

Die Rolle des Schilddrüsenhormonmetaboliten
3-Iodthyronamin in der Regulation der
Schilddrüsenhormonhomöostase

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Nancy Schanze
aus Sangerhausen

2017

Die Arbeit wurde von April 2013 bis März 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Josef Köhrle am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Professor Dr. Josef Köhrle

2. Gutachter: Professor Dr. Sigmar Stricker

Disputation am 22.09.2017

VERZEICHNISSE

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG.....	XI
ABSTRACT	XIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Schilddrüsenhormonbiosynthese.....	1
1.2 Regulation der Schilddrüsenhormonbiosynthese	3
1.2.1 Thyreotropin (TSH) und TSH-Rezeptor nachgeschaltete Signalwege	3
1.2.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-SD-Achse (HPT-Achse).....	4
1.2.3 Autoregulation der SDH-Synthese durch Iodid – Wolff-Chaikoff-Effekt	6
1.3 Wirkungen und Wirkmechanismen der SDH.....	7
1.3.1 Biologische Wirkungen von SDH	7
1.3.2 Direkte Wirkung auf die Genexpression durch Aktivierung von SDH-Rezeptoren (TR).....	8
1.3.3 Weitere Wirkmechanismen von SDH	9
1.4 Regulation der SDH-Wirkung.....	9
1.4.1 SDH-Transport über Membranen.....	9
1.4.2 Abundanz von SDH-Rezeptoren	10
1.4.3 Metabolismus von SDH zur Aktivierung und Inaktiverung.....	11
1.5 3-Iodthyronamin (3-T ₁ AM)	12
1.5.1 Wirkungen von 3-T ₁ AM	12
1.5.2 Biosynthese von 3-T ₁ AM	13
1.5.3 Transport von 3-T ₁ AM über Zellmembranen	15
1.5.4 Molekulare Zielstrukturen und intrazelluläre Signaltransduktion von 3-T ₁ AM	16
1.5.5 Metabolismus von 3-T ₁ AM.....	17
1.5.6 Biologische Aktivität ausgewählter 3-T ₁ AM-Metaboliten	18
1.6 Zielstellung der Doktorarbeit	19
2. MATERIAL & METHODEN	21
2.1 Material	21
2.1.1 Tiere und Tierhaltung	21
2.1.2 Zelllinien	21
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Verbrauchsmaterial	22
2.1.5 Geräte.....	22
2.1.6 Kits	23

VERZEICHNISSE

2.1.7 Antikörper und Farbstoffe.....	24
2.1.8 Programme.....	24
2.2 Tierexperimentelle Arbeiten	24
2.3 Zellbiologische Methoden	26
2.3.1 Kultivierung von PCCL3 Zellen	26
2.3.2 Experimente mit PCCL3 Zellen	27
2.3.3 Generierung funktioneller SD-Follikel aus embryonalen Stammzellen (ESC)	30
2.3.4. Experimente mit SD-Follikeln aus murinen Stammzellen	34
2.3.5 Viabilitätstest mit PCCL3 Zellen.....	34
2.3.6 Analyse von 3-T ₁ AM-Aufnahme und -Metabolismus in Thyreozyten in vitro.....	35
2.3.6.1 Extraktion von Thyronaminen und Thyroessigsäuren aus PCCL3 Zellen und Zellkulturüberständen	36
2.3.6.2 Analyse der Extrakte mittels LC-MS/MS.....	37
2.3.7 Messung des zellulären Energiestoffwechsels von PCCL3 mittels Seahorse Xfe96	39
2.3.8 Analyse intrazellulärer Signaltransduktionswege in PCCL3 Zellen	41
2.3.8.1 Analyse der intrazellulären IP ₁ -Akkumulation	41
2.3.8.2 Quantifizierung der intrazellulären cAMP-Akkumulation	41
2.3.8.3 Analyse intrazellulären freien Calciums in PCCL3 Zellen.....	42
2.4 Molekularbiologische Methoden	43
2.4.1 Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	43
2.4.2 Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Spezifität der qPCR-Produkte	48
2.4.3 Analyse des Transkriptoms von PCCL3 Zellen	49
2.5 Proteinbiochemische Methoden.....	49
2.5.1 Western Blot.....	49
2.5.2 Iodidaufnahme-Assay in PCCL3 Zellen	53
2.5.3 Aktivitätsmessung der Dio1 in PCCL3 Zellen	54
2.6 Immunhistochemische Analysen von Gewebeschnitten und in vitro Follikeln	55
2.6.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und manuelle morphologische Analysen.....	55
2.6.2 Automatisierte Erfassung der Morphologie fluoreszenzgefärbter SD-Schnitte.....	56
2.6.3 Fluoreszenzfärbung von in vitro Follikeln und Konfokalmikroskopie	57
3. ERGEBNISSE	59
3.1 Untersuchungen zum Einfluss von SDH-Metaboliten auf die SDH-Homöostase in Mäusen	59
3.1.1 Wiederholte Behandlung mit 5 mg/kg 3-T ₁ AM erhöht die 3-T ₁ AM-Serumkonzentration von Mäusen signifikant	59
3.1.2 Kein Einfluss wiederholter 3-T ₁ AM-Behandlung auf Futter- und Wasseraufnahme, Körpergewicht und Temperatur	60

VERZEICHNISSE

3.1.3 Wiederholte 3-T ₁ AM-Behandlung reduziert die mRNA-Expression einzelner SDH-Synthesegene	60
3.1.4 Wiederholte 3-T ₁ AM-Behandlung interferiert nicht mit der HPT-Achse in Mäusen	60
3.1.5 Morphologie der murinen SD nach wiederholter 3-T ₁ AM-Behandlung.....	62
3.1.6 Kein Einfluss wiederholter T ₀ AM-Injektion auf Futter- und Wasseraufnahme, Körpergewicht und Temperatur in C57BL/6 Mäusen	64
3.1.7 Der 3-T ₁ AM-Metabolit T ₀ AM reduziert die thyroideale mRNA-Expression des Tshr	65
3.1.8 Wiederholte Behandlung mit T ₀ AM supprimiert die HPT-Achse in Mäusen nicht	65
3.1.9 Morphologie der murinen SD nach 7-tägiger T ₀ AM-Behandlung	66
3.1.10 T ₃ reduziert die Expression von SDH-Synthesegenen über eine Suppression der HPT-Achse	67
3.2 In vitro Studien in der Thyreozytenzelllinie PCCL3.....	69
3.2.1 Expressionsprofil von 3-T ₁ AM-Transporterkandidaten und -metabolisierenden Enzymen in PCCL3 Zellen	70
3.2.2 Aufnahme und enzymatischer Metabolismus von 3-T ₁ AM in PCCL3 Zellen	71
3.2.3 Überprüfung der Viabilität von PCCL3 Zellen nach Inkubation mit SDH-Metaboliten	72
3.2.4 Einfluss von 3-T ₁ AM auf die TSH-abhängige Expression von Nis	73
3.2.5 Effekt von 3-T ₁ AM und 3-T ₁ AM-Metaboliten auf die Nis-vermittelte Iodidaufnahme	74
3.2.6 Effekt von 3-T ₁ AM und unterschiedlichen Depletionsprotokollen auf die Dio1-Aktivität... ..	76
3.2.7 Einfluss von 3-T ₁ AM auf die Mct8-Expression in PCCL3 Zellen	78
3.2.8 Einfluss von 3-T ₁ AM auf den zellulären Energiestoffwechsel	78
3.2.9 Analyse intrazellulärer Signalwege in Thyreozyten nach 3-T ₁ AM-Inkubation	81
3.2.9.1 Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	81
3.2.9.2 Indirekte Analyse intrazellulärer IP ₃ -Bildung.....	84
3.2.9.3 Analyse der Ampk-Aktivierung.....	84
3.2.9.4 Calcium	85
3.3 Effekte von 3-T ₁ AM in einem Modell differenzierter Thyreozyten aus primären murinen ESC. ..	87
4. DISKUSSION	89
4.1 Wahl der Dosis und Überprüfung des 3-T ₁ AM-Status im Mausmodell in vivo	89
4.2 3-T ₁ AM-Behandlung reduziert die Expression essentieller SDH-Synthesegene in Thyreozyten ..	90
4.2.1 Direkte Wirkung von 3-T ₁ AM auf Thyreozyten ohne Interferenz mit der HPT-Achse	91
4.2.2 Unveränderte Serum-SDH-Konzentration trotz verringerter Expression essentieller SDH-Synthesegene nach wiederholter 3-T ₁ AM-Behandlung	93
4.2.3 Morphologische Veränderungen der murinen SD nach wiederholter Behandlung mit 3-T ₁ AM.....	94
4.3 Überlegungen zur Möglichkeit eines Wolff-Chaikoff-Effekts nach 3-T ₁ AM-Behandlung / Kontrollversuch mit Iod-freiem T ₀ AM	96
4.3.1 Eigenes Wirkprofil wiederholter T ₀ AM-Behandlung von Mäusen	98

VERZEICHNISSE

4.4 Direkte Wirkungen von 3-T ₁ AM auf Thyreozyten in vitro	99
4.4.1 3-T ₁ AM inhibiert die Nis-Expression und -Funktion in PCCL3 Zellen.....	99
4.4.2 Potenzielle Rolle von T ₀ AM in der Vermittlung der 3-T ₁ AM-abhängigen Nis-Inhibition in vitro	100
4.4.3 3-T ₁ AM und Dio1-Aktivität in PCCL3 Zellen.....	101
4.4.4 3-T ₁ AM-abhängige Modulation des Energiestoffwechsels in PCCL3 Zellen.....	102
4.5 Intrazelluläre Signaltransduktion von 3-T ₁ AM in Thyreozyten	103
4.5.1 Keine Modulation der intrazellulären IP ₃ -Konzentration in PCCL3 durch 3-T ₁ AM.....	103
4.5.2 Keine Hinweise auf 3-T ₁ AM-abhängige Modulation der cAMP-Bildung in PCCL3	104
4.5.3 Mögliche sekundäre Aktivierung der Ampk in PCCL3 Zellen nach 3-T ₁ AM-Stimulation	106
4.5.4 3-T ₁ AM-abhängige Erhöhung der cytosolischen freien Ca ²⁺ -Konzentration in PCCL3	106
4.6 Funktionelle in vitro SD-Follikel aus murinen ESC als experimentelles System	108
4.7 Physiologische Relevanz und Ausblick	109
LITERATURVERZEICHNIS	112
PUBLIKATIONEN	XIV
DANKSAGUNG	XVI

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer murinen SD..... 2

Abbildung 2: Struktur der klassischen Schilddrüsenhormone T₃ und T₄..... 3

Abbildung 3: Schematische Darstellung von SD, SD-Follikel und SDH-Biosynthese. 6

Abbildung 4: Die HPT-Achse. 11

Abbildung 5: Biosynthese von 3-T₁AM und Entstehung biologisch aktiver 3-T₁AM-Metaboliten..... 15

Abbildung 6: Übersicht über in vivo detektierte 3-T₁AM-Metaboliten nach Injektion von 25 mg 3-T₁AM/kg Körpergewicht in C57BL/6 Mäusen..... 19

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung und Kultivierung von EB aus murinen ESC... 34

Abbildung 8: 7-tägige Behandlung mit 5 mg/kg 3-T₁AM erhöht die 3-T₁AM-Serumkonzentration in Mäusen signifikant. 59

Abbildung 9: Einfluss wiederholter 3-T₁AM-Behandlung auf die SDH-Homöostase in Mäusen..... 61

Abbildung 10: HE-Färbung muriner Schilddrüsenschnitte 3-T₁AM- und Lösungsmittel-behandelter C57BL/6 Mäuse. 62

Abbildung 11: Manuell gemessene morphologische Veränderungen der murinen SD nach wiederholter 3-T₁AM-Behandlung. 63

Abbildung 12: Automatisierte Phänotypisierung der SD-Morphologie von Mäusen nach 7-tägiger Behandlung mit 3-T₁AM. 64

Abbildung 13: Einfluss wiederholter T₀AM-Behandlung auf die SDH-Homöostase in Mäusen..... 66

Abbildung 14: Automatisierte Phänotypisierung der murinen SD-Morphologie nach wiederholter T₀AM-Behandlung. 67

Abbildung 15: Einfluss wiederholter T₃-Behandlung auf die SDH-Homöostase in Mäusen. 69

Abbildung 16: Vergleichendes Expressionsprofil 3-T₁AM-metabolisierender Enzyme und möglicher Transporter in PCCL3 Zellen. 70

Abbildung 17: Aufnahme und Metabolismus von 3-T₁AM in PCCL3 Zellen. 72

Abbildung 18: Einfluss von TSH, 3-T₁AM, T₀AM und 3-TA₁ auf die Viabilität von PCCL3 Zellen. 73

Abbildung 19: Partielle Inhibition der TSH-abhängigen Nis-Expression in PCCL3 durch 3-T₁AM. 74

Abbildung 20: Etablierung der Rahmenbedingungen für den nichtradioaktiven Iodidaufnahme-Assay mit PCCL3 Zellen..... 75

Abbildung 21: Modulation der TSH-abhängigen Nis-medierten Iodidaufnahme in PCCL3 durch verschiedene Stimulanzen nach Standard- und verlängertem Depletionsprotokoll. 76

Abbildung 22: Einfluss der Depletionsprotokolle auf die Dio1-katalysierte Deiodierung von 3-T₁AM in PCCL3 Zellen. 77

Abbildung 23: Erhöhung der Mct8-Proteinexpression durch 3-T₁AM in PCCL3 Zellen..... 78

Abbildung 24: Optimierung der Bedingungen für die Analyse des zellulären Energiestoffwechsels. .. 79

Abbildung 25: Modulation des Energiestoffwechsels von PCCL3 Zellen durch TSH. 80

Abbildung 26: Einfluss von 3-T₁AM auf die TSH-abhängige Glucoseverwertung in PCCL3 Zellen. 81

Abbildung 27: Modulation der intrazellulären cAMP-Konzentration in PCCL3 Zellen durch TSH und 3-T₁AM. 82

Abbildung 28: Funktionelles cAMP-Screening nach 3-T₁AM Rezeptorkandidaten in PCCL3 Zellen. 83

Abbildung 29: Einfluss von TSH und 3-T₁AM auf die Ampk-Phosphorylierung in PCCL3 Zellen. 85

Abbildung 30: Einfluss von 3-T₁AM auf die freie cytosolische Ca²⁺-Konzentration in PCCL3 Zellen. 86

Abbildung 31: Etablierung eines Modells funktioneller in vitro SD-Follikel aus mESC. 88

Abbildung 32: Kombinierte schematische Übersicht über 3-T₁AM-Wirkungen in vivo und in vitro mit möglichen Mechanismen. 96

Abbildung 33: Schematische Darstellung der theoretisch möglichen 3-T₁AM- und TSH-abhängigen Modulation der sekundären Botenstoffe cAMP und Ca²⁺ in Thyreozyten..... 105

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über das Verbrauchsmaterial.....	22
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Laborgeräte.	22
Tabelle 3: Verwendete Reagenziensysteme.	23
Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Farbstoffe.	24
Tabelle 5: Software und Datenbanken.....	24
Tabelle 6: Tierversuche mit C57BL/6-Mäusen.	25
Tabelle 7: Anzahl der PCCL3 Zellen pro well in unterschiedlichen Formaten für Experimente.....	28
Tabelle 8: TSH- und 3-T ₁ AM-Stimulationsschema für Experimente mit PCCL3 Zellen.....	29
Tabelle 9: Übersicht über die Beladung der Drug Injection Ports im Seahorse Experiment.	40
Tabelle 10: Physiologische Parameter nach wiederholter Behandlung mit 3-T ₁ AM.	60
Tabelle 11: Physiologische Parameter nach wiederholter Behandlung mit T ₀ AM.	65
Tabelle 12: Physiologische Parameter in Mäusen nach wiederholter Behandlung mit T ₃	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewicht pro Volumen in %
°C	Grad Celsius
3,5-T ₂	3,5- Diod-L-Thyronin
3-T ₁ AM	3-Iodthyronamin
3-TA ₁	3-Iodthyroessigsäure
AADC	aromatische L-Aminosäure Decarboxylase
Abb	Abbildung
Ac	Adenylatzyklase
Adra2a	adrenerger Rezeptor 2alpha
AHDS	Allan-Herndon-Dudley-Syndrom
AMP	Adenosinmonophosphat
Ano1	Anoctamin 1
ApoA1	Apolipoprotein A1
ApoB100	Apolipoprotein B100
ATP	Adenosintriphosphat
BCTC	4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazin-carboxamid
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches AMP
cDNA	komplementäre DNA
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CRE	cAMP responsives Element
CREB	cAMP response element binding protein
Ct	cycle of treshold
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat

VERZEICHNISSE

Dio	Deiodase
DIT	3,5-Diiodtyrosin
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
Duox	NADPH-abhängige Dual Oxidase
EB	<i>Embryoid body</i>
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunoassay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ESI	Elektrospray-Ionisierungsmodus
FCCP	Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	fetales Kälberserum
FSK	Forskolin
ft ₃ / ft ₄	freies/nicht-Protein gebundenes T ₃ /T ₄
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H5	Kombination aus 5 Hormonen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse
HRP	Meerrettichperoxidase
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Ipro	Iproniazid
Isop	Isoprenalin
KRP	Krebs-Ringer-Puffer
Lat	L-Typ Aminosäure Transporter
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
L-Dopa	3,4(OH) ₂ -Phenylalanin
LIF	Leukemia inhibitory factor
Mao	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
Mct	Monocarboxylattransporter
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mESC	Murine embryonale Stammzellen
MIT	3-Monoiodtyrosin
MMI	Methimazol
MOPS	Formaldehyd-3-(<i>N</i> -morpholino)propansulfonsäure

VERZEICHNISSE

MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
mRNA	Messenger RNA
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	Tetrazoliumsals
n.s.	nicht signifikant
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
Nis	Natrium-Iodid-Symporter
Norepi	Norepinephrin
Oatp	organisches Anionen-Transportprotein
OCR	Oxygen Consumption Rate
OD	optische Dichte
Odc	Ornithindecaboxylase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pde	Phosphodiesterase
Pea	Phenylethylamin
Pepck	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Pka/b/c	Proteinkinase A/B/C
Plc	Phospholipase C
PTU	Propylthiouracil
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RA	Retinsäure
rhTSH	rekombinantes humanes TSH
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/min
RQ	respiratorischer Quotient
RT	Raumtemperatur
rT ₃	reverses 3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
RXR	Retinoid X Rezeptor
s.c.	subkutan
SD	Schilddrüse
SDH	Thyronin, Schilddrüsenhormon
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	solute carrier
Sult	Sulfotransferase
T ₃	3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
T ₄	3,3',5,5'-Tetraiod-L-Thyronin/Thyroxin
TA	Thyroessigsäure
Taar	trace-amine associated receptor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAM	Thyronamin

VERZEICHNISSE

TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TBME	tert-Butylmethylether
Tg	Thyroglobulin
TH	thyroid hormone (SDH)
Tpo	Thyreoperoxidase
TRE	SDH-responsives Element
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
Triac	3,3',5-Triiodothyroessigsäure
TR α	Schilddrüsenhormonrezeptor alpha
TR β	Schilddrüsenhormonrezeptor beta
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
tT ₃ / tT ₄	totales/Protein gebundenes T ₃ /T ₄
TTR	Transthyretin
β -ME	beta-Mercaptoethanol

Die Schreibweise von Genen und Proteinen erfolgte mit Ausnahme von TSH und TRH wie am Beispiel des Trace amine associated receptor (Taar) gezeigt:

	Protein	Gen
human	TAAR	<i>TAAR</i>
murin	Taar	<i>Taar</i>

Da sich die in dieser Arbeit konzipierten Experimente auf Ratte und Maus beziehen, wurden im Text hauptsächlich murine Schreibweisen verwendet, ausgenommen, wenn zitierte Publikationen speziell nur im humanen Kontext vorliegen.

