermeidung einer thyreotoxischen Krise in euthyreotem Zustand erfolgen sollten. Auch bei der Intervalltherapie nach einer Radioiodbehandlung werden zur Überbrückung der Zeit bis zum vollen Wirkungseintritt nach etwa 4 bis 6 Monaten Thyreostatika eingesetzt. Eine Dauertherapie erfolgt jedoch nur in seltenen Fällen, in denen definitive Therapiemaßnahmen wegen des Allgemeinzustandes oder aus persönlichen Gründen nicht durchführbar sind oder vom Patienten abgelehnt werden. Der Grund dafür liegt in dem vergleichsweise ungünstigen Nebenwirkungsprofil bzw. der teilweisen unzureichenden Wirksamkeit der Thyreostatika.

Beim M. Basedow werden zur anfänglichen Behandlung fast immer Thyreostatika und gegen die Tachykardie Beta-Blocker eingesetzt. Sollte bereits innerhalb dieser ersten Behandlungsphase eine Rezidivhyperthyreose auftreten oder starke Nebenwirkungen der thyreostatischen Therapie beklagt werden, ist eine alternative ablative Schilddrüsentherapie zu erwägen. Andernfalls beträgt die reguläre Therapiedauer ca. 12 Monate, danach folgt ein Auslassversuch [96]. In 30-50% der Fälle kommt es zu einer Remission, die restlichen Patienten werden zunächst erneut thyreostatisch behandelt und dann der Radioiodtherapie bzw. der Thyreoidektomie zugeführt [97]. Dabei wird in der Regel einseitig total und kontralateral subtotal reseziert mit dem Belassen eines kleinen Schilddrüsenrestes. Postoperativ kommt es dann immer zu einer permanenten Hypothyreose mit lebenslanger Substitutionspflicht für die Schilddrüsenhormone [96]. Eine deutliche Steigerung der Remissionsrate unter thyreostatischer Therapie ist erstrebenswert.

Eine Nebenwirkung ist eine beobachtete oder unbeobachtete Wirkung eines Arzneimittels, die nicht zu seinen beabsichtigten (Haupt-) Wirkungen gehört. Einige dieser Nebenwirkungen können dabei durchaus erwünscht sein, im Allgemeinen handelt es sich jedoch um unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs).

In Tabelle 1-4 sind die wichtigsten UAWs der Thyreostatika MMI und PTU aufgelistet. Sehr häufig kommt es zu allergischen Hauterscheinungen bzw. zur vorübergehenden Erhöhung der Serumtransaminasen. Häufig treten eine Neutropenie oder auch Überempfindlichkeitsreaktionen auf. In 0,1% bis 1% der Fälle kommt es zu Geruchs- und Geschmacksstörungen, Agranulozytose und Ödemen, selten zu Leber- und Nierenschäden, weshalb regelmäßige Blutuntersuchungen nicht nur zur Kontrolle der Schilddrüsenfunktion, sondern auch zum frühzeitigen Erkennen von Nebenwirkungen unter der Therapie unerlässlich sind.

Auch sind Fälle von ANCA positiver Vaskulitis verbunden mit Myalgien und Arthralgien unter Einnahme von PTU beschrieben sowie ein systemischer Lupus erythematoses (SLE) induziert durch Carbimazol.

Unter der Einnahme von 2-Benzylthiouracil (2-BTU), welches in Frankreich unter dem Namen Basdène® (Bouchara-Recordati) im Handel erhältlich ist, kam es in seltenen Fällen ebenfalls zu einer ANCA positiven Vasculitis, einer ANCA positiven Glomerulonephritis [98-100] und in mindestens einem Fall zu hämorrhagischen Lungenschäden [101].

Tabelle 4-1: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen der bekannten Thyreostatika Propylthiouracil (PTU), Carbimazol und Methimazol (MMI)

	PTU	Carbimazol / MMI
Sehr häufig (≥ 10%)	Vorübergehende Erhöhungen der Serumtransaminasen	Allergische Hauterscheinungen (Pruritus, Exanthem, Urtikaria)
Häufig (≥ 1% - < 10%)	Neutropenie, Überempfindlichkeitsreaktionen, allergische Hauterscheinungen (Pruritus, Exanthem, Urtikaria)	
Gelegentlich (≥ 0,1% - < 1%)	Agranulozytose, Geschmacks- und Geruchsstörungen (Dysgeusie, Ageusie)	Agranulozytose (0,3-0,6%), Arzneimittelfieber, Ödeme, Geschmacksstörungen (Dysgeusie, Ageusie), Geruchsstörungen
Selten (≥ 0,01% - < 0,1%)	Medikamentenfieber, Leberschädigung (Cholestasen, hepatozelluläre Nekrose), Schwindel, neuromuskuläre Störungen	
Sehr selten (< 0,01%)	Arthralgien, Vasculitis, Lupus-ähnliches Syndrom, Periarteriitis nodosa, periphere Ödeme, Auftreten von MPO-ANCA verbunden mit Myalgien, Arthralgien, Strumabildung beim Neugeborenen, Hörverlust	Thrombopenie, Panzytopenie, generalisierte Dermatomyositis, induzierter Lupus erythematoses, cholestatischer Ikterus, toxische Hepatitis, Arthralgien, Myalgien, Lymphadenopathie, Arthritiden, Nephritiden, akute Speicheldrüenschwellung, Vaskulitiden, Neuritiden, Polyneuropathien, Insulin-Autoimmunsyndrom

Der Abbruch der Thyreostatikatherapie ist aufgrund der Unverträglichkeiten gerade beim Morbus Basedow häufig. Neben Juckreiz und allergischen Hauterscheinungen kann es anfänglich auch zu einer Verschlechterung einer bestehenden endokrinen Orbitopathie kommen. In der Praxis wird dadurch häufig die optimale Hormoneinstellung der Patienten erschwert. Kommt es unter Thiamazol/Methimazol oder Carbimazol zu allergischen Nebenwirkungen wird PTU eingesetzt, da Kreuzallergien zwischen beiden Substanzgruppen selten sind. Bei Patienten mit Agranulozytose sollte allerdings kein Wechsel stattfinden. Hier ist eine andere definitive Therapie, wie Radioiodtherapie oder Operation, indiziert.