ZUSAMMENFASSUNG

3-Iodthyronamin (3-T₁AM) ist ein in Menschen und Nagern endogener Schilddrüsenhormon (SDH)-Metabolit, der in murinem Darmgewebe durch Decarboxylierung und Deiodierung aus T₄ gebildet werden kann. Die einmalige Injektion von 50 mg/kg 3-T₁AM führt unter anderem zu Bradykardie und Hypothermie in Mäusen und Hamstern. Diese Effekte sind den Wirkungen eines Überschusses an klassischem SDH T₃ entgegengesetzt. Es wurde außerdem gezeigt, dass dieselbe 3-T₁AM-Dosis in Ratten Plasma T₄ und TSH supprimiert, also mit der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT)-Achse interferiert. Die Hypothese dieser Doktorarbeit ist, dass 3-T₁AM durch direkte Wirkung auf die Schilddrüse (SD) an der Feinregulation der SDH-Homöostase beteiligt ist. Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden 7 d lang täglich 5 mg/kg 3-T₁AM oder die entsprechende Lösungsmittelmenge intraperitoneal appliziert. Die mRNA-Expression der SDH-Synthesegene Natrium-Iodid-Symporter (Nis), Thyreoglobulin und Pendrin waren nach 3-T₁AM-Behandlung vermindert, was potenziell zu eingeschränkter SDH-Biosynthese führen kann. Eine Beteiligung der HPT-Achse konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies wurde an unveränderter Expression T₃-responsiver Gene, die in die Regulation der HPT-Achse involviert sind, und unveränderten SDH-Serumkonzentrationen festgemacht. Eine funktionelle Auswirkung der 3-T₁AM-Behandlung auf die SD trotz unveränderter zirkulierender SDH im Serum wurde in der Vergrößerung der SD-Follikellumina sichtbar. Versuche mit dem Iod-freien 3-T₁AM-Metaboliten T₀AM zeigen, dass dieser unter gleichen Behandlungsbedingungen ein eigenes Wirkprofil in Mäusen besitzt, jedoch auch thyroideale Genexpression und Morphologie beeinflusst. *In vitro* Studien in PCCL3 Rattenthreozyten ergänzen die Befunde der Mausstudien. 3-T₁AM wird von PCCL3 Zellen aufgenommen und verstoffwechselt. Die entstandenen Metaboliten T₀AM und 3-Iodthyroessigsäure (3-TA₁) wurden von den Zellen in das Zellkulturmedium sezerniert. Sowohl Nis-Expression als auch Funktion in Form von Iodidaufnahme wurden durch 3-T₁AM in PCCL3 Zellen vermindert. Auch eine partielle Inhibition der Dio1-Aktivität, sowie der Glucoseverwertung wurden beobachtet. Mechanistisch konnte 3-T₁AM-Signalgebung über adrenerge oder Taar1-vermittelte cAMP-Modulation in diesem Modell weitgehend ausgeschlossen werden, während ein starker 3-T₁AM-abhängiger Anstieg intrazellulären Calciums beobachtet wurde. T₀AM könnte den inhibitorischen Effekt von 3-T₁AM auf Nis in PCCL3 Zellen (teilweise) vermitteln. Zusammenfassend hat 3-T₁AM das Potenzial auf

ZUSAMMENFASSUNG

mehreren Ebenen mit der SDH-Biosynthese zu interferieren und so die SDH-Homöostase durch direkte Wirkung auf die SD zu regulieren. Ein *in vitro* Modell funktioneller SD-Follikel aus murinen embryonalen Stammzellen, das 2012 entwickelt wurde, wurde im Rahmen der Doktorarbeit erlernt und im Labor etabliert. In diesem Modell soll in zukünftigen Studien die direkte Wirkung von 3-T₁AM auf die SDH-Biosynthese untersucht werden.

ABSTRACT

3-Iodothyronamine (3-T₁AM) is an endogenous thyroid hormone (TH) metabolite in humans and rodents, which can be formed in murine intestinal tissue by decarboxylation and deiodination from T₄. A single injection of 50 mg/kg 3-T₁AM leads to bradycardia and hypothermia in mice and Djungarian hamsters. These effects are opposite to the effects of an excess of the classic TH T₃. It has also been demonstrated that the same 3-T₁AM dose suppresses plasma T₄ and TSH in rats, indicating interference with the hypothalamus pituitary thyroid (HPT) axis. The hypothesis of this doctoral thesis is that 3-T₁AM is involved in the fine tuning of the TH homeostasis by direct action on the thyroid gland. Male C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with 5 mg/kg 3-T₁AM or the corresponding amount of solvent for 7 d daily. The mRNA expression of the TH synthesis genes sodium iodide symporter (Nis), thyroglobulin, and pendrin were reduced after 3-T₁AM treatment, potentially leading to reduced TH biosynthesis. However, no involvement of the HPT axis was observed. This was attributed to unchanged expression of T₃ responsive genes involved in the regulation of the HPT axis and unaltered TH serum concentrations. A functional effect of 3-T₁AM treatment on the thyroid despite unchanged circulating TH was observed in the enlargement of thyroid follicular lumina. Experiments with the iodine-free 3-T₁AM metabolite T₀AM show that the latter exerts its own activity profile in mice under the same treatment conditions, but also affects thyroid gene expression and morphology. The findings of the mouse studies were complemented with *in vitro* studies in PCCL3 rat thyrocytes. 3-T₁AM is taken up by PCCL3 cells and is intracellularly metabolized. The resulting metabolites T₀AM and 3-iodothyroacetic acid (3-TA₁) were secreted from the cells into the cell culture medium. Both, Nis expression and function in the form of iodide uptake were reduced by 3-T₁AM in PCCL3 cells. A partial inhibition of Dio1 activity as well as glucose utilization were also observed. Mechanistically, 3-T₁AM signaling via adrenergic or Taar1-mediated cAMP modulation could be largely excluded in this model, whereas a strong 3-T₁AM-dependent increase in intracellular calcium was observed, which needs to be further characterized. T₀AM could (partially) mediate the inhibitory effect of 3-T₁AM on Nis in PCCL3 cells. In summary, 3-T₁AM has the potential to interfere with the TH biosynthesis machinery at several levels and thus regulate the TH homeostasis by direct action on the thyroid gland. An *in vitro* model of functional thyroid follicles from murine embryonic stem cells, which was

ABSTRACT

published in 2012, was implemented within the framework of the doctoral thesis and established in the laboratory. In this model, the direct effect of 3-T₁AM on TH biosynthesis will be investigated in future studies.

1. EINLEITUNG

Die Schilddrüsenhormone (SDH) 3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin (T₄) und 3,5,3' -Triiod-L-thyronin (T₃) sind in nahezu alle biologischen Prozesse involviert, die Wachstum, Entwicklung und Stoffwechsel regulieren. Die adäquate Versorgung des Organismus mit SDH muss daher durch komplexe Regulationsmechanismen kontrolliert werden. Die umfassende physiologische Bedeutung der SDH zeigt sich unter anderem im Auftreten von kognitiven Defiziten (1), metabolischer Dysfunktion (2) und Störungen in Skelettentwicklung und -Umbau (3) im Rahmen zu hoher (Hyperthyreose) oder zu geringer (Hypothyreose) Versorgung von Zielgeweben mit SDH, sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Organismus. Schilddrüsen (SD)-Dysfunktion, bedingt durch gestörte Synthese, Aufnahme, Transport, Metabolismus oder Wirkung von SDH, ist eines der häufigsten endokrinen Krankheitsbilder (4). Es ist daher notwendig, die genauen molekularen Mechanismen zu verstehen, die der SD-Entwicklung und -Funktion sowie der Erhaltung der SDH-Homöostase zugrunde liegen. Dabei muss auch die Rolle neuer SDH-Metaboliten wie den Thyronaminen aufgeklärt werden, bei denen es sich um decarboxylierte SDH-Metaboliten mit teilweise SDH-antagonistischen Wirkungen handelt (5). Dazu soll die vorliegende Doktorarbeit einen Beitrag leisten.

1.1 Schilddrüsenhormonbiosynthese

Die Biosynthese der SDH findet in den funktionellen Einheiten der SD, den Follikeln, statt. Diese sind aufgebaut aus einer einlagigen Thyreozyten-Epithelschicht, die kugelartig das Lumen der Follikel umgibt ((6) und Abb. 1). Das Lumen ist gefüllt mit Kolloid, einer gallertartigen Substanz, deren Hauptbestandteil das intrazellulär produzierte (7) und dann ins Lumen sezernierte Thyreoglobulin (Tg) ist (8, 9). Die Thyreozyten des Follikelepithels sind polarisiert. Ihre apikale Seite ist dem Lumen der Follikel zugewandt, während die basale Seite in Kontakt zu den in der SD abundanten Blutgefäßen steht. Neben den Thyreozyten findet man in der SD auch die Calcitonin-produzierenden Parafollikulärzellen (C-Zellen), die an der Regulation des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels beteiligt sind (10), auf die in dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen werden soll.

EINLEITUNG

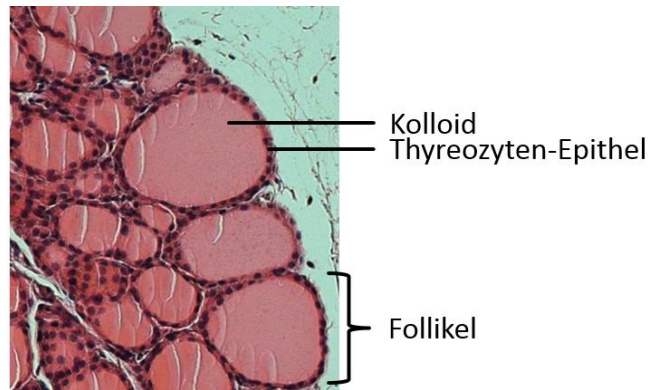


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer murinen SD.

Schnitte der SD einer C57BL/6 Maus wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um das Thyreozytenepithel, dessen Zellkerne sowie die Follikellumina sichtbar zu machen.

Die SDH-Synthese *per se* spielt sich größtenteils im Kolloid ab. Die SDH enthalten 4 (T_4) bzw. 3 (T_3) Iodatome (Abb.2). Für die SDH-Biosynthese muss demnach zunächst Iodid bereitgestellt werden (Abb. 3). Über den in Thyreozyten basolateral exprimierten Natrium-Iodid-Symporter (Nis) wird Iodid aus dem Blut bis zu 40fach in den Thyreozyten angereichert (11). Der Transport eines Iodid-Ions erfolgt parallel mit 2 Natrium-Ionen und wird angetrieben durch den Konzentrationsgradienten, den die Natrium-Kalium-ATPase generiert (12). Um organifiziert, also an Tyrosinreste im Tg-Molekül gebunden zu werden, muss das Iodid zunächst weiter in das Follikellumen transportiert werden. Dies vermitteln apikale Membrantransporter. Einer der Kandidaten für den apikalen Iodidtransporter in Thyreozyten ist der Thyreotropin (TSH)-abhängig exprimierte Chloridtransporter Pendrin (Pds, *Slc26a4*) (13). Für eine entscheidende Rolle Pds' in der SDH-Biosynthese spricht, dass Pendred Syndrom Patienten, die eine Mutation im *PDS* Gen besitzen, eine Struma entwickeln. Diese wird wahrscheinlich durch eine gestörte SDH-Biosynthese verursacht, die aus dem verminderten Iodidtransport und dem partiellen Iodid-Organifizierungsdefekt resultiert (14, 15). Die Alleinstellung von Pendrin in der apikalen Iodidtransportfunktion des Thyreozyten wird durch den fehlenden SD-Phänotyp in *Slc26a4*-Null-Mäusen in Frage gestellt (16). Ein weiterer Kandidat für den apikalen Iodidtransport des Thyreozyten ist Anoctamin (Ano1/Tmem16A), dessen Rolle im Iodidtransport in das Follikellumen kürzlich publiziert wurde (17-19). Die Organifizierung des in das Lumen aufgenommenen Iodids wird von der Thyreoperoxidase (Tpo) unter Verbrauch von H_2O_2 im Follikellumen katalysiert (20). Das dafür erforderliche H_2O_2 wird von der membranständigen Dual Oxidase 2 (Duox2) generiert, die mit der Tpo kolokalisiert ist (21-23). Ein oder zweifach iodierter Tyrosinreste am Tg (Monoiodtyrosin / Diodtyrosin) werden dann, ebenfalls unter Katalyse der Tpo, zu T_3 oder T_4

gekoppelt ((24, 25) und Abb. 3). Das die SDH enthaltende Tg wird nach Cathepsin-abhängiger Solubilisierung über Endozytose wieder in Thyreozyten aufgenommen und durch Cathepsine weiter prozessiert (26, 27). Dabei werden T₄ und T₃ aus dem Tg-Molekül freigesetzt und können anschließend über den SDH-Transporter Monocarboxylattransporter 8 (Mct8) sezerniert werden (28). Ist ein Organismus adäquat mit Iodid versorgt, sezerniert die SD überwiegend das Prohormon T₄ (29, 30), welches in den Zielgeweben durch Deiodasen (Dio) zum aktiveren T₃ deiodiert wird (31). Circa 80% des zirkulierenden T₃ entstehen durch Deiodierung von T₄ (29).

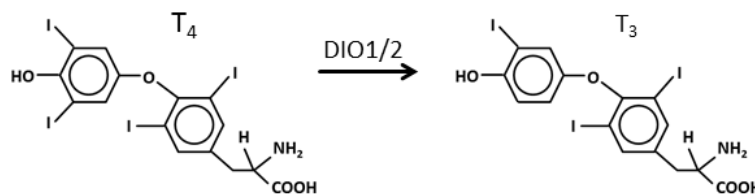


Abbildung 2: Struktur der klassischen Schilddrüsenhormone T₃ und T₄.

Das Prohormon T₄ wird durch 5'-Deiodierung unter Katalyse der Dio1 oder Dio2 zum aktiven T₃ umgewandelt.

1.2 Regulation der Schilddrüsenhormonbiosynthese

1.2.1 Thyreotropin (TSH) und TSH-Rezeptor nachgeschaltete Signalwege

Der Hauptregulator der Thyreozytenfunktion ist das Thyroidea stimulierende Hormon oder Thyreotropin (TSH), das von thyrotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und sezerniert wird. TSH ist ein Glycoproteohormon, das aus einer für das TSH spezifischen β -Untereinheit und einer den Glycoproteohormonen gemeinsamen α -Untereinheit besteht (32). Der TSH-Rezeptor (Tshr) ist ein heptahelikales Transmembranprotein, das an G-Proteine koppelt. Die Aktivierung des Tshr durch TSH initiiert 2 intrazelluläre Signaltransduktionswege, den cAMP-Pka und den Plc-IP₃/DAG-Signalweg (33, 34). Um den Plc-IP₃/DAG Weg zu aktivieren, sind jedoch 5-10-mal höhere TSH-Konzentrationen nötig als für die Anschaltung des cAMP-Pka-Weges (33, 34). Koppelt der Tshr an ein stimulatorisches G-Protein (Gs), aktiviert dies Adenylatcyclasen (Ac) und die intrazelluläre Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wird erhöht. Dies wiederum aktiviert die Proteinkinase A (Pka), die das cAMP *response element binding protein* (Creb) phosphoryliert. Creb bindet als Dimer an cAMP responsive Elemente (Cre) im Promotor von Zielgenen, deren Transkription folglich reguliert wird (35). Der zweite dem Tshr nachgeschaltete Signalweg beginnt mit der Aktivierung der Phospholipase C (Plc) über ein Gq-Protein. Diese katalysiert

die Spaltung des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ öffnet durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum (ER) Liganden-abhängige Ca²⁺-Kanäle und erhöht damit die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration. DAG verbleibt in der Membran und aktiviert dort die Proteinkinase C (Pkc) (36).

1.2.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-SD-Achse (HPT-Achse)

Im klassischen Konzept der Hypothalamus-Hypophysen-SD (HPT)-Achse steht das die SDH-Biosynthese stimulierende TSH unter positiver Kontrolle von hypothalamischem Thyreotropin *releasing* Hormon (TRH). TRH und TSH selbst werden in einer negativen Rückkopplungsschleife durch SDH supprimiert (Abb. 4).

Thyreotropin *releasing* Hormon (TRH): TRH ist ein Peptidhormon (L-Pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid), das im Hypothalamus aus dem Vorläuferprotein prepro-TRH gebildet und in einem zirkadianen Rhythmus mit zusätzlichen ultradianen Freisetzungsspitzen sezerniert wird. Verschiedene hypothalamische Nuclei synthetisieren TRH. Für die Kontrolle der hypophysären TSH Freisetzung sind die hypophysotropen Neurone im paraventriculären Nucleus (PVN) verantwortlich (37, 38). Die Axone dieser Neurone projizieren in die *Eminentia mediana*, einem Neurohämalorgan im Hypophysenstiel, wo TRH nach Membrandepolarisierung über einen Ca²⁺-abhängigen Mechanismus (39) sezerniert wird und über die Portalvenen zum Hypophysenvorderlappen gelangt. Dort vermittelt es seine Wirkung über den TRH-Rezeptor (Trhr1) (40). Die Bioverfügbarkeit des TRH für die Signalweiterleitung an der Hypophyse wird durch SDH auf verschiedenen Ebenen negativ reguliert (Abb. 4). Der Promotor des *Trh*-Gens enthält negative SDH-responsive Elemente (TRE) (41), über die die TRH-Genexpression gehemmt wird (42). Der wichtigste SDH-Rezeptor (TR) für die Verminderung der TRH-Expression durch T₃ ist die Isoform TRβ₂ (siehe 1.3.2 und 1.4.2; (43)). Zusätzlich zur transkriptionellen Regulation wird die TRH-Biosynthese durch T₃ auch auf posttranslationaler Ebene gehemmt (44, 45). T₃ inhibiert außerdem die Genexpression des *Trhr* in thyrotrophen Hypophysenzellen (46). Eine weitere Ebene der Regulation stellt die mRNA des hypophysären TRH-abbauenden Enzyms Pyroglutamylpeptidase II (oder TRH *degrading ectoenzyme*, Trhde) dar (47, 48), die durch T₃ hochreguliert wird, was die Bioverfügbarkeit des TRH im hyperthyreoten Zustand zusätzlich senkt (49). Neben der negativen Regulation durch SDH wird die TRH-Expression durch TRH selbst (50, 51), aber auch durch externe

EINLEITUNG

Stressoren reguliert. Eine negative Energiebilanz beispielsweise durch Fasten verringert die TRH-Expression in Nagern über eine verminderte Leptin-Konzentration im Serum (52, 53). Umstände erhöhten Energieverbrauchs wie Kälteexposition erhöhen die *Trh*-mRNA im PVN mit der Folge von erhöhter TRH- und TSH-Freisetzung, also einer Aktivierung der HPT-Achse (54, 55). Interessanterweise greift die normale HPT-Regulation in Form einer TRH-Suppression durch SDH im Falle der Kälteexposition nicht (54).

Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH): TRH reguliert Synthese, Sekretion und biologische Aktivität des TSH (56). Die TSH-Synthese in der Hypophyse wird TRH-abhängig über eine Steigerung der *Tsha*- und *Tshb*-mRNA Mengen vermittelt (57). TSH wird außerdem TRH-abhängig posttranslational glykosyliert. Dies erhöht die biologische Aktivität des TSH (56, 58). Neben der positiven Stimulation von TSH durch TRH wird TSH durch SDH supprimiert (Abb. 4). Die negative Rückkopplung der SDH auf die TSH-Regulation wird über den SDH-Rezeptor TR β 2 vermittelt (siehe 1.3.2 und 1.4.2). Im Promotor von *Tshb* befinden sich TRE-Strukturen, die durch Bindung des T₃-Rezeptorkomplexes negativ auf die Genexpression wirken; wie bei der TRH-Suppression durch SDH spielt auch hier der TR β 2 die entscheidende Rolle (43, 59, 60). TSH wird pulsatil im 2-stündigen Rhythmus sezerniert; dieser Rhythmus scheint TRH-unabhängig zu sein (61). Zusätzlich unterliegt die TSH-Sekretion einem zirkadianen Rhythmus bei dem die Frequenz und Stärke der pulsatilen Freisetzungsspitzen vom Morgen zum Abend zunehmen (62, 63).

SDH-Bindeproteine: Da SDH im Serum an Proteine gebunden sind, die die Menge der freien für die Zielgewebe verfügbaren Hormone stabilisieren, ist die Reaktion der HPT-Achse verzögert (64). Zu den Bindeproteinen zählen das hochaffine Thyroxin-bindende Globulin (TBG) sowie die Bindeproteine mit hoher Kapazität – Transthyretin (TTR) und Albumin. 99,97% des zirkulierenden T₄ liegen gebunden vor. Davon sind im Menschen ca. 75% an TBG gebunden, 15% an TTR und der Rest an Albumin (64). Die Konzentrationsangabe von SDH im Serum kann deshalb auf 2 Arten erfolgen: in Form der totalen Konzentration (tT₃ und tT₄), die freies und gebundenes Hormon beinhaltet oder als freie Konzentration (fT₃ und fT₄), die sich nur auf das ungebundene Hormon bezieht. Die humane Serumkonzentration liegt für tT₃ bei 1-3 nM (65) und für tT₄ ca. 60fach höher bei 58-160 nM (66, 67). Typische freie Serumkonzentrationen liegen im Menschen für T₃ bei ca. 3-7 pM und für T₄ bei ca. 10-20 pM (65, 68, 69).

EINLEITUNG

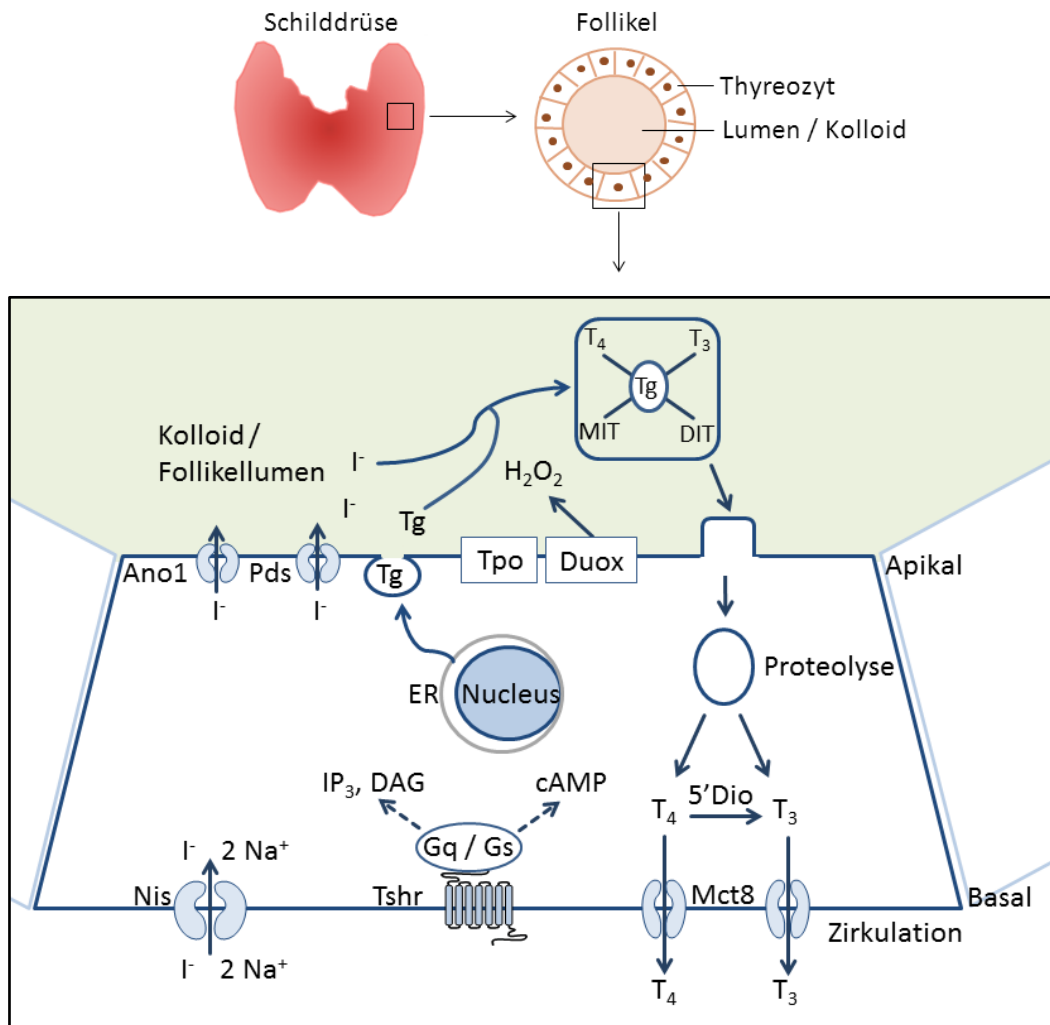


Abbildung 3: Schematische Darstellung von SD, SD-Follikel und SDH-Biosynthese.

Tg: Thyreoglobulin, Mct8: Monocarboxylattransporter 8, Nis: Natrium-Iodid-Symporter, Tpo: Thyroperoxidase, Dio: Deiodase, Pds: Pendrin, Ano: Anoctamin, MIT: Monoiodtyrosin, DIT: Diodtyrosin.

1.2.3 Autoregulation der SDH-Synthese durch Iodid – Wolff-Chaikoff-Effekt

Für die SDH-Biosynthese ist Iodidversorgung über die Nahrung essentiell. Starker Iodmangel kann zu Strumabildung und Ausbildung einer Hypothyreose führen (70). Aber auch ein Überschuss an Iodid wirkt sich advers auf die SDH-Biosynthese aus. Wolff und Chaikoff beschrieben 1948, dass die Organifizierung von Iodid in der SD von Ratten gehemmt wird, wenn die Iodidkonzentration im Plasma eine kritische Grenze überschreitet (71). Der nach ihnen benannte Wolff-Chaikoff-Effekt erwies sich in nachfolgenden Studien als transient. Es wurde beobachtet, dass sich die SD offenbar an einen andauernden Iodidüberschuss adaptieren und die Organifizierung von Iodid wieder aufnehmen konnte (72). Die Existenz des Wolff-Chaikoff-Effekts konnte auch in hyper- und euthyreoten Menschen dargestellt werden (73-75). Sowohl der Mechanismus der gehemmten SDH-Synthese als auch der des Adaptationsprozesses sind nicht vollständig aufgeklärt. Eine Reduktion der Iodidaufnahme

durch die verminderte Expression des Nis ist aber als ein entscheidender Faktor identifiziert, der die SD-Funktion unter Iodidüberschuss normalisiert (76, 77).

1.3 Wirkungen und Wirkmechanismen der SDH

1.3.1 Biologische Wirkungen von SDH

SDH sind in die Regulation einer Vielzahl von physiologischen Prozessen involviert und beeinflussen damit unter anderem Energiestoffwechsel, Körpergewicht, Körpertemperatur und kardiovaskuläre Funktion, sind aber auch bei der Gehirnentwicklung von essentieller Bedeutung.

Die Rolle von SDH in der Regulation des Energiestoffwechsels ist komplex und beinhaltet Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. So stimuliert T_3 die Gluconeogenese und die Glycolyse sowie die Glycogensynthese und die Glycogenolyse (78). T_3 stimuliert die Gluconeogenese beispielsweise über eine Induktion der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pepck) via TR β (79, 80). Der Lipidstoffwechsel wird durch SDH insofern beeinflusst, dass sie die hepatische Cholesterolsynthese stimulieren, hepatischen Cholesterolabbau zu Gallensäuren steigern und die Aufnahme von Cholesterol aus dem Serum erhöhen (81). Letzteres wird beispielsweise über eine Hochregulation des LDL Rezeptors und des Apolipoproteins A1 (ApoA1) vermittelt (2, 82, 83). Erhöhte SDH-Serumwerte resultieren in verminderten Serumcholesterolverwerten. SDH stimulieren Lipolyse von Speicherfett und Liponeogenese in der Leber. Letztere kann durch Induktion der Transkriptionsfaktoren *Sterol regulatory element binding protein (SREBP)1c*, *Liver X receptor (LXR)* und *Carbohydrate response element binding protein (CHREBP)*, aber auch durch direkte Induktion von Enzymen wie Spot 14, Malic Enzyme und ACC erfolgen (81). Erhöhte SDH-Konzentrationen führen netto jedoch zu Fettverlust (2). Der Grundumsatz in Menschen wird durch SDH gesteigert (84, 85). Die oben genannten Prozesse des Energiestoffwechsels tragen zum Grundumsatz bei. Dieser wird außerdem T_3 -abhängig über die Erhaltung von Ionengradienten wie dem Na^+/K^+ -Gradienten über die Zellmembran sowie dem Ca^{2+} -Gradienten zwischen Cytosol und sarkoplasmatischem Retikulum vermittelt, was die gesteigerte Hydrolyse von ATP zur Folge hat (2, 86, 87). Über die Regulation des Grundumsatzes beeinflussen SDH das Körpergewicht maßgeblich. Körpertemperaturregulation durch T_3 erfolgt durch fakultative Thermogenese über die Veränderung der metabolischen Rate. Die exakten Mechanismen, die diese Wirkung vermitteln, sind nicht vollständig geklärt, da es sich um ein Zusammenspiel von

Abläufen in unterschiedlichen Organen handelt. In Nagern regulieren SDH dies über die Aktivität von braunem Fettgewebe. In Menschen könnte vor allem Muskelgewebe diese Funktion übernehmen. Beispielsweise wurde in einer Humanstudie von Clement *et al.* gezeigt, dass die metabolische Rate und mitochondriale Marker im Skelettmuskel nach T₃-Gabe erhöht sind (85). Das kardiovaskuläre System ist ein klassisches Ziel der SDH-Wirkung, dies fällt besonders im Rahmen von Hyper- und Hypothyreose auf (88). So steigerte die tägliche T₃-Gabe Herzrate und systolischen Blutdruck in Probanden innerhalb von 2 Wochen signifikant (85). Wie das Allan-Herndon Dudley Syndrom (AHDS) exemplarisch verdeutlicht, sind SDH für die Entwicklung und Funktion des Gehirns unabdingbar. SDH-Mangel während der Gehirnentwicklung kann je nach Dauer, Ausmaß und Zeitpunkt irreversible Schäden des Gehirns bewirken (89). Auch SDH-Mangel im adulten Organismus beeinträchtigt die Gehirnfunktion, in der Regel sind diese Einflüsse aber reversibel durch Gabe von T₄ (89).

1.3.2 Direkte Wirkung auf die Genexpression durch Aktivierung von SDH-Rezeptoren (TR)

Eine Vielzahl von SDH-Wirkungen wird über SDH-Rezeptoren (TR) vermittelt (90, 91). TR gehören zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren. Sie besitzen eine DNA-Bindedomäne, eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne und eine Dimerisierungsdomäne (92). Im klassischen bekannten Konzept regulieren TRs die Genexpression als Transkriptionsfaktoren über die Bindung an SDH-responsive Elemente (TRE) in Zielgenen. Die meisten charakterisierten SDH-Zielgene besitzen „positive“ TREs im Promotor (93). Ist der an ein positives TRE gebundene TR nicht mit dem Liganden besetzt, so bindet er einen Co-Repressorkomplex, der die Transkription des Gens unterdrückt. Bindet T₃ an den TR durchläuft dieser eine Konformationsänderung, die den vorher gebundenen Co-Repressorkomplex durch einen Co-Aktivorkomplex ersetzt und die Transkription des Gens induziert (92). Ein Beispiel für negative TREs statuieren die TREs in HPT *Feedback* Genen wie *Tshb* und *Trh*, die unter negativer Kontrolle von T₃ stehen (93). TRs binden bevorzugt als Heterodimere an TREs, vor allem in Kombination mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR). Der RXR erhöht dabei die Stabilität der TR-DNA Bindung (92). Es existieren zwei unterschiedliche TR Isoformen – TR α und TR β (94). Von beiden Isoformen existieren mehrere Spleißvarianten, von denen die TR α 2-Variante keine SDH binden kann (92). Gehirn, Skelettmuskel, weißes Fettgewebe und Myocard exprimieren bevorzugt TR α 1 (95). Typische TR β 1 dominierte Gewebe sind Leber

und Niere. TR β 2 wurde nur in Hypophysenvorderlappen, Hypothalamus, Cochlea und Retina detektiert. In braunem Fettgewebe sind TR α - und - β -Expression nachweisbar (2, 95).

1.3.3 Weitere Wirkmechanismen von SDH

Neben der direkten Beeinflussung der Genexpression durch SDH-besetzte TRs wurde eine Reihe von anderen Wirkmechanismen für SDH aufgezeigt. So wird beispielsweise die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-kinase (PI3K) durch den Ligand-besetzten TR aktiviert (96). Dies aktiviert nachgeschaltet die Proteinkinase B (Pkb/Akt), *mammalian target of rapamycin* (mTor) und p70 S6Kinase (p70S6K), was unter anderem in der Regulation von Genen des Glucosemetabolismus resultiert (96, 97). SDH können aber auch ohne direkte Bindung an TRs Kinase-Signalwege anschalten. Binden SDH an das Plasmamembranprotein Integrin $\alpha\beta$ 3 aktiviert dies den PI3K- und den *extracellular regulated kinase* (ERK) 1/2 *mitogen activated protein kinase* (MAPK) Signalweg (98). Interessanterweise ist das am TR wenig aktive T₄ am Integrinrezeptor aktiv. Integrin $\alpha\beta$ 3 hat zwei Bindestellen für SDH (99). S1 bindet nur T₃ und aktiviert PI3K, was zur Translokation des TR α in den Nukleus und zur verstärkten Transkription des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF)1 α führt. Die zweite Bindestelle S2 bindet T₃ und T₄. Die Aktivierung des Rezeptors über diese Bindestelle resultiert in ERK1/2 Phosphorylierung, welche beispielsweise an der Krebszellproliferation beteiligt ist. Die Aktivierung von ERK1/2 über S2 führt letztendlich zur Translokation von TR β 1 in den Nukleus (99). Weitere T₃-stimulierte Phosphorylierungskaskaden wurden demonstriert. Beispielsweise wurde die T₃-abhängige Initiation der MAPK-Kaskade, die die p38 MAPK aktiviert, in mehreren Studien *in vitro* und *in vivo* beschrieben (100, 101). Weiterhin spielt die Regulation der AMP-aktivierten Proteinkinase (Ampk)-Aktivität durch T₃ eine Rolle bei der Vermittlung der T₃-Wirkung im Energiestoffwechsel (101, 102).

1.4 Regulation der SDH-Wirkung

1.4.1 SDH-Transport über Membranen

Der Transport von SDH in Zielgewebe und Zielzellen erfolgt nicht wie lange angenommen durch passive Diffusion, sondern benötigt membranständige Transporterproteine, die die Translokation über die Plasmamembran ermöglichen (103). Eine Reihe von Transportern, die den Klassen Organo-Anion-Transporter (Oatp), System-L-Aminosäuretransporter (Lat) und Monocarboxylattransporter (Mct) angehören, wurde beschrieben. Die meisten sind nicht

spezifisch für SDH und transportieren auch andere Moleküle. Eine Ausnahme bildet der SDH-spezifische Monocarboxylattransporter 8 (Mct8, *Slc16a2*), der 2003 identifiziert und charakterisiert wurde (104). Mutationen im humanen (h)*MCT8*-Gen sind mit einem neurologischen Phänotyp, dem AHDS, assoziiert (105, 106). AHDS-Patienten weisen intellektuelle Defizite, neuromotorische Einschränkungen und veränderte Serum-SDH-Konzentrationen auf (105). Trotz mildem Serum-SDH-Phänotyp haben die Patienten starke neurologischen Schäden, die auf mangelnde Versorgung des Gehirns während der Embryonalentwicklung mit SDH aufgrund eingeschränkter MCT8-Transportfunktion zurückzuführen sind (105-108). Dieses Krankheitsbild zeigt exemplarisch, dass SDH-Transporter essentiell für die Bioverfügbarkeit der Hormone innerhalb des Zielgewebes sind. Auch für den Export der SDH aus Zellen heraus sind Transporter nötig. Als Beispiel sei hier der Transport aus der SD in den Blutkreislauf angeführt, der ebenfalls von Mct8 vermittelt wird (28).

1.4.2 Abundanz von SDH-Rezeptoren

Auf molekularer Ebene wird die SDH-Homöostase von Geweben und Zellen über die Expression und Funktion von nukleären SDH-Rezeptoren (TR) beeinflusst, über die SDH die Transkription von Zielgenen regulieren (siehe 1.3.2). Die entscheidende Rolle der TRs in der Vermittlung des SDH-Signals zeigt sich besonders deutlich im klinischen Erscheinungsbild von Patienten, die eine SDH-Resistenz aufgrund einer TR-Genmutation aufweisen (95, 109). Charakteristisch für Patienten, die eine TR β -Mutation aufweisen, sind erhöhte Serumkonzentrationen von SDH bei gleichzeitig fehlender Suppression der TSH-Sekretion, bedingt durch fehlende TR β -vermittelte Rückkopplung in der Hypophyse (109).

Der Phänotyp der von TR α -Mutationen betroffenen Patienten weist trotz nahezu normaler SD-Funktionstests auf einen hypothyreoten Zustand von SDH-Zielgeweben hin. So wurden beispielsweise Bradykardie und neurokognitive Defizite beschrieben, die für mangelnde SDH-Wirkung in Herz und Gehirn sprechen (95).

EINLEITUNG

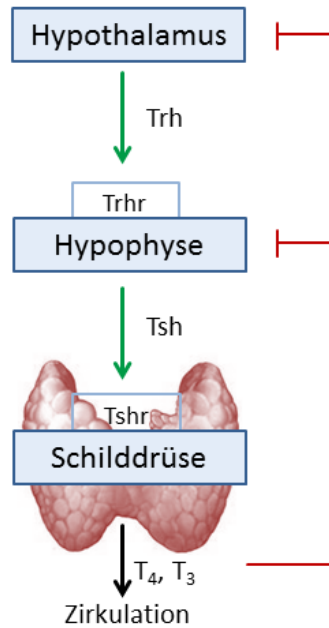


Abbildung 4: Die HPT-Achse.