Die Entscheidung, welches Medikament zu bevorzugen ist, gestaltet sich schwierig. MMI hat eine lange Wirkdauer und braucht nur einmal täglich gegeben zu werden, wodurch die Compliance der Patienten erhöht wird. Bei einer Dosis unter 40 mg täglich tritt eine Agranulozytose unter MMI seltener auf, während es unter PTU in jeder Dosierung dazu kommen kann.

Da PTU viel weniger als MMI die Plazentaschranke überschreitet, ist es das bevorzugte thyreostatische Medikament, wenn während einer Schwangerschaft eine Thyreostase notwendig wird. Eine mütterliche Hyperthyreose während der Schwangerschaft geht einher mit erhöhten Abort-, Totgeburt- und Fehlbildungsraten. Eine mütterliche Hypothyreose führt ebenfalls zu erhöhten Abortraten. Daher ist eine engmaschige Kontrolle und exakte möglichst niedrige Dosierung von PTU während der Schwangerschaft wichtig. Die Fehlbildungsrate unter PTU unterscheidet sich nicht von der spontanen Rate.

In der Stillperiode darf nicht Methimazol, wohl aber Carbimazol und PTU verwendet werden. Dabei ist PTU das Mittel der Wahl, da die Konzentration in der Muttermilch höchstens ein Zehntel der mütterlichen Serumkonzentration beträgt. Eine besondere Überwachung des Kindes ist jedoch erforderlich, da Einzelfälle von Hypothyreosen beschrieben wurden.

Die TSH-Rezeptor stimulierenden Antikörper sinken in ihrer Konzentration normalerweise im Rahmen einer Schwangerschaft mit einer natürlich entstehenden Remission bis in das letzte Trimenon. Diese Spontanremission ist auf eine Immunsuppression während der Gravidität zurückzuführen [96]. Die thyreostatische Medikation kann

deshalb in der Regel früh reduziert oder abgesetzt werden. Es sollte immer die niedrigste mögliche Dosis zur Aufrechterhaltung der Euthyreose gewählt werden [102]. Da die Thyreostatika im Gegensatz zu den oral eingenommenen Schilddrüsenhormonen transplazentar übertragen werden, ist eine Kombination von PTU und L-Thyroxin in der Schwangerschaft und Stillzeit obsolet.

PTU wird auch bei der thyreotoxischen Krise bevorzugt, da mit Dosierungen von 800 – 1200 mg/Tag die periphere Konversion von T_4 nach T_3 durch Inhibition der Dio1 blockiert werden kann.

Vor allem im Bereich der Nebenwirkungen wäre eine deutliche Verbesserung der Thyreostatika wünschenswert. Eine solche Verbesserung ließe sich zum einem über potentere Derivate der bekannten Thyreostatika erreichen, da eine niedrigere Dosierung die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von und die Stärke der Nebenwirkungen verringern würde. Zum anderen könnte das Nebenwirkungsprofil durch Veränderung der Molekülstruktur und dadurch der Wirkmechanismen günstig beeinflusst werden.

4.4 Thyreostatika und Endokrine Orbitopathie

Bei der Endokrinen Orbitopathie (EO) handelt es sich um eine im Verlauf eigenständige Autoimmunerkrankung des extraokulären Orbitalgewebes, die in den meisten Fällen mit einer Immunthyreopathie vom Basedow-Typ assoziiert ist. Bei rein klinischer Diagnose sind über 60% der Basedow-Patienten betroffen, schwere Verlaufsformen finden sich in 3-5%. Die EO manifestiert sich meist innerhalb von 6 - 12 Monaten vor oder nach dem Auftreten einer autoimmunen Hyperthyreose.

Lidödem und konjunktivale Injektion gelten als Frühsymptome. Ebenfalls typisch sind eine Konvergenzschwäche (Moebius-Zeichen), das Sichtbarwerden eines weißen Sklerensaumes oberhalb des Limbus beim Geradeausblick (Dalrymple-Phänomen), die Oberlidretraktion beim Blick nach unten (Graefe-Zeichen), das Glanzauge und ein seltener Lidschlag (Stellwag-Zeichen). Das Sichtbarwerden von Ansätzen der lateralen Augenmuskulatur beim Geradeausblick wird Bonampursches Zeichen genannt. Das Leitsymptom der EO ist der Exophthalmus. Zusätzlich können Fremdkörpergefühl, Photophobie, Xerophthalmie oder vermehrter Tränenfluss auftreten.

Die typischen Symptome der EO sind Folge der Volumenzunahme des retrobulbären Binde- und Fettgewebes sowie der interstitiellen Verdickung der Augenmuskeln. Die Diagnostik der EO beruht auf der charakteristischen Anamnese, dem typischen Lokalbefund und dem klinischen und laborchemischen Nachweis einer Immunthyreopathie. In diagnostisch unklaren Situationen und bei schweren Verlaufsformen einer EO liefern bildgebende Verfahren wertvolle Zusatzinformationen.

Die Therapie der EO gehört zu den schwierigsten und anspruchsvollsten bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen. Im Einzelfall ist der Verlauf schwer abschätzbar und kann von der Spontanremission bis hin zum kompletten Sehverlust trotz maximaler konservativer und chirurgischer Therapie variieren. Selten ist die EO auch in unbehandelten Fällen länger als zwei Jahre aktiv und geht dann in ein inaktives Stadium mit unterschiedlich stark ausgeprägten Residualzuständen über [103].

Ohne spontane Besserung ist bei einer aktiven oder fortschreitenden EO nach Errei-

chen der euthyreoten Stoffwechsellage eine antientzündliche bzw. immunsuppressive Therapie erforderlich. Bringt diese nicht den gewünschten Erfolg, kann entweder eine Retrobulbärbestrahlung oder eine operative Behandlung indiziert sein. Allerdings kommt es bei der Mehrzahl der Patienten mit subklinischer oder unkomplizierter EO unter Thyreostatika-Behandlung nach Erreichen der euthyreoten Stoffwechsellage zu einer Stabilisierung oder Rückbildung des Orbitabefundes. Die strikte Einhaltung der Euthyreose ist dabei besonders wichtig, dafür sind regelmäßige Laborkontrollen erforderlich. Die kombinierte Dauerbehandlung mit einem Thionamid (Carbimazol, Thiamazol) plus L-Thyroxin erleichtert das Vermeiden hyper- oder hypothyreoter Funktionslagen.