TRH (Thyreotropin *releasing* Hormon) aus dem Hypothalamus agiert an TRH-Rezeptoren (Trhr) im Hypophysenvorderlappen und regt dort Bildung und Ausschüttung von Thyreotropin (TSH) an. TSH aktiviert den Tshr der Thyreozyten und steigert damit die SDH-Biosynthese. T₄ und zu geringerem Anteil T₃ werden ins Blut abgegeben und zu den Zielorganen transportiert. Gleichzeitig supprimieren sie in einer negativen Rückkopplungshemmung (rot) TRH- und TSH-Produktion.

1.4.3 Metabolismus von SDH zur Aktivierung und Inaktivierung

Der Metabolismus von SDH ist beteiligt an der Regulation der biologischen Verfügbarkeit des aktiven Hormons. Die SD bildet wie unter 1.1 beschrieben nur ca. 20% des zirkulierenden T₃ (29, 30). Der größte Anteil wird durch Deiodierung des Prohormons T₄ zu T₃ außerhalb der SD gebildet. T₄ wird von zwei Isoenzymen, der Typ I 5'-Deiodase (Dio1) und der Typ II 5'-Deiodase (Dio2), durch Außenringdeiodierung zum aktiven T₃ konvertiert (110). Welches der beiden Enzyme den größten Teil zur T₃-Konzentration in der Zirkulation beiträgt, ist noch nicht zweifelsfrei geklärt (110, 111). Die Inaktivierung von SDH zum Schutz von Geweben vor übermäßigen Hormonmengen kann auch durch Deiodierung bewirkt werden. Deiodierung am inneren Ring von T₃ zu 3,3'-T₂, aber auch von T₄ zu reversem T₃ (rT₃) werden durch die Typ III 5-Deiodase (Dio3) katalysiert (112). Die dabei entstehenden Metaboliten rT₃ und 3,3'-T₂ besitzen keine Affinität zum TR. Auch die Dio1 besitzt gewisse 5-Deiodaseaktivität und kann zur Inaktivierung von SDH durch Deiodierung am inneren Ring beitragen, z.B. besonders effektiv bei sulfatierten SDH (113). Die Induktion von Dio1 und Dio3, die in der Hyperthyreose beobachtet wird, kann so zur Inaktivierung der SDH beitragen. Allerdings ist noch nicht geklärt, wie in dieser Situation ein Übermaß an T₃-Produktion vermieden wird, da

die Dio1 wie beschrieben auch T_4 zu T_3 aktiviert. Im Gegensatz dazu wird in der Hypothyreose die Dio2 hochreguliert (114) und stellt so die adäquate lokale T_3 Versorgung, z.B. in der Hypophyse, sicher. Neben Deiodierungsreaktionen unterlaufen SDH auch Modifikationen der Aminosäureseitenkette (Decarboxylierung, Desaminierung), Konjugation der phenolischen OH-Gruppe (Sulfatierung, Glucuronidierung) oder oxidativer Spaltung der Diphenyletherbindung (115, 116).

1.5 3-Iodthyronamin (3- T_1 AM)

Wie unter 1.4.3 beschrieben unterliegen SDH enzymatischem Metabolismus. Dies kann zum Teil zur Bildung von ausscheidungsfähigen Metaboliten führen, aber auch weitere aktive Moleküle hervorbringen. So wurde gezeigt, dass 3,5-Diiodothyronin (3,5- T_2 , Abb. 5) thyromimetische Wirkung hat (117, 118) und auch Vertreter der Thyronamine biologisch aktiv sind (119, 120). Thyronamine sind strukturell gesehen decarboxylierte und partiell deiodierte Derivate der SDH. Theoretisch sind 9 verschiedene Thyronamine mit unterschiedlichem Iodierungsstatus denkbar. Im humanen Serum wurde bisher nur das einfach am inneren Ring iodierte 3- T_1 AM endogen detektiert ((121, 122) und Abb. 5). Dort liegt 3- T_1 AM gebunden an Apolipoprotein B-100 vor (123).

1.5.1 Wirkungen von 3- T_1 AM

Im Jahr 2004 wurde 3- T_1 AM erstmals endogen in Nagern nachgewiesen. Gleichzeitig wurde demonstriert, dass die einmalige intraperitoneale (i.p.) Injektion von 50 mg/kg 3- T_1 AM in Nagern innerhalb weniger Minuten zu einer reversiblen, mehrere Grad Celsius starken Absenkung der Körpertemperatur sowie einer Reduktion von Energieumsatz und Herzfrequenz führt (119, 120, 124). Diese Befunde weckten das wissenschaftliche Interesse an 3- T_1 AM, das trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zum SDH offenbar starke SDH-antagonistische Effekte in Nagern bewirken kann. Auch andere physiologische Manifestationen der SDH-Wirkung werden durch 3- T_1 AM-Gabe im Tiermodell moduliert. In mehreren voneinander unabhängigen Arbeiten wurde beschrieben, dass 3- T_1 AM Fett- und Glucosestoffwechsel reguliert (120, 125-130). In einem Rattenmodell, in dem 5 Tage lang zweimal täglich 10 mg/kg 3- T_1 AM injiziert wurden, zeigt sich ein Genexpressionsprofil in Leber und Fettgewebe, das eine Steigerung der Lipolyse nahelegt (127). Unter Verwendung metabolischer Käfige wurde gezeigt, dass sich der respiratorische Quotient (RQ) in Nagern,

die einmalig mit 50 mg/kg 3-T₁AM behandelt wurden, vermindert und damit in Richtung Lipidverwertung verschiebt (120). 3-T₁AM-induzierte Ketonurie und Verlust von Körperfett stützen diesen Befund (120). Die in der Studie beobachtete Verminderung des RQ von 0,9 auf 0,7 deutet ebenso auf eine Blockade der Glucoseverwertung hin. Auch dies wurde von mehreren Forschergruppen bestätigt. So wird die Blutglucosekonzentration in Mäusen und Ratten nach 50 mg/kg 3-T₁AM Applikation innerhalb von 2 h gesteigert. Dies wird begleitet von erhöhten Blutglucagonwerten und speziesabhängig zusätzlich verminderter Insulinkonzentration (125, 128). Intracerebroventrikulär (i.c.v.) appliziert bewirkt 3-T₁AM in um mehrere Zehnerpotenzen niedrigeren Dosen dieselben beschriebenen Effekte in teilweise sogar stärker ausgeprägter Form. Dies weist auf eine zentrale Wirkung von 3-T₁AM auf die Ausschüttung glucoregulatorischer Hormone hin (125, 129, 131). Hinweise auf Relevanz dieser glucoregulatorischen Aktivität im Menschen liefert eine Studie aus dem Jahr 2012. Hier wurde gezeigt, dass die 3-T₁AM-Serumkonzentration in Menschen mit glykiertem Hämoglobin korreliert und in Diabetikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht ist (132). Andere physiologische Wirkungen von SDH, die ebenfalls 3-T₁AM-abhängig in Nagern reguliert werden, sind unter anderem Schlafverhalten (133) und Gedächtnisleistung (131, 134). Neben der Modulation von SDH-Wirkungen, die eine feinregulierende Rolle von 3-T₁AM in der SDH-Homöostase nahelegt, wurde auch die direkte Interferenz von 3-T₁AM mit der HPT-Achse im Nagermodell beschrieben. In Ratten senkte die i.p. Behandlung mit 50 mg/kg 3-T₁AM Plasma-T₄ (keine Angabe ob frei oder total) und -TSH innerhalb von 2 h signifikant (125). In Mäusen verminderte die i.c.v. Injektion von 1,3 µg/kg 3-T₁AM die fT₃-Konzentration im Serum (129). Studien mit langfristiger 3-T₁AM Applikation zur Untersuchung der Interferenz von 3-T₁AM mit der SDH-Homöostase waren jedoch vor Beginn dieser Doktorarbeit nicht publiziert.

1.5.2 Biosynthese von 3-T₁AM

Ort und Ablauf der 3-T₁AM-Biosynthese sind nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion und nicht vollständig geklärt. Strukturell gesehen handelt es sich bei 3-T₁AM um ein teilweise deiodiertes und an der Alanin-Seitenkette decarboxyliertes Derivat der SDH (Abb. 4). Für eine *de novo* Synthese von 3-T₁AM müssten daher in Analogie zur SDH-Biosynthese oxidative Iodierung und Etherkopplung von zwei Tyrosylringen stattfinden. Würde 3-T₁AM direkt durch alternativen Metabolismus aus bestehenden SDH metabolisiert

werden, wären Decarboxylierung und partielle Deiodierung nötig. Da SDH strukturell auch Aminosäuren sind, wurde als decarboxylierendes Enzym zunächst die *Aromatic Amino Acid* Decarboxylase (AADC) vorgeschlagen, die die Decarboxylierung von 3,4(OH)₂-Phenylalanin (L-DOPA) and 5-Hydroxytryptophan zu Dopamin und Serotonin katalysiert (135). Hoefig et al. demonstrierten jedoch, dass die AADC *in vitro* keine Thyronine als Substrat akzeptiert (136). Eine Decarboxylase, die T₄ und 3,5-T₂ als Substrat annimmt, ist die Ornithindecaboxylase (ODC) (137). Je nach Iodierungsstatus des Thyronins müsste das im Anschluss an die Decarboxylierung entstehende Thyronamin ein- oder mehrfach deiodiert werden, um 3-T₁AM zu generieren. Deiodierungsreaktionen von Thyronaminen können von den Deiodasen 1-3 katalysiert werden (138).

Ob die 3-T₁AM-Biosynthese in der SD selbst oder durch alternativen Metabolismus von T₄ in nicht-thyroidalem Gewebe stattfindet, ist noch nicht geklärt. Ein erstes Indiz dafür, dass 3-T₁AM extrathyroidal aus SDH generiert werden kann, wurde in kardialen H9c2 Zellen demonstriert. Diese produzieren nach Inkubation mit 50 nM T₃ 3-T₁AM (122). 2011 wurde gezeigt, dass 3-T₁AM in Seren thyroidektomierter Patienten unter T₄-Supplementierung in höheren Mengen nachweisbar ist als in Seren gesunder Kontrollen (121). Dies weist ebenso auf die Möglichkeit extrathyroidaler 3-T₁AM-Produktion hin. Im darauffolgenden Jahr erschien jedoch eine Publikation, in der die thyrooidale Bildung von 3-T₁AM im Mausmodell postuliert wurde. Hier wurde Mäusen chemisch mittels Methimazol (MMI, Tpo-Inhibitor) und Perchlorat (ClO₄⁻, Nis-Inhibitor) eine Hypothyreose induziert und anschließend durch subkutane Injektion (s.c.) T₄ resupplementiert. Da keine 3-T₁AM-Bildung nach T₄-Gabe gemessen werden konnte, gingen die Autoren davon aus, dass die durch das MMI/ClO₄⁻-Behandlungsprotokoll gehemmten Proteine Tpo und Nis der SD selbst für die 3-T₁AM-Biosynthese aus T₄ verantwortlich sein müssten (139). Wie später demonstriert wurde, wird jedoch die Genexpressionsstärke der *Odc*, die in die Bildung von 3-T₁AM aus SDH involviert ist, in Mäusen durch die Behandlung mit MMI und ClO₄⁻ moduliert (137). Weiterhin wurde gezeigt, dass murines Darmgewebe *ex vivo* T₄ unter Beteiligung der intestinalen *Odc* zu 3-T₁AM umsetzt (137). Dies weist darauf hin, dass exogenes T₄ den Darm passieren muss um zu 3-T₁AM metabolisiert zu werden und untermauert die Theorie extrathyroidaler Thyronaminbildung. Als Intermediate der intestinalen 3-T₁AM-Biosynthese aus T₄ wurden 3,5-T₂ und 3,5-T₂AM aufgezeigt. 3,5-T₂AM kann durch Dio1 und 3 zu 3-T₁AM deiodiert werden (138).

EINLEITUNG

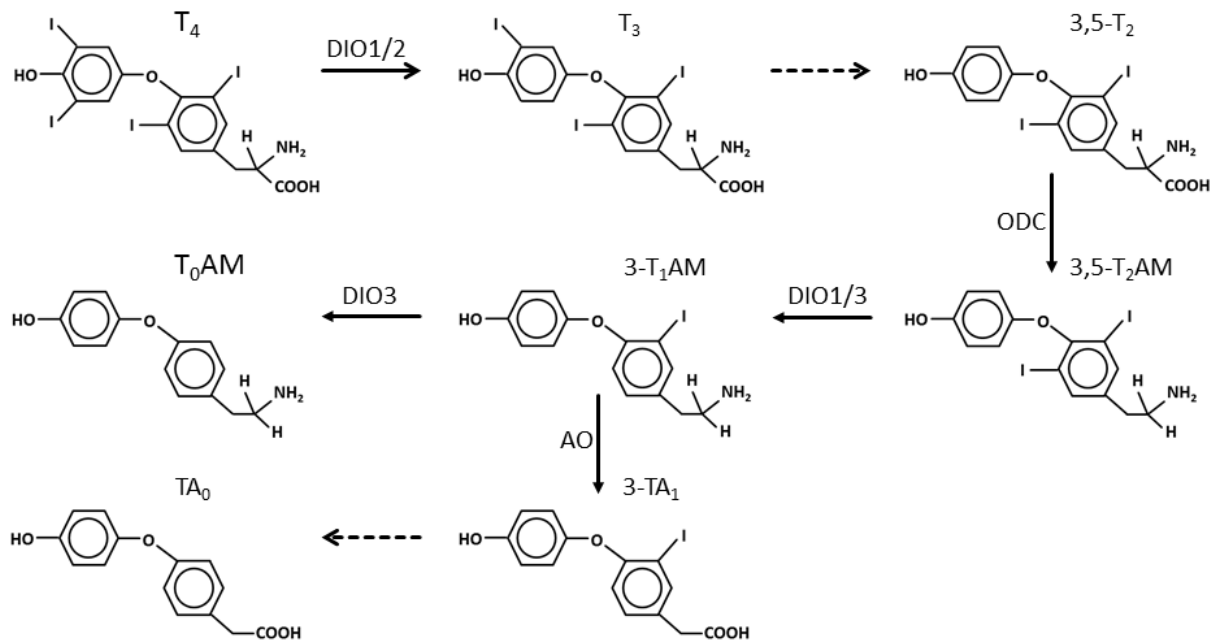


Abbildung 5: Biosynthese von 3-T₁AM und Entstehung biologisch aktiver 3-T₁AM-Metaboliten.

Pfeile kennzeichnen den Weg der postulierten 3-T₁AM-Biosynthese und dessen Metabolismus. Gestrichelte Pfeile zeigen Reaktionen an, die bisher nur indirekt, aber nicht formal nachgewiesen wurden. DIO: Deiodase, ODC: Ornithindecaboxylase, AO: Aminoxidase.

Ob die SD selbst zur 3-T₁AM-Konzentration in der Zirkulation beiträgt – durch *de novo* Synthese oder alternativen T₄-Metabolismus – wurde bisher aber dennoch weder eindeutig bewiesen noch widerlegt.

1.5.3 Transport von 3-T₁AM über Zellmembranen

Obwohl zahlreiche biologische Wirkungen von 3-T₁AM bekannt sind, ist nicht geklärt, wie 3-T₁AM in Zellen und Gewebe aufgenommen wird. Der 3-T₁AM-Transport in mehrere Zelltypen wurde in Zellkulturmodellen mit Hepatozyten, Herzmuskelzellen und Thyreozyten gezeigt (122, 140, 141). Zumindest im *in vitro* System handelt es sich um einen spezifischen Transportmechanismus, der pH-abhängig gesteigert wird und Natrium- und Chlorid-unabhängig ist (142). Dies könnte für die Beteiligung von *Solute Carrier* (SLC)-Transportern sprechen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum SDH könnten jedoch auch SDH-Transporter eine Rolle spielen. Im Jahr 2010 wurde gezeigt, dass 3-T₁AM den Transport von radioaktiv markiertem T₃ in MCT8-überexprimierende *in vitro* Zellmodelle inhibiert (143, 144), selbst jedoch nicht MCT8-abhängig transportiert wird (142, 143). In einem großen cDNA Screening-Ansatz wurde eine siRNA-Bibliothek gegen 403 SLC-Membrantransporter verwendet. Die Transporterkandidaten wurden zunächst danach ausgewählt, ob sich der Transport von 3-T₁AM nach *knockdown* verringerte, im nächsten Selektionsschritt wurden

jene Transporter, die im experimentellen System nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden, ausgeschlossen. Es verblieben 7 Transporterkandidaten: SLC7A1, SLC16A7, SLC17A5, SLCO3A1, SLCO4A1, SLC31A1 und SLC43A3. Die Überexpression dieser Transporterkandidaten in mehreren Zellmodellen steigerte den 3-T₁AM Transport jedoch nicht über das Hintergrundsignal, was die Relevanz der Befunde in Frage stellt.

1.5.4 Molekulare Zielstrukturen und intrazelluläre Signaltransduktion von 3-T₁AM

Die initialen Befunde zur hypometabolischen Wirkung von 3-T₁AM in Nagern wurden innerhalb von Minuten nach Injektion beobachtet und eine Interaktion von 3-T₁AM mit den Rezeptoren der strukturell ähnlichen SDH konnte nicht nachgewiesen werden (119). Daher wurde zunächst nicht von genomischer Wirkung, sondern von schneller Plasmamembran-vermittelter Signaltransduktion des 3-T₁AM ausgegangen. Diese Theorie unterstützend war der *trace amine associated receptor 1* (Taar1) der erste nachgewiesene 3-T₁AM-Rezeptor (119). Über eine 3-T₁AM-abhängige Aktivierung von Taar1 wird über Gs-Kopplung eine Adenylatcyclase aktiviert, was die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht (145-147). Für die Wirkungsstärke am Taar1 gibt es offenbar Speziesunterschiede, so ist 3-T₁AM am rTaar1 wesentlich potenter als am hTAAR1 (145, 148). 3-T₁AM hat außerdem gemeinsame chemische Eigenschaften mit Catecholaminen, den klassischen Liganden adrenerger Rezeptoren. Die Aktivität von 3-T₁AM am α 2A-adrenergen Rezeptor (Adra2a) wurde demonstriert und sowohl der Adra2a-Inhibitor Yohimbin als auch der *knockout* des Rezeptors unterbinden die in mehreren Studien beschriebene hyperglycämische Wirkung von 3-T₁AM *in vivo* (128, 149). Die Wirkung von 3-T₁AM am Adra2a hat der Taar1-Aktivierung entgegengesetzte Wirkung auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Nach Aktivierung durch 3-T₁AM koppelt Adra2a an ein inhibitorisches G-Protein (Gi), was im Resultat die intrazellulären cAMP-Spiegel absenkt (149). Zusätzlich zum Gi-Effekt, den 3-T₁AM allein am Adra2a bewirkt, wurde gezeigt, dass 3-T₁AM Norepinephrin-induzierte Gi- und ERK1/2-Signalgebung am Adra2a hemmt (149). Ein Hinweis auf eine kombinierte Funktion von Taar1 und Adra2a in der Vermittlung des 3-T₁AM-Signals, wie mehrfach vorgeschlagen, wurde im Jahr 2015 publiziert. Demnach heterodimerisieren hTAAR1 und hADRA2A *in vitro*. Geschieht dies, wird die Gi-Aktivität von ADRA2A gehemmt und die modulatorische Wirkung von 3-T₁AM auf Norepinephrin-induzierte Signalweiterleitung am ADRA2A verschwindet (149). Inzwischen wurde gezeigt, dass 3-T₁AM auch Aktivität an β -adrenergen Rezeptoren und

weiteren Rezeptoren der Taar-Familie ausübt (150-152). Auch eine Rolle von 3-T₁AM im Calcium-Signalnetzwerk wurde in Zellen des Auges beschrieben (153, 154). In Konjunktiva- und Corneaepithelzellen stieg die intrazelluläre freie Menge an Calcium-Ionen innerhalb von Minuten nach 3-T₁AM Applikation an. Dieser Effekt wird hier durch den *Transient Receptor Potential Melastatin 8* Kanal (TRPM8) vermittelt (153, 154) und ist in Konjunktivazellen durch den nichtselektiven β -Blocker Timolol inhibierbar (150). Weitere 3-T₁AM modulierte Signalwege beinhalten Ampk-Aktivierung (130), ERK1/2-Phosphorylierung (131) und Antagonismus an muscarinischen Rezeptoren (155). Zusätzlich zu den schnellen Plasmamembran-vermittelten Signalwegen über sekundäre Botenstoffe und Kinasen wurden kürzlich auch genomische Wirkungen, die den Energiestoffwechsel betreffen *in vivo* und *in vitro* beschrieben (127, 130). Zu den identifizierten direkten funktionalen Zielstrukturen des 3-T₁AM gehört die mitochondriale FoF1 ATPase (156) und Komplex III der mitochondrialen Elektronentransportkette (157). Weiterhin inhibiert 3-T₁AM den Dopamin-Transporter DAT, den Norepinephrin-Transporter NET sowie den vesikulären Monoamintransporter VMAT2 (158, 159) und könnte so als Neuromodulator agieren. Zu bedenken ist, dass für die meisten in diesem Kapitel angeführten Untersuchungen vergleichsweise hohe Konzentrationen von 3-T₁AM verwendet wurden, die deutlich über den bisher beschriebenen endogenen Konzentrationen liegen (119, 121).

1.5.5 Metabolismus von 3-T₁AM

Die Aufklärung der komplexen Wirkmechanismen von 3-T₁AM wird zusätzlich durch den umfassenden intrazellulären Metabolismus des Moleküls erschwert. Bereits 2007 zeigten Pietsch *et al.*, dass 3-T₁AM Substrate von Sulfotransferasen sind, was einen Inaktivierungsmechanismus wie er auch für SDH bekannt ist, darstellen könnte (160). Wenig später wurde demonstriert, dass Thyronamine isoenzymspezifische Substrate für Deiodasen sind. 3-T₁AM kann demnach beispielsweise unter Katalyse der Dio3 zum Iod-freien T₀AM umgesetzt werden (138, 161). Da 3,3',5-Triiodthyroessigsäure (Triac) ein endogener biologisch aktiver SDH-Metabolit ist (162, 163) und auch das monoiodierte 3-TA₁ *in vivo* detektierbar ist, war es naheliegend die Desaminierung von Thyronaminen zu untersuchen (164). Die Beteiligung von Monoaminoxidasen (Mao) oder der Semicarbazid-sensitiven Aminooxidase (Ssao) an der Umsetzung von 3-T₁AM zu 3-TA₁ wurde durch Iproniazidsensitivität dieser Desaminierung erstmals in HepG2 Zellen und humanem SD-Homogenat gezeigt (164). In

einem Tierexperiment bestätigten Hackenmüller *et al.* 2012, dass die oben beschriebenen Reaktionen auch *in vivo* im Mausmodell stattfinden. C57BL/6 Mäusen wurden 25 mg/kg 3-T₁AM i.p. injiziert und die Konzentration von 3-T₁AM und dessen Metaboliten in verschiedenen Organen zu mehreren Zeitpunkten mittels LC-MS/MS analysiert (165). Die Konzentration der 3-TA₁ und des sulfatierten 3-T₁AM-Konjugates überstiegen die Konzentration des Ausgangsmoleküls schon nach 20 min deutlich (165), was darauf hinweist, dass es sich bei beiden um Hauptmetaboliten handelt. Iod-freies T₀AM wurde ebenfalls *in vivo* nach 3-T₁AM Gabe nachgewiesen, allerdings nur in geringen Mengen. Ob dieser Metabolisierungsweg also weniger wichtig ist als Desaminierung und Sulfatierung oder ob T₀AM schneller ausgeschieden oder weiter metabolisiert wird, bleibt zu klären. Weiterhin wurden bis *dato* unbekannte 3-T₁AM-Metaboliten identifiziert (Abb. 6). Dabei handelt es sich neben den bereits genannten desaminierten und deiodierten Produkten um an der OH-Gruppe konjugierte Moleküle wie Glucuronide und N-acetylierte Derivate. Wie sich bereits in *in vitro* Studien andeutete, war Gewebespezifität zu beobachten, was die Identität der Metaboliten als auch die Kinetik und das Ausmaß des 3-T₁AM-Metabolismus betraf (122, 140, 141).

1.5.6 Biologische Aktivität ausgewählter 3-T₁AM-Metaboliten

Der desaminierte 3-T₁AM-Metabolit 3-TA₁ beeinflusst wie 3-T₁AM das Erinnerungsvermögen, reduziert die Schmerzschwelle und erhöht die Blutglucosekonzentration in Mäusen (131, 166). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass weder eine einzelne Injektion noch wiederholte Behandlung mit 3-TA₁ die für 3-T₁AM bekannten kardialen und thermoregulatorischen Effekte bewirkt (167). 3-TA₁ könnte demnach einen Teil der für 3-T₁AM beschriebenen Effekte als eigentlicher aktiver Metabolit vermitteln, während es auf Ebene der Thermoregulation und der kardiovaskulären Effekte vielmehr ein Inaktivierungsprodukt von 3-T₁AM darstellen könnte, das dessen Wirkung beendet (134, 167). Der deiodierte 3-T₁AM-Metabolit T₀AM ruft ähnliche Effekte auf Herz und Körpertemperatur in Mäusen hervor wie 3-T₁AM selbst. So wurde die Rektaltemperatur von Mäusen schnell, dosisabhängig und reversibel durch eine einmalige i.p. Injektion von 50 mg/kg T₀AM gesenkt (119, 124).

EINLEITUNG

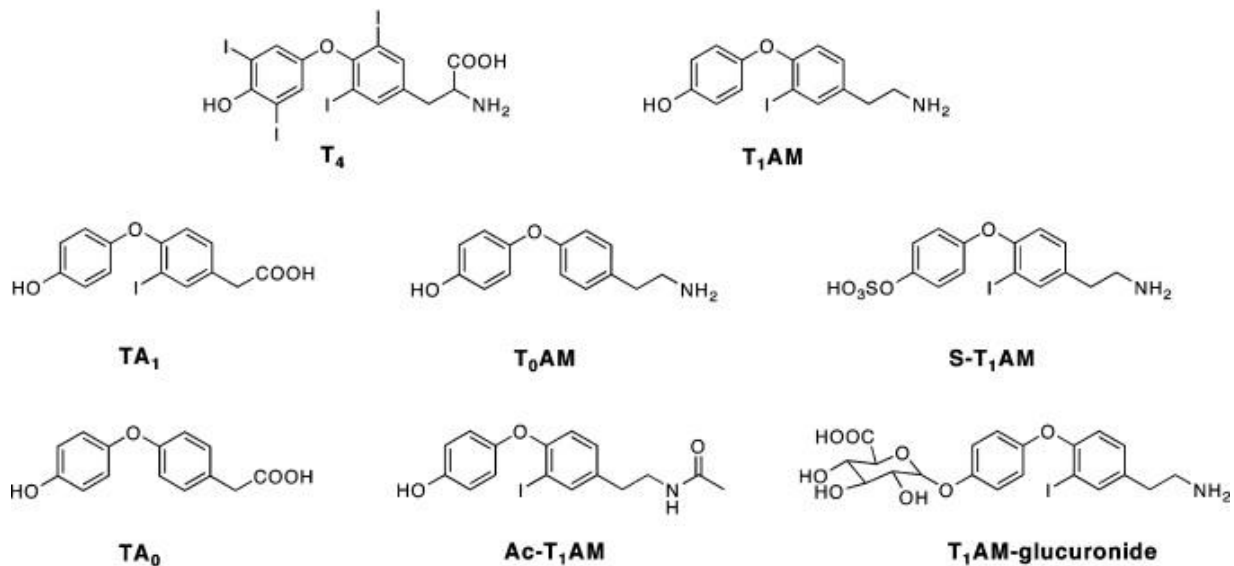


Abbildung 6: Übersicht über *in vivo* detektierte 3-T₁AM-Metaboliten nach Injektion von 25 mg 3-T₁AM/kg Körpergewicht in C57BL/6 Mäusen.

Abbildung aus Hackenmueller & Scanlan, J Chromatogr A, 2012 (165).

In isolierten denervierten Rattenherzen reduzierte T₀AM das Herzminutenvolumen, jedoch im Gegensatz zu 3-T₁AM nicht die Herzfrequenz selbst (119). Auch eine glucoregulatorische Funktion, wie für 3-T₁AM bekannt, wurde für T₀AM beschrieben. 50 mg/kg T₀AM i.p. und intracerebroventrikulär (i.c.v.) erhöhen die Plasma-Glucosekonzentration in Ratten, allerdings in einem geringeren Ausmaß als 3-T₁AM-Injektion (125). Interferenz mit der HPT-Achse deutete sich in einem Versuch mit Ratten ebenfalls an. Plasma T₄, T₃ und TSH waren innerhalb von 120 min nach einmaliger i.p. Injektion von 50 mg/kg T₀AM signifikant verringert und zwar in höherem Ausmaß als nach 3-T₁AM-Gabe, welches außerdem auf T₃ keinen Einfluss hatte (125). Bezüglich der Signaltransduktion ist bisher bekannt, dass T₀AM wie 3-T₁AM cAMP Akkumulation über Taar1-Aktivierung stimuliert, allerdings mit einer höheren EC₅₀ (119).

1.6 Zielstellung der Doktorarbeit

Dass im Durchschnitt jede(r) dritte Deutsche eine krankhafte Veränderung der SD aufweist (168) und sich nach wie vor nicht alle Patienten in Behandlung einer SD-Erkrankung unter T₄-Substitution mit adäquatem TSH wohl fühlen (169), zeigt, dass die Analyse und diagnostische Bewertung von T₄ und TSH als Indikator einer idealen SDH-Homöostase möglicherweise nicht ausreichend ist. Es ist demnach wichtig, das gesamte Spektrum an SDH-(Metaboliten) über T₃ und T₄ hinaus inklusive der Thyronamine zu charakterisieren, um die Regulation der

EINLEITUNG

SDH-Homöostase umfangreicher aufzuklären. Während die Wirkung von 3-T₁AM auf verschiedene physiologische Prozesse im Tierversuch und in Zellkulturen bereits vielfältig untersucht wurde, wurde die Wirkung auf die SD selbst und eine eventuelle Regulation der SDH-Biosynthese bisher nicht detailliert erforscht (140, 170).

Die Hypothese dieser Doktorarbeit ist, dass der SDH-Metabolit 3-T₁AM an der Feinregulation der SDH-Homöostase beteiligt ist und dies durch eine direkte Wirkung auf die SD selbst vermitteln kann. Um diese Hypothese zu testen, sollte die Wirkung von 3-T₁AM auf die SD und die HPT-Achse im Tiermodell untersucht werden. Die Analyse direkter Effekte auf Thyreozyten sollte *in vitro* analysiert werden. Zunächst wurde eine Thyreozytenzelllinie als Modell verwendet werden, um den Einfluss von 3-T₁AM auf metabolische und funktionelle Parameter sowie intrazelluläre Signaltransduktion zu untersuchen. Die aus der Zelllinie und dem Mausmodell gewonnenen Informationen sollen in Zukunft in einem komplexeren, aus murinen Stammzellen generierten SD-Follikel-Modell mit SDH-Biosynthesekapazität überprüft werden.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Die Durchführung von Tierversuchen erfolgte im Rahmen von Laboraufenthalten in Kooperation mit Dr. Carolin Höfig und Prof. Dr. Jens Mittag in der Abteilung *Cell and Molecular Biology* am *Karolinska Institutet* in Stockholm, Schweden. C57BL/6J Mäuse wurden von Charles River Laboratories bezogen und in der Versuchstierhaltung des *Karolinska Institutet* am Campus Solna in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus bei 19-23°C mit *ad libitum* Zugang zu Wasser und Standardfutter gehalten. Alle tierexperimentellen Arbeiten waren genehmigt und wurden in Übereinstimmung mit den Vorgaben der EU Tierversuchsrichtlinie (86/609/EEC) und Stockholms *Norra Djurförsöksetiska Nämnd* durchgeführt.

2.1.2 Zelllinien

Als *in vitro* Modell für Thyreozyten wurde die nichttransformierte Zelllinie PCCL3 verwendet (171). Es handelt sich hierbei um Follikelepithelzellen, die aus den SD 18 Monate alter Fischer Ratten isoliert und mit einer Hormonkombination, die unter anderem TSH enthält, kultiviert wurden. Auf diese Art lassen sich PCCL3 Zellen über mehrere Passagen mit einem Thyreozyten-ähnlichen Phänotyp in Kultur halten (171).

Für die *in vitro* Generierung funktioneller Schilddrüsenfollikel aus murinen embryonalen Stammzellen wurde die rekombinante embryonale Stammzelllinie A2Lox Nkx2-1-Pax8 (172) verwendet, die freundlicherweise von Dr. Sabine Costagliola (Université libre de Bruxelles, Brüssel, Belgien) zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen wurden von S. Costagliola und Kollegen folgendermaßen hergestellt: die kodierenden Regionen von *Nkx2-1* und *Pax8* wurden getrennt durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) -Sequenz in den p2Lox Vektor kloniert. Das Konstrukt p2Lox-*Nkx2-1-Pax8* wurde durch Elektroporation in A2Lox.Cre embryonale Mausstammzellen eingebracht und das Transgen so unidirektional in den *Hprt* Locus rekombiniert. Zur Selektion positiver Klone wurde Neomycin verwendet. Nach Doxycyclin-Inkubation wurde die Expression von *Nkx2-1* und *Pax8* mittels Immunfluoreszenz überprüft (172).

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Bio-Rad Laboratories (München), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR International (Hannover) bezogen. H₂O bezeichnet immer destilliertes Wasser, ddH₂O bezeichnet bidestilliertes Wasser. TSH bezeichnet immer bovines TSH. Rekombinantes humanes TSH für die Differenzierung von Stammzellen wird als rhTSH bezeichnet.

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Übersicht über das Verbrauchsmaterial.

Zellkulturmaterial	Nunc über Sigma-Aldrich, TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz), Thermo Fischer Scientific (Hennigsdorf)
Serologische Pipetten	Falcon über VWR International
Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht), Eppendorf (Hamburg), Falcon
Pipettenspitzen	Sarstedt, Kisker Biotech (Steinfurt)
qPCR Zubehör	Bio-Rad
Seahorse Zubehör	Agilent (Santa Clara, USA)

2.1.5 Geräte

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Laborgeräte.

Autoclav	Varioclav	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Blotapparatur	Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell	BioRad
Dispergiergerät	Ultra Turrax IKA T18 Basic	IKA (Staufen)
Extracellular Flux Analyzer	Xfe96	Seahorse/Agilent
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop mot 2	Carl Zeiss (Jena)
Heizplatte/Magnetrührer	IKAMAG RH	IKA
HPLC	1260 quaternary HPLC system	Agilent
<i>Imager</i>	Alpha Imager EC	Alpha Innotech
Inkubator	7601	Gesellschaft f. Labortechnik (Großburgwedel)
Konfokalmikroskop	DMI8 CEL Compact stand inverted	Leica Microsystems (Wetzlar)
Kugelmühle	Dismembrator	Sartorius (Göttingen)
Kugelmühle	Tissue Lyser	Qiagen (Hilden)
Kühlzentrifuge	5417R	Eppendorf
<i>Laser Scanning</i> Mikroskop	LSM 510 META	Carl Zeiss
Luminometer	Mithras LB 940	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Massenspektrometer	QTrap 6500	ABSciex (Darmstadt)
Mehrkanalpipetten	Discovery Comfort	HTL Lab Solutions (Warschau, Polen)
Mikrotom	RM 2125 RT	Leica Microsystems
Mikrowelle	Micro 750 W	Whirlpool (Stuttgart)
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham (Freiburg)
Netzgerät	Blue Power Plus	Serva
PCR Cycler	Primus	MWG Biotech (Ebersberg)
pH Meter	inoLab pH Level 1	WTW (Weilheim)
Photometer	Microplate Reader Model 3550	BioRad
Photometer	Nanodrop ND-1000	PeqLab/VWR (Erlangen)
Photometer	NanoQuant infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Pipetten	Research plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy 2	Integra (Biebertal)

MATERIAL & METHODEN

Plattenschüttler	DELFLIA Plate Shake 1296-003	Perkin Elmer (Rodgau)
Plattenwascher/Inkubator	XF Prepstation	Agilent
qPCR Cycler	CFX Connect Real-Time PCR System	BioRad
Rollinkubator	TRM-V	IDL (Nidderau)
Röntgenfilmkassette	Hypercassette RPN 1649	Amersham
Scanner	CanoScan LiDE90	Canon (Krefeld)
Schlitten für Agarosegel	Blue Marine 200	Serva
Schüttelwasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik
Schüttler	MTS2	IKA
Schüttler	Logic Shaker	neoLab (Heidelberg)
Sonifizierstab	Ultraschallprozessor Labsonic M	B.Braun Biotech International (Melsungen)
Sterilbank	LaminAir Model 1.2	Holten (Allerød, Dänemark)
Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Microcentrifuge Model AL	Carl Roth
Transilluminator	V-90M	Benda (Wiesloch)
Vakuumpumpe	Vacusaft	Integra
Vakuumszentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf
Vortex	Microspin FV-2400	Hartenstein (Würzburg)
Waage	CP323S-OCE	Sartorius
Waage (Analysenwaage)	XS 105	Mettler Toledo (Gießen)
Zellkulturinkubator	HERAcell	Heraeus (Hanau)
Zellkulturmikroskop	Wilovert S	Hund (Wetzlar)
Zentrifuge	5810R	Eppendorf
Zentrifuge Zellkultur	Megafuge 1.0	Heraeus

2.1.6 Kits

Tabelle 3: Verwendete Reagenziensysteme.

Aurum Total RNA Mini Kit	BioRad
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad
ABsolute qPCR SYBR Green Fluorescein	Thermo Fischer Scientific
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent/Seahorse
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific
IP-One ELISA Assay Kit	CisBio (Berlin)
AlphaScreen cAMP Detection Kit	Perkin Elmer
tT ₃ Radioimmunoassay No. 4525	DRG Diagnostic (Marburg)
tT ₄ Radioimmunoassay Nr. 4524	DRG Diagnostic
tT ₄ ELISA EIA 1781	DRG Diagnostic
tT ₃ ELISA DNOV053	NovaTec (Dietzenbach)

2.1.7 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Farbstoffe.

WB: Western Blot, Histo: Immunhistochemie.