Bei der EO werden ein oder mehrere gemeinsame Antigene des Orbita- und Schilddrüsengewebes (z.B. TSH-Rezeptor oder Teile davon) vermutet. Bei der Antigenpräsentation retroorbitaler Fibroblasten kommt es zu einer Interaktion mit antigenspezifischen T-Lymphozyten. Danach setzen Lymphozyten ihrerseits Zytokine frei, die die benachbarten Fibroblasten zur Expression von Adhäsionsmolekülen aktivieren. Durch diese Aktivierung der Fibroblasten kommt es zur Produktion von Glykosaminoglykanen und Kollagen. Fibrose und das durch sekundäre Wassereinlagerung in die Glykosaminoglykane entstandene Ödem führen zur EO [104].

Zigarettenrauchen gilt als wesentlicher, den Immunprozess verschlimmernder Faktor bei Patienten mit EO, d. h. das Vorkommen einer EO unter Rauchern ist signifikant höher als bei Nichtrauchern. Auch eine Radioiodtherapie führt häufig zur Verschlechterung einer bestehenden EO oder zur Auslösung, daher sollte diese immer unter Kortisonschutz stattfinden [105, 106].

Aus diesen Erfahrungen schließt man unter anderem, dass oxidativer Stress eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Verschlechterung der EO darstellt. Neueste Untersuchungen legen den Verdacht nahe, dass Antioxidantien wie Selen eine positive Wirkung über Immunmodulation auf die EO haben. Genauere kontrollierte klinische Studien stehen zurzeit jedoch noch aus. Dennoch scheint die Therapie mit Antioxidantien auf Grund der vorliegenden Ergebnisse und des geringen Nebenwirkungsprofils als sinnvolle unterstützende Maßnahme.

Bei der Hashimoto-Thyreoiditis konnte gezeigt werden, dass die 12-monatige Therapie mit L-Selenomethionin zu einer Verringerung der Anzahl von TPO-Antikörpern im

Serum (13% nach 6 Monaten, 21% nach 12 Monaten) der Patienten führte [49]. Auch in Studien von Gärtner et al. [46, 47], Duntas et al. [48], Turker et al. [50-52] und Negro et al. [53] konnten ähnlich positive Effekte auf die TPO-Antikörperkonzentration im Serum durch Substitution von Selen (Natriumselenit oder L-Selenomethionin) bei der Hashimoto- und der postpartalen Thyreoiditis gezeigt werden (siehe hierzu auch Abschnitt 1.1.5). Ergebnisse zu Auswirkungen der Selensubstitution auf TSH-Antikörperlevel beim M. Basedow bleiben dagegen abzuwarten.

Möglicherweise könnten auch neue selenhaltige Thyreostatika einen positiven Einfluss auf die EO haben. So wäre eine genauere Dosierbarkeit und damit langfristige Aufrechterhaltung der Euthyreose wünschenswert, was folglich auch zu einer verringerten Aktivität der EO führen würde. Ebenfalls denkbar wäre ein verändertes peripheres Wirkspektrum mit Einfluss auf die EO. Eine immunmodulatorische Wirkung durch das Selen in den Thyreostatika ist nicht anzunehmen, da dieses gebunden und nicht elementar als Spurenelement vorliegt. Allerdings könnte auch das gebundene Selen antioxidative Eigenschaften besitzen und darüber die EO verbessern.

Zu klären bleibt der Metabolismus der selenhaltigen Substanzen. Es müsste untersucht werden, welcher Anteil der Substanzen resorbiert und anschließend verstoffwechselt wird. Sollte dabei elementares Selen entstehen, bestünde neben positiven Effekten auch die Gefahr einer Selenintoxikation. Die therapeutische Breite des Selenens ist relativ gering. Während bei einer Zufuhr von unter 20 µg pro Tag ein chronischer Mangel zu erwarten ist, besteht bei einer Zufuhr von mehr als 400 µg pro Tag langfristig die Gefahr eine Selenosis zu verursachen. Zu den typischen Symptomen einer Selenosis gehören neben dem charakteristischen Knoblauchgeruch gastrointestinale Beschwerden, Müdigkeit, Erschöpfung, Selenrhinitis, Hautekzeme, Onycholysis, Kopfschmerzen, Haarausfall und Gewichtsabnahme.

Gerade in Selenmangelgebieten könnte hingegen eine Selensubstitution durch die selenhaltigen Thyreostatika erwünscht sein. So würde dem Körper Selen für andere Selenoproteine zur Verfügung gestellt werden. Auch die oben erwähnten positiven immunmodulatorischen Effekte wären bei Entstehung von elementarem Selen zu erwarten.

4.5 Selektive Dio1-Hemmung durch 5-CETU in vitro

Von den klassischen Thyreostatika zeigt nur PTU eine ausgeprägte Inhibition der Dio1. Dabei beruht die antithyreoidale Wirkung von PTU sowohl auf der Hemmung der TPO als auch in höheren Konzentrationen der Dio1. Bisher ist kein Thioharnstoff-Derivat beschrieben, welches ausschließlich die humane Dio1 hemmt ohne gleichzeitig eine Wirkung auf die humane TPO zu zeigen.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen zeigte allerdings 5-CETU im Deiodase-1 Assay eine signifikante Inhibition der Dio1 mit einem IC50-Wert von 1,74 μ M. Im Guaiacol Assay konnte hingegen keine signifikante hemmende Wirkung auf die humane TPO festgestellt werden. 5-CETU nimmt damit eine Sonderstellung unter den Thioharnstoff-Derivaten ein. Es ist die erste Substanz, die eine alleinige Inhibition der Dio1 zeigt und dass ähnlich potent wie PTU.