Antikörper / Farbstoff	Firma	Verdünnung
Primärantikörper		
Nis (<i>rabbit</i>)	Acris (Herford)	WB 1:10000, Histo 1:1000
β-Aktin (<i>rabbit</i>)	Rockland (Limerick, USA)	WB 1:2000
Ampk (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling (Beverly, USA)	WB 1:1000
pAmpk (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	WB 1:1000
Mct8 (<i>rabbit</i>)	Atlas Antibodies (Bromma, Schweden)	WB 1:1000
Tg (<i>mouse</i>)	Thermo Fischer Scientific	Histo 1:1000
Collagen IV (<i>rabbit</i>)	Novotech über BioLogo (Kronshagen)	Histo 1:100
Sekundärantikörper		
<i>goat anti mouse</i> Cy 3	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	Histo 1:1000
<i>goat anti rabbit</i> Alexa Fluor 488	Invitrogen (Darmstadt)	Histo Follikel 1:400
<i>goat anti rabbit</i> Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Invitrogen	Histo 1:250
<i>goat anti rabbit</i> Meerrettichperoxidase (HRP)	Dako (Glostrup, Dänemark)	WB 1:2000
Farbstoffe		
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich	Histo 1:20000
Draq5	BioStatus (Leicestershire, UK)	Histo 1:500
HCS <i>Cell Mask Orange</i> (CMO)	Molecular Probes, Invitrogen	Histo 1:500

2.1.8 Programme

Tabelle 5: Software und Datenbanken.

Analyst 1.6.2 Software	ABSciex
AxioVision Rel. 4.7	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
Endnote	Thomson Reuters (New York, USA)
Gimp	https://www.gimp.org/
Graphpad Prism	GraphPad Prism Software (San Diego, USA)
Image J	http://rsb.info.nih.gov/ij/
LASX	Leica Microsystems
LSM Image Browser	Carl Zeiss MicroImaging
Microsoft Office, Excel, Powerpoint	Microsoft (Unterschleißheim)
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
Multiquant 2.1.1	ABSciex
Wave Seahorse XFe Instrument Controller	Seahorse Bioscience (Massachusetts, USA)

2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden 3 Tierstudien durchgeführt, in denen männlichen C57BL/6 Mäusen die in Tabelle 6 aufgeführten Substanzen jeweils täglich für eine Dauer von 7 Tagen i.p. injiziert wurden (5 µl/g Körpergewicht). In jedem Versuch wurden parallel zu den mit SDH oder Thyronaminen behandelten Mäusen Kontrollgruppen geführt, denen das entsprechende Lösungsmittel unter vergleichbaren Bedingungen verabreicht wurde. Futter- und Wasseraufnahme sowie das Körpergewicht der Tiere wurden

jeden Tag protokolliert. Vor Beginn der eigentlichen Behandlung wurden die Mäuse 7 Tage lang an die Prozedur adaptiert.

Tabelle 6: Tierversuche mit C57BL/6-Mäusen.

Versuch	Testsubstanz	Lösungsmittel	Tiere /Gruppe
3-T ₁ AM (1)	3-T ₁ AM 5 mg/kg	60% DMSO + 40% PBS	6
3-T ₁ AM (2)	3-T ₁ AM 5 mg/kg	60% DMSO + 40% PBS	8
T ₀ AM	T ₀ AM 5 mg/kg	60% DMSO + 40% PBS	6
T ₃	T ₃ 5 ng/kg	0,1 µM NaOH in 0,9% NaCl	5

Hochreines 3-T₁AM and T₀AM wurden von Dr. R. Smits (ABX Advanced Biochemical Compounds, Radeberg) synthetisiert. T₃ wurde von Sigma-Aldrich bezogen.

24 h nach der letzten Injektion, wurden die Tiere durch Begasung mit CO₂ getötet und die rektale Temperatur sofort mit einem Thermometer gemessen. Anschließend wurde der Brustraum eröffnet und das Blut nach Anschneiden der Aorta im Thoraxraum gesammelt. Das Blut lagerte bis zur Gerinnung auf Eis, wurde dann zentrifugiert (10000 x g, 10 min, 4°C) und das Serum (obere Phase) für weitere Analysen bei -80°C aufbewahrt. Nach der Blutentnahme wurden die Organe entnommen und auf Trockeneis schockgefroren. Alle Gewebe wurden bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Tierversuche wurden im Rahmen von Kooperationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten von verschiedenen Wissenschaftlern durchgeführt:

Versuch	Durchführung	Entnahme SD
3-T ₁ AM (1)	Simon Jacobi	Nancy Schanze
3-T ₁ AM (2)	Nancy Schanze	Nancy Schanze
T ₃	Nancy Schanze	Nancy Schanze
T ₀ AM	Lisbeth Harder	Nancy Schanze

Analyse von SDH-Konzentrationen in Mausseren

Die Konzentrationen von tT₃ und tT₄ im Serum von Mäusen aus dem 3-T₁AM-Versuch Nr. 2 wurden am Institut für Experimentelle Endokrinologie (IEE) mittels Radioimmunoassays nach Angaben des Herstellers bestimmt (RIA Nr. 4525 für tT₃ und Nr. 4524 für tT₄, DRG Diagnostic). Die Bestimmung der tT₃- und tT₄-Serumkonzentration von Mäusen aus allen übrigen Tierversuchen wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Hoefig mittels ELISA (EIA 1781 DRG Diagnostic für T₄ und DNOV053 Nova Tec für T₃) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die ELISA-Daten wurden freundlicherweise für die Doktorarbeit zur Verfügung gestellt.

Analyse der 3-T₁AM-Konzentration in Mausseren

Die 3-T₁AM-Konzentration in Mausserum wurde mit einem im IEE entwickelten kompetitiven Chemilumineszenz-Assay gemessen. Der Assay wurde von Dr. Carolin Höfig für die Analyse von Humanseren etabliert (121) und von Dr. Ina Lehmpful für die Analyse von Mausseren adaptiert. Für die an Mausseren adaptierte Version des Assays wurden dasselbe Assayformat, derselbe monoklonale Antikörper und dieselbe Standardkurvenmatrix verwendet. Der adaptierte Assay wurde von Dr. Lehmpful validiert, jedoch als solcher bislang nicht publiziert.

2.3 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Experimente wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle Medien wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt und die Kultur der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

2.3.1 Kultivierung von PCCL3 Zellen

10 x PBS

KCl	26,8 mM
NaCl	1,37 M
KH ₂ PO ₄	14,7 mM
Na ₂ HPO ₄	101,4 mM
H ₂ O	ad 2 l

1 x PBS

10 x PBS	10% (v/v)
H ₂ O	ad 1 l
pH	7,4

H5

Basis: PBS

Insulin	1 mg/ml
Transferrin	500 µg/ml
Glycyl-histidyl-lysin	2 µg/ml
Somatostatin	1 µg/ml
Hydrocortison	1 µM

Vollmedium

Basis: Coon's F12

FCS	5% (v/v)
TSH	1 mU/ml
H5	1:100
Na ₂ SeO ₃	100 nM

Fastenmedium

Basis: Coon's F12

Na₂SeO₃ 100 nM

PCCL3 Zellen wurden standardmäßig in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (T75) in Coon's F12 Vollmedium kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert (alle 3-4 Tage). Dafür wurden die Zellen in der T75 Flasche mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) inkubiert. Nach ca. 5 min wurde mikroskopisch geprüft, ob die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst waren. Die Trypsinreaktion wurde mit einem Überschuss an FCS-haltigem Vollmedium abgestoppt, die Zellen trituriert, die entsprechende Menge der Zellsuspension in neue Zellkulturgefäße überführt (maximal im Verhältnis 1:8) und mit Vollmedium auf 15 ml aufgefüllt.

2.3.2 Experimente mit PCCL3 Zellen

Zellaussaat

Wurden Zellen für Experimente in bestimmten *multiwell*-Formaten ausgesät, so wurden sie zunächst wie oben beschrieben trypsiniert, die Anzahl der Zellen/ml Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die entsprechende Menge Zellen in Vollmedium (siehe 2.3.1) in das für das Experiment vorgesehene Format überführt (Tab. 7). Die Zellen verblieben danach mindesten 24 h in diesem Medium, um zu gewährleisten, dass sie sich vollständig an den Boden der Zellkulturplatten anheften konnten.

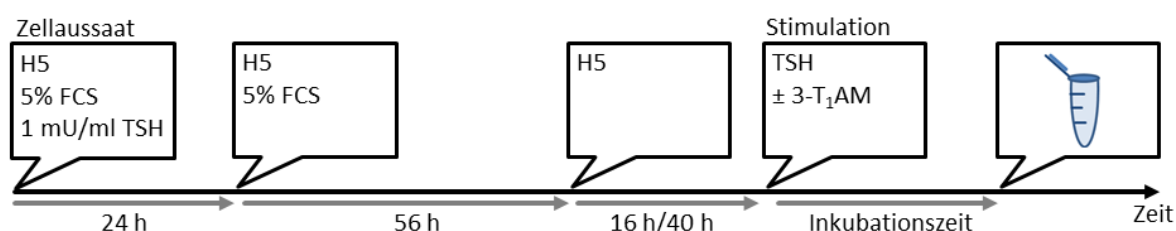
Depletionsprotokolle

Vor Experimenten, in denen die Modulation einer TSH-abhängigen Wirkung untersucht werden sollte, wurden die Zellen einem Protokoll unterzogen, um sie von FCS und TSH zu depletieren (siehe Abbildung). Hierbei wurden die Zellen im Rahmen des Standardprotokolls in einem ersten Schritt ab 24 h nach der Aussaat **ohne TSH** kultiviert (Fastenmedium + H5 + 5% FCS). Nach 56 h in TSH-freiem Medium erfolgte ein zweiter Depletionsschritt, in dem die Zellen **16 h ohne TSH und ohne FCS** (Fastenmedium + H5) kultiviert wurden. In einem Teil der Experimente zur Bestimmung der Iodidaufnahme, der Dio1-Aktivität und für die Hormonanalytik wurde ein verlängertes Depletionsprotokoll angewendet.

Tabelle 7: Anzahl der PCCL3 Zellen pro well in unterschiedlichen Formaten für Experimente.

Experiment	Format	Zellzahl/well
Hormonanalytik in Überständen	12-well	150.000
Hormonanalytik in Zelllysaten	6-well	400.000
Zellviabilität	96-well	20.000
Genexpression	6-well	320.000
Proteinexpression	6-well	150.000
Proteinphosphorylierung	6-well	200.000
Iodidaufnahme	96-well	20.000
Dio1-Aktivität	6-well	+ TSH 250.000/Ø TSH 500.000
Energiestoffwechsel	96-well (Seahorse)	12.500
IP ₁ -Akkumulation	96-well	20.000
cAMP-Akkumulation	96-well	20.000
Calcium Signalgebung	24 mm Deckgläschen	250.000

Hier wurde der 2. Depletionsschritt (**ohne TSH und ohne FCS**) auf eine Dauer von **40 h** verlängert (siehe Abbildung). Wurde die verlängerte Depletion angewendet, ist dies in der Darstellung der Ergebnisse gesondert angegeben, sonst ist immer von Standarddepletion auszugehen. Die Zellen wurden anschließend entsprechend der Fragestellung mit TSH und SDH-Metaboliten oder Kontrollliganden stimuliert (Tabelle 8).



Stimulationsschema für PCCL3 Zellkulturexperimente

Stammlösungen

TSH	1 U/ml in PBS
3-T ₁ AM	5 mM in DMSO
3-TA ₁	5 mM in DMSO
T ₀ AM	5 mM in DMSO
DMSO	100%

Hochreines 3-T₁AM und T₀AM wurden synthetisiert von Dr. R. Smits (ABX Advanced Biochemical Compounds, Radeberg). 3-TA₁ wurde freundlicherweise von Dr. T.S. Scanlan (Portland, USA) zur Verfügung gestellt. TSH und DMSO wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Aus den Stammlösungen wurden Verdünnungen im jeweiligen Inkubationsmedium der verschiedenen experimentellen Ansätze hergestellt. Dabei wurde der Kontrollprobe (je nach Versuch unbehandelte oder TSH-behandelte Probe) DMSO entsprechend der Konzentration in 3-T₁AM/3-TA₁/T₀AM-inkubierten Proben zugesetzt. In Tabelle 8 sind die Stimulationsprotokolle für alle Zellexperimente mit PCCL3 Zellen aufgelistet. Inkubationen nach TSH-/FCS-Depletion wurden in Fastenmedium + H5 durchgeführt. Da 3-T₁AM von vielen Zelltypen

MATERIAL & METHODEN

stark metabolisiert wird, was die Konzentration im Medium vermindert, wurde die 3-T₁AM Stimulation für 48-stündige Experimente nach 24 h erneuert.

Tabelle 8: TSH- und 3-T₁AM-Stimulationsschema für Experimente mit PCCL3 Zellen.

	TSH [mU/ml]	3-T ₁ AM [μM]	Inkubationszeit	Erneuerung
Versuche nach FCS-/TSH-Depletion				
Zellviabilität	0,1/0,5	1	48 h	Nach 24 h
Genexpression	0,1	0,01-1	3 h	-
Proteinexpression	0,5	1	48 h	Nach 24 h
Proteinphosphorylierung	0,5	1	15 min - 48 h	Nach 24 h
Iodidaufnahme	0,1	1	48 h	Nach 24 h
Dio1-Aktivität	0,1/0,5	1	48 h	Nach 24 h
Energiestoffwechsel	0,1-1	0,1-1	1-24 h	-
IP ₁ -Akkumulation	0,1-1	1	60 min	-
cAMP-Akkumulation	0,1-1	0,1-1	45 min	-
Hormonanalytik	0,1	1	48 h	Nach 24 h
Versuche ohne Depletion				
Calcium Signalgebung*	1	1	< 6 min	-
Hormonanalytik [#]	0	0,5/1	2,5 - 180 min	-

*Calcium-Messung in Kompletmedium inklusive FCS, [#]Hormonanalytik-Experimente in Zellen, die 24 h FCS depletiert waren, Stimulation erfolgte in Krebs-Ringer-Puffer (siehe 2.3.4).

Als Negativ- oder Positivkontrollen wurden in einigen Experimenten auch weitere Stimulanzien verwendet. Folgende Stammlösungen wurden dafür im jeweiligen Inkubationsmedium verdünnt:

Stammlösungen

Nal	10 mM in H ₂ O
Retinsäure	5 mM in DMSO
Oligomycin	2,5 mM in DMSO
Forskolin (FSK)	10 mM in DMSO
Adenosin	1 mM in PBS
Norepinephrin (Norepi)	1 mM in H ₂ O
Isoprenalin (Isop)	1 mM in PBS + 0,1% BSA
Phenylethylamin (Pea)	1 mM in PBS + 0,1% BSA

MATERIAL & METHODEN

2.3.3 Generierung funktioneller SD-Follikel aus embryonalen Stammzellen (ESC)

Stammlösungen

FCS #10270 (Gibco)	100%
ESC FCS #16141 (Gibco)	100%
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) #11140 (Gibco)	100 x
Natriumpyruvat #11360 (Gibco)	100 mM
Penicillin/Streptomycin (P/S) #15070 (Gibco)	5000 U/ml Penicillin; 5 mg/ml Streptomycin (100 x)
L-Glutamin #25030 (Gibco)	200 mM
β -Mercaptoethanol (β -ME) in PBS	50 μ l in 7 ml 1 x PBS
Vitamin C	50 mg/ml
Leukemia inhibitory factor (LIF)	1·10 ⁷ U/ml
Doxycyclin	1 mg/ml
rh TSH	1 U/ml
Trypsin #15090 (Gibco)	2,5% (intern: 50 x)
EDTA pH 8	100 mM

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) Medium I

Basis: DMEM #41965 (Sigma-Aldrich)

FCS	10% (v/v)
Natriumpyruvat	1 mM
P/S	1 x

MEF Medium II

Basis: DMEM #41965 (Sigma-Aldrich)

FCS	15% (v/v)
Natriumpyruvat	1 mM
P/S	1 x
NEAA	1 x
L-Glutamin	2 mM
β -ME in PBS	0,1% (v/v)

ESC Medium

Basis: DMEM #41965 (Sigma-Aldrich)

ESC FCS	15% (v/v)
Natriumpyruvat	1 mM
P/S	1 x
NEAA	1 x
β -ME in PBS	0,1% (v/v)
LIF	1000 U/ml

Differenzierungsmedium

Basis: DMEM #41965 (Sigma-Aldrich)

FCS	15% (v/v)
Natriumpyruvat	1 mM
P/S	1 x
NEAA	1 x
β -ME in PBS	0,1% (v/v)
Vitamin C	50 μ g/ml

Einfrrierbasismedium

FCS/ESC FCS	80% (v/v)
DMSO	20% (v/v)

MATERIAL & METHODEN

Einfriermedium speziell

Einfrierbasismedium	50% (v/v)
ESC Medium/MEF Medium I/II	50% (v/v)

2 x Trypsin

Trypsin	0,1%
EDTA pH 9	1 mM
1 x PBS	ad 250 ml

1 x Trypsin

2 x Trypsin	50% (v/v)
1 x PBS	50% (v/v)

Herstellung muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Eine trächtige Maus (C57BL/6; E14,5) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Eva Wirth) wurde unter CO₂-Begasung euthanasiert. Die Embryonen wurden entnommen und in einer Petrischale mit PBS gespült. Kopf, Gastrointestinaltrakt und rote Organe wurden entfernt. Unter aseptischen Bedingungen wurde das restliche Gewebe mittels Skalpell in kleinste Partikel zerschnitten und mit 2 x Trypsin für 30 min enzymatisch verdaut. Die Trypsinreaktion wurde mit MEF Medium I abgestoppt und die Zellen durch wiederholtes Waschen (1 x PBS) und Zentrifugieren (300 x g, 5 min, Raumtemperatur (RT)) aufgereinigt. Alle Zellpellets wurden vereinigt, in MEF Medium I resuspendiert und in einer Dichte entsprechend 2 Embryonen pro T175 Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit frischem MEF Medium I inkubiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert oder in Cryostocks zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff eingelagert (5·10⁶ Zellen/Aliquot in je 1 ml MEF-Einfriermedium I). Dafür wurden die Zellen mit 15 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml 1 x Trypsin inkubiert bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche lösten. Die Zellen wurden in MEF Medium I aufgenommen, zentrifugiert (300 x g, 3min, RT) und das Pellet im entsprechenden Medium (MEF-Einfriermedium I oder MEF Medium I) resuspendiert.

Mitoseinaktivierung von MEF

1 ml MEF (Cryostock) wurden 2-3 min im Wasserbad aufgetaut und in 9 ml MEF-Medium I überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (300 x g, 3 min, RT), in MEF-Medium I resuspendiert und in einem Volumen von 25 ml in einer T175 Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen wie oben beschrieben passagiert. Die Mitoseinaktivierung wurde durchgeführt, wenn die Zellen zu annähernd 100% konfluent waren. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass die Inkubation mit 10 µg/ml Mitomycin für

1,5 h die Zellteilung effektiv hemmte, jedoch keinen Viabilitätsverlust innerhalb einer Woche bewirkte. Nach 1,5 h Inkubation mit 10 µg/ml Mitomycin wurde das Medium entfernt, die Zellen 7-mal mit 1 x PBS gewaschen, anschließend trypsinisiert und in MEF-Einfriermedium II ($3 \cdot 10^6$ Zellen/ml/Aliquot) in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Kultur pluripotenter ESC auf mitoseinaktivierten MEF

Am Tag vor der Aussaat von ESC wurden mitoseinaktivierte MEF in MEF Medium II in 10 cm Zellkulturschalen (Nunc) ausgesät (2 Aliquots/3 Zellkulturschalen à 10 ml Medium). Nach 24 h wurden ESC in ESC Medium direkt auf den mitoseinaktivierten MEF ausgesät (1 Aliquot/2 Zellkulturschalen mit MEF à 10 ml Medium). Dafür wurde ein Aliquot ESC für 1-2 min im Wasserbad aufgetaut, zügig in 9 ml ESC Medium überführt und zentrifugiert ($300 \times g$, 3 min, RT). Das Pellet wurden in 1 ml ESC Medium resuspendiert, die Suspension auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und nach Entfernung des MEF Mediums in die Zellkulturschalen mit den mitoseinaktivierten MEF überführt. Das Medium wurde jeden Tag durch frisches ESC Medium ersetzt und die Kulturen mikroskopisch untersucht. Bei Anzeichen einer Dedifferenzierung wurden die Kulturen verworfen. Um die Zellen zu passagieren oder für die Differenzierung in *Embryoid Bodies* (EB) vorzubereiten, wurden diese einmal mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und mit 2,5 ml 2 x Trypsin pro Schale für ca. 2 min im Brutschrank inkubiert. Dabei lösten sich alle Zellen (ESC und MEF) von der Zellkulturschale. Die Reaktion wurde mit 7,5 ml ESC Medium gestoppt und die Suspension aus ESC und MEF in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation ($300 \times g$, 3min, RT) wurden die Zellen in ESC Medium resuspendiert und wieder in die Zellkulturschale überführt. Nach 30-40 min im Inkubator waren die mitoseinaktivierten MEF wieder adhärent, sodass die ESC mit dem Medium von der Schale eingesammelt werden konnten. Die ESC wurden erneut zentrifugiert und das Pellet im gewünschten Medium resuspendiert (ESC Einfriermedium für Cryostocks, ESC Medium zum Passagieren oder Differenzierungsmedium für die EB Produktion).

Differenzierung von ESC zu EB in hängenden Tropfen

A2Lox Nkx2-1-Pax8 ESC wurden wie oben beschrieben trypsinisiert und in 5 ml Differenzierungsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer Kammer unverdünnt und ohne Trypanblaufärbung gezählt. Dabei mussten übrige MEF optisch morphologisch von ESC unterschieden werden. Die Zellkonzentration der Suspension wurde

mit Differenzierungsmedium auf 40.000 Zellen/ml verdünnt. Tropfen dieser Suspension mit einem Volumen von 25 µl wurden auf die Deckel-Innenseite einer quadratischen 24,5 x 24,5 cm Zellkulturschale (#D8679-1CS, Sigma-Aldrich) pipettiert (Abb. 7). Der Boden der Schale wurde mit 50 ml 1 x PBS bedeckt, der Deckel gedreht und wieder auf den Schalenboden gesetzt. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 definiert. Die Zellen wurden bis Tag 4 in hängenden Tropfen kultiviert. Im Verlauf dieser Zeit lagerten sich die Zellen im Tropfen mit der Schwerkraft zusammen und differenzierten in EB.

Thyreozytendifferenzierung und Organisation in follikelartigen Strukturen

An Tag 4 wurden die EB mit einer 1000 µl Pipette von der Innenseite des Deckels eingesammelt und in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt. Nach ca. 5 min hatten sich alle EB am Boden des Röhrchens abgesetzt und konnten in einem Volumen von 150 µl aufgenommen und direkt in 600 µl flüssiges Matrigel (4°C) überführt werden. Die Masse aus Matrigel und EB-enthaltendem Medium wurde unter Verwendung tiefgekühlter Pipettenspitzen gemischt und zügig in einer 12-*well* Zellkulturplatte verteilt (50 µl/*well*). Nach 30 min Inkubation im Brutschrank waren die Matrigeltropfen fest genug, um sie mit 1 ml Differenzierungsmedium/*well* ± 1 µg/ml Doxycyclin (Dox) zu bedecken (Tag 4). An Tag 6 wurde das Medium inklusive Dox-Stimulation erneuert. 24 h später (Tag 7) wurde das Medium durch frisches Differenzierungsmedium ohne Dox, jedoch ± rhTSH ersetzt. Das Medium (± rhTSH) wurde ab Tag 7 an jedem 2. Tag gewechselt. Es wurden Inkubationen mit 1 oder 2 mU/ml TSH durchgeführt. Für histologische Analysen wurden die Matrigeltropfen zu Beginn in der 12-*well* Platte auf Glasdeckgläschen gesetzt. Parallel zu jeder Durchführung des Differenzierungsprotokolls wurden als Kontrollen Proben ohne Dox-Stimulation („-Dox“) und Proben mit Dox-Stimulation, aber ohne TSH („+Dox“) mitgeführt, um so die Effizienz der vollständigen Differenzierung mit Dox + rhTSH („rhTSH“) einzuschätzen.

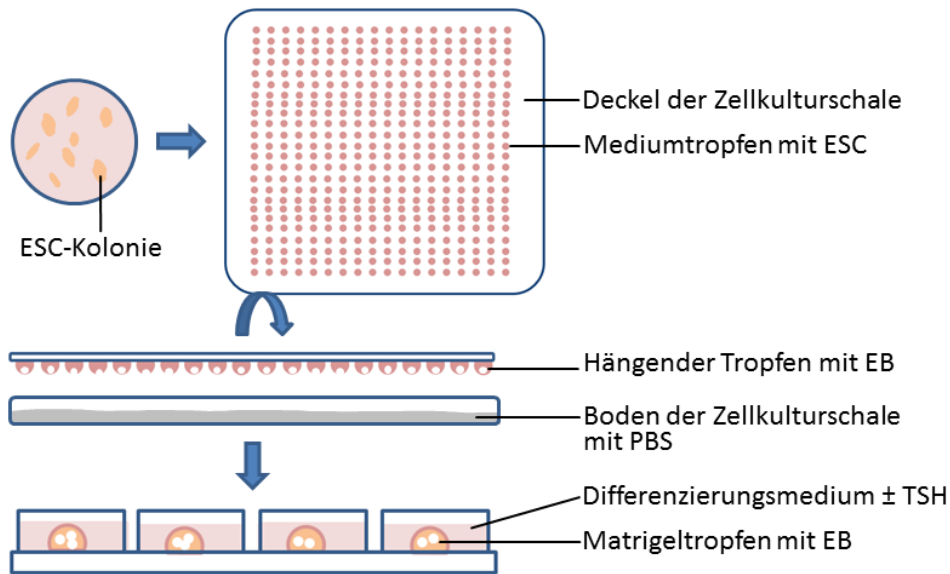


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung und Kultivierung von EB aus murinen ESC.
 ESC wurden für 4 Tage in hängenden Tropfen kultiviert. Die entstandenen EB wurden anschließend im Matrigel unter Verwendung von Doxycyclin und rhTSH zu Thyreozyten differenziert.

2.3.4. Experimente mit SD-Follikeln aus murinen Stammzellen

Murine ESC wurden wie oben beschrieben expandiert, in EB differenziert und in Matrigel überführt. Für Untersuchungen zum Effekt von 3-T₁AM auf die Genexpression in diesem Modell wurden die EB ab Tag 15 bei jedem Mediumwechsel mit 10 nM 3-T₁AM oder der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Für Hormonanalytik mittels LC-MS/MS wurden die EB im Matrigel ab Tag 21 in Serum-freiem Differenzierungsmedium kultiviert.

An Tag 23 wurde das Medium entfernt, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt. Konditionierte Überstände wurden ebenso bei -20°C gelagert.

2.3.5 Viabilitätstest mit PCCL3 Zellen

MTT-Stammlösung

MTT 0,5%
 H₂O ad 50 ml

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

MTT-Lysispuffer

HCl 12%
 Isopropanol 50 ml

Das Prinzip des verwendeten Viabilitätstests beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT durch metabolisch aktive Zellen zum dunkelblauen Formazan, welches photometrisch nachgewiesen werden kann. PCCL3 Zellen wurden wie unter 2.3.2

MATERIAL & METHODEN

beschrieben ausgesät, nach Standardprotokoll FCS- und TSH-depletiert und \pm TSH \pm T₁AM/3-TA₁/T₀AM stimuliert. Anschließend wurden in jedes *well* 20 μ l einer 5 mg/ml MTT-Stammlösung pipettiert und die Zellen mit dem MTT für 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen in 100 μ l MTT-Lysepuffer/*well* lysiert, um das entstandene Formazan freizusetzen. Die optische Dichte (OD) wurde nach 5-minütigem Schütteln bei 595 nm gemessen.

2.3.6 Analyse von 3-T₁AM-Aufnahme und -Metabolismus in Thyreozyten *in vitro*

Stammlösungen

Propylthiouracil (PTU)	10 mM in NaOH
Iproniazid	100 mM in DMSO
NaOH	1 M
DMSO	100%

10 x Stammlösung 1 Krebs-Ringer-Puffer (KRP)

NaCl	1,19 M
KCl	47 mM
KH ₂ PO ₄	11,9 mM
NaHCO ₃	0,25 M
H ₂ O	ad 250 ml

10 x Stammlösung 2 KRP

CaCl ₂ x 2H ₂ O	25,4 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	11,9 mM
HEPES	0,1 M
H ₂ O	ad 250 ml

1 x KRP

10 x Stammlösung 1	10% (v/v)
10 x Stammlösung 2	10% (v/v)
Glucose	11 mM
H ₂ O	ad 100 ml
pH 7,4	

Isopropanol/t-Butylmethylether (Isoprop/TBME)

Isopropanol	30% (v/v)
TBME	70% (v/v)

Interner Standard (IS) für Überstandsanalyse

² H ₄ -3-T ₁ AM	2 μ M
² H ₄ -T ₁ Ac	2 μ M
¹³ C ₆ -T ₄	2 μ M
¹³ C ₆ -T ₃	2 μ M
¹³ C ₆ -rT ₃	2 μ M
¹³ C ₆ -3,3'-T ₂	2 μ M

MATERIAL & METHODEN

Interner Standard (IS) für Zellextraktanalyse

$^2\text{H}_4\text{-3-T}_1\text{AM}$	2 μM
$^2\text{H}_4\text{-T}_1\text{Ac}$	2 μM
$^2\text{H}_4\text{-T}_0\text{Ac}$	2 μM
$^{13}\text{C}_6\text{-T}_4$	2 μM
$^{13}\text{C}_6\text{-T}_3$	2 μM
$^{13}\text{C}_6\text{-rT}_3$	2 μM
$^{13}\text{C}_6\text{-3,3}'\text{-T}_2$	2 μM

$^{13}\text{C}_6\text{-T}_4$, $^{13}\text{C}_6\text{-T}_3$, $^{13}\text{C}_6\text{-rT}_3$, $^{13}\text{C}_6\text{-3,3}'\text{-T}_2$ von Isosciences LLC (King of Prussia, USA); $^2\text{H}_4\text{-3-T}_1\text{AM}$, $^2\text{H}_4\text{-3-T}_1\text{Ac}$ und $^2\text{H}_4\text{-T}_0\text{Ac}$ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T.S. Scanlan (Portland, USA).

Homogenisierungspuffer

Siehe 2.5.1

Lysispuffer 1

0,1 N NaOH	50% (v/v)
Homogenisierungspuffer	50% (v/v)

Lysispuffer 2

Eisessig	30% (v/v)
Homogenisierungspuffer	70% (v/v)

Resuspensionspuffer

Methanol	50% (v/v)
HPLC H ₂ O	50% (v/v)
Ameisensäure	0,1% (v/v)

2.3.6.1 Extraktion von Thyronaminen und Thyroessigsäuren aus PCCL3 Zellen und Zellkulturüberständen

PCCL3 Zellen wurden wie unter 2.3.2 beschrieben kultiviert und nach Standardprotokoll oder verlängertem Protokoll FCS/TSH-depletiert. Am Tag des Experiments wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 3-T₁AM oder Lösungsmittel in Krebs-Ringer-Puffer inkubiert. Um die am 3-T₁AM-Metabolismus beteiligten Enzyme zu identifizieren, wurden in einem Teil der Experimente Enzyminhibitoren verwendet. Zur Hemmung von Mao wurde Iproniazid (100 μM) verwendet. Um die Aktivität der Dio1 zu inhibieren, wurden die 3-T₁AM-Inkubationen in Anwesenheit von PTU (10 μM) durchgeführt. Als entsprechende Kontrollen wurden 3-T₁AM-behandelte Zellen mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Inhibitoren coinkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellkulturüberstände gesammelt, zentrifugiert (500 rpm Eppendorf 5417R, 5min, 4°C) und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden unter Eiskühlung 3 x mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und bis zur Extraktion ebenso bei -20°C gelagert.

Die Validierung der Methode zur Analyse von SDH-Metaboliten in Zellkulturüberständen (173) wurde früher fertig gestellt als die der Zellextraktionsmethode (Richards KH *et al.*, PLOS ONE, in Revision, 2017). Aus diesem Grund wurden in dieser Doktorarbeit dargestellte

Zell- und Überstandsdaten nicht aus denselben Experimenten erhoben und die Experimente selbst, sowie die Arbeitsparameter der LC-MS/MS-Analysen unterscheiden sich leicht in ihren Konditionen. Weiterhin stand der interne Standard für T₀Ac erst im Zuge der Validierung der Zellextraktion zur Verfügung, weshalb dieser Metabolit in Überständen nicht analysiert wurde.

Zur Analyse der Konzentration von 3-T₁AM und dessen Metaboliten in Zellkulturüberständen wurden jeweils 400 µl des konditionierten KRP aus PCCL3 Zellversuchen oder konditioniertes Medium aus *in vitro* Follikeldifferenzierungen mit 5 µl IS versetzt, mit 5 µl 30% HCl angesäuert und nach 15 s Vortex-Mixen für 30 min bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Flüssig/flüssig-Extraktion wie unten beschrieben. Für die Analyse von 3-T₁AM und Metaboliten in PCCL3 Zellysaten wurden die Zellen direkt in der Zellkulturplatte bei RT lysiert. Dafür wurden 200 µl Lysispuffer 1 pro *well* hinzugefügt und 3 min unter Schütteln (600 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Lysispuffer 2 pro *well* hinzugefügt. Proben, die als Standardkurven dienten, wurden mit 95 µl eines entsprechenden Thyonamin/Thyroessigsäure-Gemisches versetzt. Alle anderen Proben erhielten 95 µl Resuspensionspuffer. 5 µl des IS-Mix wurden zu allen Proben pipettiert. Die Lysate (400 µl) wurden in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt und für 1 h unter Lichtausschluss bei 37°C inkubiert. Ab diesem Punkt wurden Zellysate und Zellkulturüberstände gleichermaßen der Flüssig/flüssig-Extraktion unterzogen. Jeder Probe wurde 1 ml Isoprop/TBME hinzugefügt und 5 min gevortext. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (2000 x *g*, 5 min, RT) getrennt und die obere Phase in ein neues 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde mit 1 ml Isopropanol/TBME wiederholt und die vereinigten organischen Phasen bei 45°C bis zur Trockne eingeengt (Eppendorf 5301 Concentrator). Das Pellet wurde in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und durch 20 s Vortex-Mixen rekonstituiert. Abschließend wurden die Proben zentrifugiert (20800 x *g*, 5 min, 4°C) und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration jedes einzelnen internen Standards betrug im finalen Extrakt 100 nM.

2.3.6.2 Analyse der Extrakte mittels LC-MS/MS

Extrahierte SDH-Metaboliten wurden von Dr. Daniel Rathmann, Dr. Eddy Rijntjes und Dr. Keith Richards (IEE) mittels LC-MS/MS unter Verwendung folgender Parameter vermessen:

MATERIAL & METHODEN

Autosampler	PAL HTC-xt Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz)
Injektionsvolumen [μ l]	20
HPLC	1260 quarternäres HPLC System (Agilent, Waldbronn)
Säule	HSS PFP 2,5 μ m 3,0 x 100 mm Säule (Waters, Milford, MA, USA)
Waschlösung 1	H ₂ O/Acetonitril/Isopropanol/Methanol (25/25/25/25) (v/v/v/v)
Waschlösung 2	H ₂ O/Methanol (50/50) (v/v)
Temperatur [°C]	40
Laufmittel mobile wässrige Phase	0,1% (v/v) Ameisensäure in H ₂ O
Laufmittel mobile organische Phase	0,1% (v/v) Ameisensäure in Methanol
Laufzeit [min]	10
Flussrate [ml/min]	0,9
Massenspektrometer	QTrap 6500 (ABSciex)
Ionenquelle	Turbo Spray IonDrive <ul style="list-style-type: none"> • positiver oder negativer Elektrospray-Ionisierungsmodus (ESI) für PCCL3 Überstandsanalyse • Positiv/negativ <i>switching</i> (+/-) ESI für PCCL3 Zellextraktanalyse
Temperatur der Ionenquelle [°C]	+ESI: 600; -ESI: 450; +/-ESI: 450
<i>Curtain</i> Gas [PSI]	45
Ionenspray Gas1/Gas2 [PSI]	55/70
Ionensprayspannung (+ESI/-ESI) [V]	4500/-4500
Eingangspotential [V]	10
Verweilzeit (<i>dwell time</i>) [ms]	10
Modus	MRM (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
Software	Analyst 1.6.2 Software, Multiquant 2.1.1 Software (ABSciex)

Substanz	PI (m/z)	Pro 1 (m/z)	Pro 2 (m/z)	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Positiver ESI						
² H ₄ -T ₁ AM	359,9	342,8	216,1	81	17	12
3-T ₁ AM	355,8	338,9	212,1	91	15	10
T ₀ AM	230,0	213,0	108,8	11	15	12
Negativer ESI						
² H ₄ -T ₀ Ac	247,0	203,1	105,9	-15	-14 (-26)	-9 (-5)
² H ₄ -T ₁ Ac	372,9	329,0	126,8	-5	-8 (-16)	-15 (-13)
T ₀ Ac	243,0	198,9	106	-10	-12 (-24)	-9 (-5)
3-T ₁ Ac	369,0	324,9	126,7	-15	-8 (-26)	-13 (-19)

m/z = Masse/Ladungs-Verhältnis, PI = Mutterion, Pro = Tochterion; DP = *declustering potential*; CE = Kollisionsenergie [V], CXP = *collision cell exit potential*.

2.3.7 Messung des zellulären Energiestoffwechsels von PCCL3 mittels Seahorse Xfe96Stammlösungen

Oligomycin	2,5 mM in DMSO
Carbonyl-Cyanid-p-Tri-fluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP)	2,5 mM in DMSO
Rotenon	2,5 mM in DMSO
Antimycin	2,5 mM in DMSO
H5	siehe 2.3.1
TSH	1 U/ml in PBS
Glucose	2,5 mM
L-Glutamin	200 mM

Assaymedium

DMEM 5030	
H5	1:100
TSH	0-1 mU/ml
Glucose	11 mM
L-Glutamin	2 mM
pH 7,4	

Mit dem Seahorse Extracellular Flux Analyzer können mitochondriale Atmung und Glykolyserate von intakten Zellen simultan über einen definierten Zeitraum gemessen werden (174). Während der Messung können über das Gerät Substanzen in das Zellkulturmedium injiziert werden, die die Stoffwechselkontrolle der Zellen beeinflussen. So können Informationen über die metabolischen Abläufe der Zellen gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden Oligomycin, FCCP, Antimycin und Rotenon verwendet. Oligomycin inhibiert die ATPase und bewirkt eine Reduktion der mitochondrialen Atmung um die Menge an O₂, die von der Zelle zuvor für die ATP-Synthese verwendet wurde. Gleichzeitig erhöht die Behandlung der Zellen mit der optimalen Oligomycinkonzentration die Glycolyserate auf ein Maximum. FCCP ist ein Entkoppler und führt dazu, dass eine Hemmung der Elektronentransportkette durch ATP entfällt und die Zellen so in ihre maximal mögliche Atmung übergehen. Antimycin und Rotenon sind Inhibitoren für Komplex 1 bzw. 3. Ihre Verwendung inhibiert den Ablauf der Elektronentransportkette und reduziert die gemessene Zellatmung auf den nicht-mitochondrialen Anteil.