Mit 5-CETU könnte eine gezielte Blockade der peripheren Hormonwirkung durch Hemmung der Dio1 und damit Inhibition der Umwandlung von T_4 in T_3 an den Zielorganen erreicht werden, ohne gleichzeitig einen direkten Einfluss auf die Hormonsynthese in der Schilddrüse zu zeigen. Es ist bekannt, dass einige Patienten trotz gut eingestellter TSH-Werte unter thyreostatischer Behandlung immer wieder kardiale oder psychomotorische Beschwerden angeben. Ein Vorteil von 5-CETU könnte darin bestehen, dass es bei zusätzlicher Verabreichung die periphere Wirkung der Schilddrüsenhormone abschwächt und zu der Reduktion dieser Symptome führt. Der Vorteil läge dabei in der getrennten Steuerbarkeit von „zentraler“ Hormonproduktion und „peripherer“ Hormonwirkung.

Ein weiterer interessanter Einsatzbereich von 5-CETU könnte in der Amphibienforschung liegen. Die Dio1 wurde früh in Säugetieren und Vögeln nachgewiesen [107, 108] und erst einige Jahre später auch in Fischen [109]. Die Dio1 der Amphibien zeigt entgegen der Dio1 der Säugetiere und Vögel keine Hemmung durch PTU [110]. Dies führte zu der Annahme, dass Amphibien gar keine Dio1 besäßen [111]. Der erste Nachweis, dass auch die Amphibien eine Dio1 besitzen und diese in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt, gelang Kuiper et al. im Jahre 2006. Sie mach-

ten die Substitution der Dio1 der Amphibien mit einer Aminosäure für ihre Unempfindlichkeit gegenüber PTU verantwortlich [112].

Es wäre nun zu überprüfen, ob durch 5-CETU eine Hemmung der veränderten Dio1 der Amphibien zu erzielen wäre. Hierdurch könnte vielleicht mehr über Funktion und Relevanz der Dio1 bei den Amphibien herausgefunden werden.

4.6 Welche Fragestellung bleibt offen?

Mit den dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten konnte gezeigt werden, dass sowohl einige der untersuchten schwefel- als auch selenhaltigen Substanzen die gewünschte inhibitorische Wirkung auf die TPO und/oder Dio1 hatten. Die inhibitorische Potenz der Substanzen scheint dabei entscheidend von ihrer chemischen Struktur abhängig zu sein und durch Seitengruppen beeinflusst zu werden. Allerdings konnte dies bisher nur in vitro gezeigt werden. Somit müssten weitere tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt werden, um diese Effekte auch in vivo zu bestätigen.

Des Weiteren wären noch die Wirkungen dieser Substanzen auf die beiden anderen Deiodasen zu untersuchen. Die Dio2 und Dio3 wirken ebenfalls wie die Dio1 auf den peripheren Schilddrüsenhormon-Metabolismus. Bis heute existiert jedoch kein Medikament, welches eine direkte Wirkung auf die Dio2 und Dio3 zeigt. Dieser Effekt wäre aber durchaus wünschenswert.

Ein möglicher Ansatz wäre auch, die hier getesteten Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf GPx zu untersuchen und mögliche antioxidative Eigenschaften speziell der selenhaltigen Derivate weiter zu erforschen.

Insbesondere 5-CETU, welches eine sehr gute Inhibition der Dio1 in dieser Arbeit zeigte ohne dabei gleichzeitig eine signifikante hemmende Wirkung der humanen TPO aufzuweisen, sollte im Tierexperiment weiter untersucht werden. Sollten sich dabei die Ergebnisse bestätigen lassen, würde endlich eine Substanz zur Verfügung stehen, welche ausschließlich peripher am Zielorgan wirkt. So ließe sich eine Entkopplung in der Therapie von zentraler Hormonproduktion und peripherer Wirkung erreichen.

5. Zusammenfassung

Die Schilddrüse reguliert mit ihren Hormonen Wachstum, Entwicklung, Energiehaushalt, Stoffwechsel, Nervensystem und Herzaktivität. Dies erklärt die vielfältigen Symptome bei Erkrankungen der Schilddrüse. Eine ausreichende Versorgung mit den beiden Spurenelementen Iod und Selen ist zur Prävention von Schilddrüsenerkrankungen wichtig. Eine häufige Erkrankung der Schilddrüse ist die Hyperthyreose. Bei dieser besteht ein Überschuss von Schilddrüsenhormonen an den Zielorganen. Hiervon sind in Deutschland ca. 550.000 Menschen betroffen [113]. In 95% der Fälle liegt der Erkrankung eine Autonomie von Schilddrüsengewebe oder eine Autoimmunerkrankung wie der Morbus Basedow zugrunde. Zur Behandlung können drei unterschiedliche Therapieverfahren angewendet werden: Medikamente zur Hemmung der Hormonproduktion, die operative Entfernung von Schilddrüsengewebe und die Radioiodtherapie.

Die bekannten Thyreostatika Propylthiouracil (PTU), Methimazol (MMI) und Carbimazol sind Thioharnstoffderivate. Sie hemmen die Thyreoperoxidase (TPO), welche eine zentrale Rolle bei der Schilddrüsenhormonsynthese spielt. PTU inhibiert in hohen Konzentrationen zusätzlich die Dio1, welche T_4 in biologisch aktives T_3 umwandelt. Die Entdeckung, dass Dio1 ein selenocysteinhaltiges Enzym ist, führte zu der Vermutung, dass selenhaltige Thioharnstoffderivate durch ihre höhere Nucleophilie bereitwilliger eine Bindung mit der Dio1 eingehen und folglich eine potentere Inhibition zeigen würden.

Ziel dieser Arbeit war, zehn neue schwefel- und selenhaltige Derivate der bekannten Thioharnstoff-Thyreostatika hinsichtlich ihrer Wirkung auf die humane TPO und die Dio1 zu untersuchen. Dabei sollte festgestellt werden, in welcher Weise sich die chemische Modifikation dieser Substanzen, insbesondere das Ersetzen von Schwefel durch Selen, auf deren inhibitorische Eigenschaften auswirkt. Das langfristige Ziel ist, Medikamente mit einer optimierten antithyreoidalen Wirkung zu entwickeln. Zusätzlich ist eine gegen die TPO gerichtete Wirkung von einer gegen die Dio1 gerichteten zu trennen, um auf diese Weise gezielt gegen die unterschiedlichen Symptome der Hyperthyreose vorgehen zu können. Außerdem sollen durch die Veränderungen Nebenwirkungen eliminiert oder zumindest minimiert werden.

Anhand von Proteinextrakten aus den humanen Zelllinien FTC-238/TPO und Hep-G2, welche TPO bzw. Dio1 enthalten, wurden die inhibitorischen Eigenschaften der neuen Thioharnstoff-Derivate überprüft und mittels Dosis-Wirkungskurven die IC₅₀-Werte bestimmt. Die Wirkung der Substanzen auf die humane TPO wurde im Guaiacol Assay durch Änderung des Absorptionsspektrums bei 470 nm photometrisch bestimmt. Die Hemmung der TPO erfolgte durch MMI dabei etwa 3,4-, 6- bzw. 13-mal potenter als durch die Substanzen MSeI, 5-MTU und 6-BTU. Allerdings hemmten diese die TPO effektiver als PTU. Die Substanz MSeI etwa 4-mal, 5-MTU etwa 2,3-mal und 6-BTU ungefähr genauso potent wie PTU. Die Ergebnisse für MSeI stehen damit in Einklang mit den Untersuchungen von Taurog et al. [82]. Bei den Derivaten 5-CETU und c5 - c10 konnte in den untersuchten Konzentrationen keine signifikante Hemmung der TPO festgestellt werden. Zur Untersuchung der Wirkung der Substanzen auf die Dio1 wurde deren Aktivität über den Umsatz von radioaktiv-markiertem rT₃ bestimmt. 5-MTU und 6-BTU hemmten bei gleicher Konzentration die Dio1 potenter und 5-CETU gleich gut wie PTU. Der ermittelte IC₅₀-Wert für 5-MTU lag bei 0,7 µM, für 6-BTU bei 0,1 µM und für 5-CETU sowie PTU bei 1,7 µM. Von den weniger potenten Substanzen zeigte MSeI mit 414 µM den niedrigsten und c10 mit 21 mM den höchsten IC₅₀-Wert.

Es konnte gezeigt werden, dass vier der zehn untersuchten Substanzen eine, im Vergleich zu den klassischen Verbindungen MMI und PTU, gleich gute oder sogar bessere Hemmung der zwei Schlüsselenzyme TPO und Dio1 besitzen. Die beiden schwefelhaltigen Substanzen 5-MTU und 6-BTU sind *in vitro* effizientere Inhibitoren der Dio1 als PTU. Obwohl 5-MTU, 6-BTU und MSeI weniger effiziente Inhibitoren der TPO sind als das MMI, zeigten sie trotzdem eine bessere Inhibition für die TPO als PTU. Besonders hervorzuheben ist die Substanz 5-CETU, die eine exklusive Hemmung der Dio1 zeigte. Die Inhibition der Dio1 fand dabei ebenso potent wie mit PTU statt. Damit ist 5-CETU die erste bekannte Substanz, die ausschließlich die Dio1 hemmt. Entgegen den Erwartungen waren die meisten selenhaltigen Derivate den schwefelhaltigen in ihrer inhibitorischen Wirkung nicht überlegen. Allerdings zeigte MSeI im Gegensatz zu MMI eine Inhibition der Dio1. Diese war jedoch um den Faktor 240 schwächer als die von PTU. Es sind daher weitere Experimente nötig, um MSeI, zum Beispiel durch Änderung der Seitengruppen, so zu optimieren, dass es eine noch stärkere inhibitorische Wirkung zeigt. Ebenso sollte der Frage nachgegangen werden, ob ähnliche inhibitorische Wirkungen auch *in vivo* erreicht werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Schiebler TH, Arnold G. *Anatomie Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs*. 8th ed. Berlin: Springer Verlag, 1999:1-892.
2. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3rd ed. München: Urban & Fischer Verlag, 2004:1-1267.
3. Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7th ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2003.
4. Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, et al. *The Na⁺/I⁻ symporter of the thyroid gland*. Soc Gen Physiol Ser 1993;48:251-62.
5. Köhrle J. *Selenium and the control of thyroid hormone metabolism*. Thyroid 2005;15(8):841-53.
6. Carrasco N. *Iodide transport in the thyroid gland*. Biochim Biophys Acta 1993;1154(1):65-82.
7. Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, et al. *Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells*. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(7):3356-61.
8. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, et al. *Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells*. Endocrinology 2000;141(2):839-45.
9. Scott DA, Wang R, Kreman TM, et al. *The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein*. Nat Genet 1999;21(4):440-3.
10. Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, et al. *Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site*. Faseb J 2004;18(13):1574-6.
11. Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, et al. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th: W. B.Saunders, 2003:1-1927.
12. Friesema EC, Jansen J, Milici C, et al. *Thyroid hormone transporters*. Vitam Horm 2005;70:137-67.
13. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, et al. *Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter*. J Biol Chem 2003;278(41):40128-35.

14. Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, et al. *Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8*. Eur J Endocrinol 2005;153(3):359-66.
15. Ruf J, Carayon P. *Structural and functional aspects of thyroid peroxidase*. Arch Biochem Biophys 2006;445(2):269-77.
16. Ohtaki S, Nakagawa H, Kimura S, et al. *Analyses of catalytic intermediates of hog thyroid peroxidase during its iodinating reaction*. J Biol Chem 1981;256(2):805-10.
17. Ohtaki S, Nakagawa H, Nakamura M, et al. *One- and two-electron oxidations of tyrosine, monoiodotyrosine, and diiodotyrosine catalyzed by hog thyroid peroxidase*. J Biol Chem 1982;257(22):13398-403.
18. Sun W, Dunford HB. *Kinetics and mechanism of the peroxidase-catalyzed iodination of tyrosine*. Biochemistry 1993;32(5):1324-31.
19. Taurog A, Dorris ML, Doerge DR. *Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase*. Arch Biochem Biophys 1996;330(1):24-32.
20. Cooper DS. *Antithyroid drugs*. N Engl J Med 2005;352(9):905-17.
21. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, et al. *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases*. Endocr Rev 2002;23(1):38-89.
22. St Germain DL, Galton VA. *The deiodinase family of selenoproteins*. Thyroid 1997;7(4):655-68.
23. Köhrle J. *The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action*. Cell Mol Life Sci 2000;57(13-14):1853-63.
24. Hernandez A, Park JP, Lyon GJ, et al. *Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (DIO3) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1*. Genomics 1998;53(1):119-21.
25. Berry MJ, Banu L, Larsen PR. *Type I iodothyronine deiodinase is a seleno-cysteine-containing enzyme*. Nature 1991;349(6308):438-40.
26. Kuiper GG, Kester MH, Peeters RP, et al. *Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination*. Thyroid 2005;15(8):787-98.
27. Goswami A, Rosenberg IN. *Effects of glutathione on iodothyronine 5'-deiodinase activity*. Endocrinology 1988;123(1):192-202.
28. Toyoda N, Kaptein E, Berry MJ, et al. *Structure-activity relationships for thyroid hormone deiodination by mammalian type I iodothyronine deiodinases*. Endocrinology 1997;138(1):213-9.

29. Koenig RJ. *Regulation of type 1 iodothyronine deiodinase in health and disease*. *Thyroid* 2005;15(8):835-40.
30. Köhrle J. *Schilddrüsenhormone: Metabolismus und Wirkungen*. *Z Ärztl Fortbild Qualitätssich* 2004;98 Suppl 5:17-24.
31. Croteau W, Davey JC, Galton VA, et al. *Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues*. *J Clin Invest* 1996;98(2):405-17.
32. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, et al. *Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase*. *Endocrinology* 1996;137(8):3308-15.
33. Köhrle J. *Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21(2):173-91.
34. Peeters RP, Debaveye Y, Fliers E, et al. *Changes within the thyroid axis during critical illness*. *Crit Care Clin* 2006;22(1):41-55, vi.
35. Boelen A, Kwakkel J, Alkemade A, et al. *Induction of type 3 deiodinase activity in inflammatory cells of mice with chronic local inflammation*. *Endocrinology* 2005;146(12):5128-34.
36. Saberi M, Sterling FH, Utiger RD. *Reduction in extrathyroidal triiodothyronine production by propylthiouracil in man*. *J Clin Invest* 1975;55(2):218-23.
37. Abuid J, Larsen PR. *Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism. Comparison of the acute changes during therapy with antithyroid agents*. *J Clin Invest* 1974;54(1):201-8.
38. Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM. *Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications*. *Endocr Rev* 1981;2(1):87-102.
39. Schomburg L, Riese C, Michaelis M, et al. *Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice*. *Endocrinology* 2006;147(3):1306-13.
40. Streckfuss F, Hamann I, Schomburg L, et al. *Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337(2):739-45.
41. Maia AL, Kim BW, Huang SA, et al. *Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans*. *J Clin Invest* 2005;115(9):2524-33.
42. Köhrle J, Jakob F, Contempre B, et al. *Selenium, the thyroid, and the endocrine system*. *Endocr Rev* 2005;26(7):944-84.

43. Roy G, Muges G. *Anti-thyroid drugs and thyroid hormone synthesis: effect of methimazole derivatives on peroxidase-catalyzed reactions*. J Am Chem Soc 2005;127(43):15207-17.
44. Goyens P, Golstein J, Nsombola B, et al. *Selenium deficiency as a possible factor in the pathogenesis of myxoedematous endemic cretinism*. Acta Endocrinol (Copenh) 1987;114(4):497-502.
45. Contempre B, Duale NL, Dumont JE, et al. *Effect of selenium supplementation on thyroid hormone metabolism in an iodine and selenium deficient population*. Clin Endocrinol (Oxf) 1992;36(6):579-83.
46. Gartner R, Gasnier BC, Dietrich JW, et al. *Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations*. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(4):1687-91.
47. Gartner R, Gasnier BC. *Selenium in the treatment of autoimmune thyroiditis*. Biofactors 2003;19(3-4):165-70.
48. Duntas LH, Mantzou E, Koutras DA. *Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis*. Eur J Endocrinol 2003;148(4):389-93.
49. Mazokopakis EE, Papadakis JA, Papadomanolaki MG, et al. *Effects of 12 months treatment with L-selenomethionine on serum anti-TPO Levels in Patients with Hashimoto's thyroiditis*. Thyroid 2007;17(7):609-12.
50. Turker O, Karapolat I. *There is immunological benefit of selenium treatment in autoimmune thyroiditis**. Thyroid 2008;18(6):671-2.
51. Turker O, Karapolat I. *Selenium treatment in autoimmune thyroiditis*. Thyroid 2006;16(12):1326.
52. Turker O, Kumanlioglu K, Karapolat I, et al. *Selenium treatment in autoimmune thyroiditis: 9-month follow-up with variable doses*. J Endocrinol 2006;190(1):151-6.
53. Negro R, Greco G, Mangieri T, et al. *The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies*. J Clin Endocrinol Metab 2007;92(4):1263-8.
54. Angermayr L, Clar C. *Iodine supplementation for preventing iodine deficiency disorders in children*. Cochrane Database Syst Rev 2004(2):CD003819.
55. Schilddrüsen-Initiative-Papillon (2007) *Die Papillon-Studie*. <http://www.schilddruese.de/download/download-studie.pdf>.
56. Meng W, Skriba PC. *Jodversorgung in Deutschland, Probleme und erforderliche Maßnahmen: Update 2002*. Deutsches Ärzteblatt 2002;99(39):A2560-4.
57. Thamm M, Ellert U, Thierfelder W, et al. *Jodurie bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland*. Ernährung - Wissenschaft und Praxis 2007;1(5):220-4.

58. Steinbeck G, Paumgartner G. *Therapie innerer Krankheiten*. 11th: Springer Verlag, 2005:1-1825.
59. Bongers-Schokking JJ, Koot HM, Wiersma D, et al. *Influence of timing and dose of thyroid hormone replacement on development in infants with congenital hypothyroidism*. J Pediatr 2000;136(3):292-7.
60. Fisher DA. *The importance of early management in optimizing IQ in infants with congenital hypothyroidism*. J Pediatr 2000;136(3):273-4.
61. Berdel WE, Böhm M, Classen M, et al. *Innere Medizin*. 5th ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2004:1-2147.
62. Herold G. *Innere Medizin*. 2004 ed. Köln: Gerd Herold, 2004:1-812.
63. Tallstedt L, Lundell G, Topping O, et al. *Occurrence of ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism*. The Thyroid Study Group. N Engl J Med 1992;326(26):1733-8.
64. Cooper DS. *Antithyroid drugs in the management of patients with Graves' disease: an evidence-based approach to therapeutic controversies*. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(8):3474-81.
65. Solomon B, Glinoe D, Lagasse R, et al. *Current trends in the management of Graves' disease*. J Clin Endocrinol Metab 1990;70(6):1518-24.
66. Wartofsky L, Glinoe D, Solomon B, et al. *Differences and similarities in the diagnosis and treatment of Graves' disease in Europe, Japan, and the United States*. Thyroid 1991;1(2):129-35.
67. Reid JR, Wheeler SF. *Hyperthyroidism: diagnosis and treatment*. Am Fam Physician 2005;72(4):623-30.
68. Aragoni MC, Arca M, Demartin F, et al. *Anti-thyroid drug methimazole: X-ray characterization of two novel ionic disulfides obtained from its chemical oxidation by I(2)*. J Am Chem Soc 2002;124(17):4538-9.
69. Cooper DS. *Antithyroid drugs*. N Engl J Med 1984;311(21):1353-62.
70. Basosi R, Niccolai N, Rossi C. *Coordination behaviour of antithyroid drugs against the Fe(I)(NO)₂ group in solution: ESR and FT-NMR study*. Biophys Chem 1978;8(1):61-9.
71. Eng PH, Cardona GR, Previti MC, et al. *Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells*. Eur J Endocrinol 2001;144(2):139-44.
72. Lazarus JH. *The effects of lithium therapy on thyroid and thyrotropin-releasing hormone*. Thyroid 1998;8(10):909-13.
73. Bocchetta A, Loviselli A. *Lithium treatment and thyroid abnormalities*. Clin Pract Epidemiol Ment Health 2006;2:23.

74. Kuschinsky G, Lüllmann H, Mohr K. *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 13th ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1993:1-439.
75. Schmutzler C, Bacinski A, Gotthardt I, et al. *The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase*. *Endocrinology* 2007;148(6):2835-44.
76. Schlecht C, Klammer H, Frauendorf H, et al. *Pharmacokinetics and metabolism of benzophenone 2 in the rat*. *Toxicology* 2008;245(1-2):11-7.
77. Schlecht C, Klammer H, Wuttke W, et al. *A dose-response study on the estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary and uterus of female rats*. *Arch Toxicol* 2006;80(10):656-61.
78. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, et al. *Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme*. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173(3):1143-9.
79. Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ. *Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium*. *Biochem J* 1990;272(2):537-40.
80. Taurog A, Dorris ML, Hu WX, et al. *The selenium analog of 6-propylthiouracil. Measurement of its inhibitory effect on type I iodothyronine deiodinase and of its antithyroid activity*. *Biochem Pharmacol* 1995;49(5):701-9.
81. Visser TJ, Kaptein E, Aboul-Enein HY. *Selenouracil derivatives are potent inhibitors of the selenoenzyme type I iodothyronine deiodinase*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189(3):1362-7.
82. Taurog A, Dorris ML, Guziec LJ, et al. *The selenium analog of methimazole. Measurement of its inhibitory effect on type I 5'-deiodinase and of its antithyroid activity*. *Biochem Pharmacol* 1994;48(7):1447-53.
83. Ambrugger P, Biebermann H, Krude H, et al. *TPO mutations in patients with congenital hypothyroidism: functional characterization in thyroid cell cultures*. *European Thyroid Association Annual Meeting 2003 (Abstract)*.
84. Hosoya T. *Effect of various reagents including antithyroid compounds upon the activity of thyroid peroxidase*. *J Biochem (Tokyo)* 1963;53:381-8.
85. 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;72:248-54.
86. Doerge DR, Divi RL, Churchwell MI. *Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases*. *Anal Biochem* 1997;250(1):10-7.
87. Kohrle J. *Iodothyronine deiodinases*. *Methods Enzymol* 2002;347:125-67.
88. Antoniadis CD, Corban GJ, Hadjidakou SK, et al. *Synthesis and Characterization of 6-n-propyl-2-thiouracil and 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole and Pos-*

- sible Implications for the Mechanism of Action of Anti-Thyroid Drugs*. European Journal of Inorganic Chemistry 2003;2003(8):1635-40.
89. Laurence C, El Ghomari M, Luçon M. *Structure and molecular interactions of anti-thyroid drugs. Part 1. Dipole moments of carbimazole and methimazole, and conformation of carbimazole*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1998;5:1159-62.
 90. du Mont WW, Mugesh G, Wismach C, et al. *Reactions of Organoselenenyl Iodides with Thiouracil Drugs: An Enzyme Mimetic Study on the Inhibition of Iodothyronine Deiodinase*. Angew Chem Int Ed Engl 2001;40(13):2486-9.
 91. Roy G, Nethaji M, Mugesh G. *Biomimetic studies on anti-thyroid drugs and thyroid hormone synthesis*. J Am Chem Soc 2004;126(9):2712-3.
 92. Contempre B, Deneff JF, Dumont JE, et al. *Selenium deficiency aggravates the necrotizing effects of a high iodide dose in iodine deficient rats*. Endocrinology 1993;132(4):1866-8.
 93. Contempre B, Le Moine O, Dumont JE, et al. *Selenium deficiency and thyroid fibrosis. A key role for macrophages and transforming growth factor beta (TGF-beta)*. Mol Cell Endocrinol 1996;124(1-2):7-15.
 94. Mishra B, Priyadarsini KI, Mohan H, et al. *Horseradish peroxidase inhibition and antioxidant activity of ebselen and related organoselenium compounds*. Bioorg Med Chem Lett 2006;16(20):5334-8.
 95. Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, et al. *Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase*. J Biol Chem 1991;266(22):14155-8.
 96. Derwahl K-M. *Schilddrüse Update 2005 : Diagnostik- und Therapiestandards von Schilddrüsenerkrankungen : Referate des 3. Hauptstadt-Symposiums*. ed. Berlin: UMD Medizin Verlag, 2005:72.
 97. McKenna TJ. *Graves' disease*. Lancet 2001;357(9270):1793-6.
 98. Tieulie N, Huong DL, Andreu M, et al. *ANCA associated glomerulonephritis related to benzylthiouracil*. Rev Med Interne 2002;23(10):853-6.
 99. Kaaroud H, Khiari K, Ben Moussa F, et al. *Vasculitis with renal and pulmonary involvement in a patient receiving benzylthiouracil for Graves disease*. Rev Med Interne 2002;23(10):857-61.
 100. Braham A, Houman MH, Rais L, et al. *Benzylthiouracil induced ANCA-positive vasculitis*. Presse Med 2004;33(19 Pt 1):1331-3.
 101. Thabet F, Sghiri R, Tabarki B, et al. *ANCA-associated diffuse alveolar hemorrhage due to benzylthiouracil*. Eur J Pediatr 2006;165(7):435-6.
 102. O'Doherty MJ, McElhatton PR, Thomas SH. *Treating thyrotoxicosis in pregnant or potentially pregnant women*. Bmj 1999;318(7175):5-6.

103. Heufeler A, Schworm D, Hofbauer C. *Die endokrine Orbitopathie - Aktueller Stand zur Pathogenese, Diagnostik und Therapie*. Deutsches Ärzteblatt 1996;93(20):1336-42.
104. Hotze L-A, Schumm-Draeger P-M. *Schilddrüsenkrankheiten: Diagnose und Therapie*. 5th ed. Berlin: Berliner Med. Verl.-Anst., 2004:1-410.
105. Krassas GE, Perros P. *Prevention of thyroid associated-ophthalmopathy in children and adults: current views and management of preventable risk factors*. *Pediatr Endocrinol Rev* 2007;4(3):218-24.
106. Wiersinga WM, Bartalena L. *Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy*. *Thyroid* 2002;12(10):855-60.
107. Berry MJ, Larsen PR. *Molecular cloning of the selenocysteine-containing enzyme type I iodothyronine deiodinase*. *Am J Clin Nutr* 1993;57(2 Suppl):249S-55S.
108. Van der Geyten S, Sanders JP, Kaptein E, et al. *Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development*. *Endocrinology* 1997;138(12):5144-52.
109. Orozco A, Villalobos P, Jeziorski MC, et al. *The liver of Fundulus heteroclitus expresses deiodinase type 1 mRNA*. *Gen Comp Endocrinol* 2003;130(1):84-91.
110. Galton VA. *The roles of the iodothyronine deiodinases in mammalian development*. *Thyroid* 2005;15(8):823-34.
111. St Germain DL, Hernandez A, Schneider MJ, et al. *Insights into the role of deiodinases from studies of genetically modified animals*. *Thyroid* 2005;15(8):905-16.
112. Kuiper GG, Klootwijk W, Morvan Dubois G, et al. *Characterization of recombinant Xenopus laevis type I iodothyronine deiodinase: substitution of a proline residue in the catalytic center by serine (Pro132Ser) restores sensitivity to 6-propyl-2-thiouracil*. *Endocrinology* 2006;147(7):3519-29.
113. Brabant G, Kahaly GJ, Schicha H, et al. *Milde Formen der Schilddrüsenfunktionsstörung*. *Deutsches Ärzteblatt* 2006;103(31-32):A2110-15.

7. Anhang

7.1 Veröffentlichungen

Vorträge:

Was verbindet Beethoven mit Walzer und Yellow Submarine?

Erbliche Hörerkrankungen erforscht an Mausmodellen.

GC Eichhorn, V Haberkorn, F Kuhnt, P Scholz

Wissenschaftlicher Bericht und Vortrag

Benjamin-Franklin-Kolleg – Stufe 1 WS 2002/03

Schloss Kröchlendorff, Nordwestuckermark

21. – 23. Februar 2003

Inhibitory effects of novel thiourea derivatives on the activity of human TPO and type I 5'-deiodinase

P Scholz

22. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF)

Charite Universitätsmedizin Berlin

7. - 9. Dezember 2006

Poster:

Auswirkungen einer Mutation im p53-Gen auf Apoptose und Zellarrest in Colocarzinomzellen nach Behandlung mit CPT-11

P Scholz & C Bücken-Gärtner

AG Prof. Hanski, Medizinische Klinik I, Abteilung Gastroenterologie, CBF, Charite Universitätsmedizin Berlin.

Benjamin-Franklin-Kolleg – Stufe 2

Postersession Charite Universitätsmedizin Berlin

23. November 2005

Effects of sulfur- and selenium-containing derivatives of MMI and PTU on type I 5'-deiodinase and thyroperoxidase

P Scholz, G Mugesch, P Ambrugger, C Schmutzler, J Köhrle

32nd Annual Meeting of the European Thyroid Association, Leipzig

1. - 5. September 2007

Publikationen:

Effects of sulfur- and selenium-containing derivatives of MMI and PTU on type I 5'-deiodinase and thyroperoxidase (Abstract)

P Scholz, G Mugesch, P Ambrugger, C Schmutzler, J Köhrle

Horm. Res. 2007, 68(suppl 3): p.57-58

7.2 Erklärung

„Ich, Philip Scholz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Inhibitorische Effekte von Thioharnstoff-Derivaten auf die Aktivität der humanen Thyreoperoxidase und der Typ I 5'-Deiodase“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 30. September 2008

Philip Scholz

7.3 *Lebenslauf*

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht mit veröffentlicht.

7.4 Danksagung

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Josef Köhrle für die Auswahl des Themas sowie für die vielen wertvollen Anregungen und konstruktiven Diskussionen.

Ganz besonders herzlich möchte ich Frau PD Dr. Cornelia Schmutzler für Ihre Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema danken. Sie war für mich eine wertvolle Hilfe nicht nur beim Klären offener Fragen, sondern auch bei der kontinuierlichen Betreuung der Arbeit sowie dem kritischen Korrekturlesen.

Mein Dank gilt außerdem besonders Frau Katrin Huhne für die technische Hilfe und praktische Unterstützung beim Erstellen der Assays. Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für die stets freundliche und informative Zusammenarbeit danken.

Bei Frau Olga Jakob vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie möchte ich mich für die statistische Beratung bedanken.

Meinen Eltern danke ich, dass Sie mir das Studium ermöglicht haben und mich stets unterstützten.

Meiner Lebenspartnerin danke ich für die moralische Unterstützung, ohne die diese Arbeit ungleich schwerer gewesen wäre.