PCCL3 Zellen wurden in speziellen 96-well Zellkulturplatten der Firma Seahorse/Agilent kultiviert, wie oben beschrieben TSH- und FCS-depletiert und anschließend ±TSH und 3-T₁AM stimuliert (6 Replikate pro Experiment). Vor Beginn der Messung im Extracellular Flux Analyzer wurden die Zellen für 60 min bei 37°C in einem CO₂-freien Inkubator inkubiert. Eine Sensorplatte mit Detektorsonden und sogenannten *drug delivery ports* wurde am Tag zuvor

mit Seahorse Kalibrierlösung hydriert. Die *ports* wurden mit je 25 µl der entsprechenden Substanz beladen und die Platte einer Präkalibrierung im Extracellular Flux Analyzer unterzogen, bei der die ordnungsgemäße Funktion der O₂- und pH-Sensoren überprüft wurde. Danach wurde die Zellkulturplatte ebenfalls ins Gerät überführt. Nach einer 12-minütigen Temperaturäquilibration wurden 3 OCR und ECAR Messungen in Zyklen von 3-minütigen Misch- und Messschritten durchgeführt. Jeweils nach 3 Messungen (Gesamtzeit 18 min) wurde der Inhalt eines Ports in das Medium entladen (Abfolge und Konzentration siehe Tab. 9). Als Basalwert für OCR und ECAR wurde jeweils der 3. Messpunkt jeder individuellen Seahorse Messung definiert (175). Als maximale Atmung wurde der höchste OCR-Wert jeder Messung ausgewertet. Für die Oligomycin- bzw. Antimycin-/Rotenon-abhängige Atmung wurde der jeweils niedrigste OCR-Wert der Messung ausgewertet.

Tabelle 9: Übersicht über die Beladung der *Drug Injection Ports* im Seahorse Experiment.

Port	Inhalt	Finale Konzentration im Medium
A	Oligomycin	1,5 µM
B	FCCP	0,3 µM
C	Antimycin/Rotenon	0,75 µM/1 µM
D	-	-

Proteinbestimmung mit dem Pierce Micro BCA Kit (Thermo Fischer Scientific)

Nach der Seahorsemessung wurde das Medium von der 96-*well* Platte entfernt und diese vorsichtig auf einem Zellstofftuch trocken geklopft. In jedes *well* wurden 75 µl H₂O pipettiert und die Zellen für 5 min bei RT und 900 rpm auf einem Plattenschüttler lysiert.

Folgende BSA-Standardreihe wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet:

Standard	V (BSA)	V (H ₂ O)	c (BSA) [µg/ml]
S7	150 µl Stammlösung	1350 µl	200
S6	800 µl S7	800 µl	100
S5	480 µl S6	720 µl	40
S4	600 µl S5	600 µl	20
S3	600 µl S4	600 µl	10
S2	600 µl S3	600 µl	5
S1	600 µl S2	600 µl	2,5
S0	-	600 µl	0

BSA-Stammlösung 2 mg/ml in 0,9% Kochsalzlösung und 0,05% NaN₃

150 µl jedes BSA-Standards wurden in Triplikaten in eine 96-*well* Platte pipettiert. Die Proben wurden aufgrund der limitierten Zellmenge in Unikaten vermessen. 50 µl jeder Probe wurden in die 96-*well* Platte transferiert und mit H₂O *ad* 150 µl aufgefüllt. In jedes *well* wurden anschließend 150 µl Reaktionsmix gegeben und die Platte für 2 h bei 37°C inkubiert.

Reaktionsmix:

Komponente	Anteiliges Volumen	Inhalt laut Hersteller
Reagenz A	25 Teile	Basischer Tartrat Carbonat Puffer
Reagenz B	24 Teile	BCA-Lösung
Reagenz C	1 Teil	Kupfersulfatlösung

Nach Abkühlung auf RT wurde die OD der Lysate bei 562 nm bestimmt und die Proteinkonzentration der Proben anhand der Geradengleichung der Standardkurve berechnet.

2.3.8 Analyse intrazellulärer Signaltransduktionswege in PCCL3 Zellen

2.3.8.1 Analyse der intrazellulären IP₃-Akkumulation

IP₃-Bildung wurde indirekt über den Nachweis des Abbauproduktes IP₁ mit dem IP-One ELISA der Firma CisBio gemessen. IP₃ ist transient, da es intrazellulär schnell zu IP₁ abgebaut wird. In Gegenwart von LiCl akkumuliert IP₁ in der Zelle und kann so zur indirekten Quantifizierung der IP₃-Bildung herangezogen werden. Der ELISA wurde im 96-well Format nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Assay, bei dem exogenes HRP-gekoppeltes IP₁ an einen monoklonalen IP₁-Antikörper bindet. Durch Zugabe des HRP-Substrates, kann eine Lichtreaktion gemessen werden. Endogen von den Zellen produziertes IP₁ konkurriert mit dem exogenen IP₁ um die Bindung mit dem Antikörper. Je mehr endogenes IP₁ vorhanden ist, umso weniger stark ist das Lichtsignal bei 450 nm. Das zellulär gebildete IP₁ wurde anhand einer Standardkurve quantifiziert, die bei jeder Messung mitgeführt wurde. Proben wurden in Triplikaten vermessen.

2.3.8.2 Quantifizierung der intrazellulären cAMP-Akkumulation

Stimulationspuffer

HEPES	5 mM
BSA	0,1%
IBMX	1 mM
HBSS	Ad 40 ml
pH 7,4	

Lysispuffer

HEPES	5 nM
BSA	0,1%
Tween 20	0,3%
IBMX	1 mM
pH 7,4	

MATERIAL & METHODEN

Reaktionsansatz

Zellysat	5 μ l
Anti-cAMP Acceptor-beads in LI Puffer	20 μ g/ml
Biotin-cAMP	25 nM
Streptavidin Donor- <i>beads</i> in LI Puffer	20 μ g/ml

PCCL3 Zellen wurden im 96-*well* Format kultiviert und wie unter 2.3.2 beschrieben TSH/FCS-depletiert und anschließend in Triplikaten in je 50 μ l Stimulationspuffer mit Liganden stimuliert. Der Puffer wurde entfernt um die Stimulation zu beenden und die Zellen wurden in 50 μ l Lysispuffer/*well* unter Schütteln bei 4°C lysiert. Intrazelluläres cAMP wurde mit dem AlphaScreen cAMP Assay Kit (Perkin Elmer) im 384-*well* Format gemäß den Angaben des Herstellers gemessen. Es handelte sich hierbei um einen kompetitiven Assay bei dem exogen zugegebenes biotinyliertes cAMP mit Streptavidin-gekoppelten Donor-*beads* und anti-cAMP-Antikörper-gekoppelten Akzeptor-*beads* interagiert. Dadurch kommen sich die Donor- und die Akzeptor-*beads* räumlich nah genug um eine Lichtreaktion auszulösen. Das biotinylierte cAMP wird durch endogen produziertes cAMP verdrängt. Je mehr endogenes cAMP im Ansatz vorhanden ist, umso weniger Licht wird demnach emittiert. Die Quantifizierung von endogenem cAMP erfolgte anhand einer cAMP-Standardkurve, die bei jeder Messung mitgeführt wurde.

2.3.8.3 Analyse intrazellulären freien Calciums in PCCL3 Zellen

Ringer-ähnliche Lösung

NaCl	150 mM
CsCl	6 mM
CaCl ₂	1,5 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
pH 7,4	

PCCL3 Zellen wurden für 24 h auf Deckgläschen kultiviert (siehe 2.3.2). Die Analyse des intrazellulären Ca²⁺ Signals wurde in Kooperation mit PD Dr. Stefan Mergler (Experimentelle Ophthalmologie, Charité) durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit dem Calciumindikator Fura2/AM beladen. Dafür erfolgte eine Vorinkubation mit 2 μ M Fura in Zellkulturmedium für 15-45 min. Anschließend wurden die Zellen mit Ringer-ähnlicher Lösung gespült und mit 1 μ M 3-T₁AM +/-20 μ M TRPM8/TRPV1 Blocker 4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazin-carboxamid (BCTC, Tocris Bioscience) auf einem invertierten Mikroskop stimuliert. Das Mikroskop war an das digitale *Imaging-*

system angeschlossen. Fura2-Fluoreszenz wurde abwechselnd bei 340 und 380 nm angeregt und die Emission bei 510 nm gemessen. Das Verhältnis der Fluoreszenz bei 340 nm und 380 nm wurde als Angabe der relativen freien cytosolischen Calciumkonzentration verwendet (153). Die Messung des intrazellulären Calciums wurde größtenteils von Stefan Mergler durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

RNA Isolierung mit dem Aurum Total RNA Kit (Bio-Rad)

Die RNA Isolierung aus *in vitro* Follikeln, Maus-SD, -hypophysen und aus PCCL3 Zellen wurde mit dem Aurum total RNA Kit von BioRad gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei erfolgte die Aufreinigung der RNA nach Homogenisierung und Lyse der Gewebe oder Zellen über RNA-bindende Säulen und verschiedene Waschschrte. Das Verfahren enthält einen DNaseI Verdau, der direkt auf der Säule durchgeführt wurde. Die aufgereinigte RNA wurde in 30-50 µl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers von der Säule eluiert.

RNA-Isolierung aus Mausgewebe mit Trizol

DEPC H₂O
DEPC 0,1% (v/v)
H₂O ad 1 l

Das mit DEPC versetzte Wasser wurde für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert, um RNasen zu inaktivieren. Verbliebenes DEPC wurde durch Autoklavieren zersetzt.

RNA aus Lebergewebe wurde mit Trizol und Chloroform extrahiert. Zunächst wurden die Gewebestücke unter Trockeneiskühlung pulverisiert. Je ein tiefgefrorenes Gewebestück wurde in einer Kugelmühle fein zerkleinert. Es wurden ca. 100 mg Gewebepulver für die RNA-Isolierung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 ml Trifast (Trizol) sowie eine Teflonkugel hinzugegeben. Im *Tissue Lyser* wurde das Gewebepulver für 5 min bei einer Geschwindigkeit von 15 rpm lysiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und alles für 15 s bei 15 rpm im *Tissue Lyser* gemischt. Das Lysat wurde für 2-3 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei RT zentrifugiert. Dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten bei 12000 x g. Die entstandene obere wässrige Phase wurde in 500 µl eisgekühlten Isopropanol überführt, gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C inkubiert. Die im Pellet präzipitierte RNA wurde 2 x mit

MATERIAL & METHODEN

1 ml 75% EtOH durch wiederholtes Resuspendieren und Zentrifugieren bei 4°C gewaschen. Nach dem 2. Waschschrift wurde das Pellet getrocknet und in DEPC-H₂O resuspendiert.

Entfernung genomischer DNA aus RNA-Präparationen nach Trizol/Chloroform-Extraktion

Wurde RNA mit der Trizol/Chloroform-Methode extrahiert, wurde anschließend ein DNase Verdau durchgeführt, um genomische DNA aus dem Ansatz zu entfernen. Dazu wurde das RQ1 RNase freie DNase-Kit von Promega gemäß Herstellerangaben verwendet.

Reaktionsansatz

RNA	1 µg
RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 µl
RNase-Free DNase 1U/µg RNA	1 µl
H ₂ O	Ad 10 µl

Die Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurde 1 µl der im Kit enthaltenen Stop Solution (enthält 20 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetat (EGTA)) zu den Reaktionsansätzen gegeben und diese anschließend für 10 min bei 65°C inkubiert.

RNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop

Mittels NanoDrop Spektrophotometer wurde die RNA-Konzentration in 1 µl der RNA-Lösung ermittelt. Neben der RNA-Konzentration wurden die Absorptionsverhältnisse von 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm bestimmt um die Reinheit der RNA einschätzen zu können.

Überprüfung der RNA-Integrität durch Formaldehyd-3-(*N*-morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Agarosegelelektrophorese

5x RNA Probenpuffer

Bromphenolblau	1 Spatelspitze
Formaldehyd	7,2% (v/v)
Formamid	30,84% (v/v)
0,5 M EDTA pH 8,0	8% (v/v)
20 x MOPS Puffer	20% (v/v)
Glycerol	20% (v/v)
DEPC H ₂ O	Ad 10 ml

20 x MOPS Puffer

MOPS	400 mM
NaOAc	100 mM
NaOH	85 mM
EDTA	10 mM
pH 7,0	

MATERIAL & METHODEN

1 x MOPS Puffer

20 x MOPS Puffer	5% (v/v)
H ₂ O	ad 1 l

MOPS Gel

Agarose	1 g
H ₂ O	90 ml
20 x MOPS Puffer	6,5 ml
37% Formaldehyd	10,5 ml
Ethidiumbromid	6 µl

Agarose wurde zunächst in Wasser aufgekocht und abgekühlt, anschließend wurden alle anderen Komponenten hinzugefügt.

Die Integrität der isolierten RNA wurde stichprobenartig zusätzlich zur photometrischen Analyse mittels MOPS-Gelelektrophorese überprüft. 1 g Agarose wurde in 90 ml H₂O aufgekocht, abgekühlt, mit MOPS Puffer, Formaldehyd sowie Ethidiumbromid versetzt und in eine Flachbettkammer mit eingesteckten Probenkämme gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1 x MOPS Puffer bedeckt. Die aufzutrennende RNA-Probe wurde mit 5 x RNA Probenpuffer versetzt und für 3-5 min bei 65°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in die Geltasche pipettiert. Die Proben wurden bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennte RNA im Gel wurde mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Reverse Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA)

Die isolierte RNA wurde unter Verwendung des iScript cDNA Synthesis Kits (BioRad) gemäß den Herstellerangaben in stabilere cDNA umgeschrieben. Generell wurden 500 ng RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt. In die reverse Transkription von RNA aus Maus-SD wurden aufgrund der geringen Ausbeute der RNA-Isolierung und der hohen Abundanz der SD-spezifischen Gene nur 250 ng RNA eingesetzt. Das entsprechende Volumen der RNA-Präparation wurde mit nukleasefreiem H₂O *ad* 15 µl aufgefüllt, mit 1 µl iScript *Reverse Transcriptase* und 4 µl 5 x *iScript Reaction Mix* versetzt und in einem PCR-Cycler inkubiert (5 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min bei 85°C).

MATERIAL & METHODEN

qPCR

Primerübersicht für die Analyse von Maus-mRNA:

Gene	Sequenz Vorwärtsprimer	Sequenz Rückwärtsprimer	Accession-Nr.
<i>Hprt1</i>	TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT	GGCCAGACTTTGTTGGATTTG	NM_013556.2
<i>18S</i>	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	GCACCACCACCCACGGAATCG	NR_003278
<i>Slc5a5 (Nis)</i>	AAGTGACCGGGTTGGACATC	ATCAGGTTGATCCGGGAATG	NM_053248.2
<i>Tg</i>	TGTGGCCAGCATAACCTTC	TGGCGGAGACATGATACCAC	NM_009375.2
<i>Slc26a4 (Pds)</i>	CTATGGGGCCAACCTGGAAA	GTCATGCTTGGTGGCGTAGA	NM_011867.3
<i>Tpo</i>	CAGCGGTACACACCTTGTGG	AGGGTTCACAGTGGGGTTGT	NM_009417.3
<i>Tshr</i>	CCTTGACAGAGCTCCCCCTG	ATTGCATAGGCCCTGGAATG	NM_011648.5
<i>Duox2</i>	GAAAGGCTGTGACCAAGCAG	GAGGCC TAGGGAGTCAGCAA	NM_177610.2
<i>Tshb</i>	GGGTATTGTATGACACGGGATA	ATTTCCACCGTTCTGTAGATGA	NM_009432.2
<i>Trhr</i>	GCCACTGTGCTTTATGGATT	CCATAAAAGGGCAAACAGAA	NM_013696.2
<i>Trhde</i>	ATGCTGCTATGGAGAACTGG	CCTTCAACCACACATCTTCC	NM_146241.2
<i>Dio1</i>	CACAGCCGATTTCTCATCA	GCTGCTCTGGTTCTGCATTG	NM_007860.3
<i>Dio2</i>	CTCCAAC TGCCTCTTCCTGG	GACGTGCACCACACTGGAAT	NM_010050.2
<i>Thrb</i>	GGACTCTGACTTGGACATGG	GCTTTGTCCCCACACACTAC	NM_009380.3
<i>Tbp</i>	TGTACCGCAGCTTCAAAATATTGTAT	AAATCAACGCAGTTGTCCGTG	NM_013684.3
<i>Nkx2-1</i>	GGCGCCATGTCTTGTTCCT	GGGCTCAAGCGCATCTCA	NM_009385.3
<i>Pax8</i>	CAGCCTGCTGAGTTCCTCCAT	CTGTCTCAGGCCAAGTCCTC	NM_011040.4
<i>Foxe1</i>	GGCGGCATCTACAAGTTCAT	GGATCTTGAGGAAGCAGTCG	NM_183298.1
<i>Sult1a1</i>	GCCCCACGGATCATTAAGAC	CCAAGAAGCTTTCCAGGTG	NM_133670.1
<i>Ugt1a1</i>	GGATCTTCTGAGCCCTGCAT	TGGCTTTCTTCTCCGGAATC	NM_201645.2
<i>Spot 14</i>	CAGTCATGGATCGGTACTCC	TCTTGAGCATGGTGAAGTAGG	NM_009381.3
<i>Mct8</i>	CCTCGCTATGGGCATGATCT	TGGTTGAAAGGCGAATGAGC	NM_009197.2
<i>Ano1</i>	AGGAATATGAGGGCAACCTG	CGACACCATGGATTTTGGTA	NM_178642.5
<i>Dio3</i>	CTACATCGAGGAAGCCCACC	TGACGTAGAGGCGCTCAAAA	NM_172119.2

Primerübersicht für die Analyse von Ratten-mRNA:

Gen	Sequenz Vorwärtsprimer	Sequenz Rückwärtsprimer	Accession-Nr.
<i>Hprt</i>	TTATGGACAGGACTGAAAGACTTG	CAGCAGGTCAGCAAAGAACTTATA	NM_012583.2
<i>Nis</i>	GGCCTTACCAGCACCTACCA	AGATGTCCAACCCGGTCACT	NM_052983.2
<i>Tg</i>	ACGCTCTTGGAGGAACTCA	CCCCTTCCACATCCCATAGA	NM_030988.2
<i>Pds</i>	TCCCGGTGAAAGTGAATGTC	TGGCATCATGAACTGTCAGG	NM_019214.1
<i>Tpo</i>	TTGGATCTGGCATACTGAACTT	ATCTTGTTGACCATGCTTCTGTTG	NM_019353.2
<i>Tshr</i>	CTGCAAGGAACTCCACCAAATC	AAGGCATCAGGGTCTATGTAAGTC	NM_012888.1
<i>Duox1</i>	GCCCTTGAGAGAACCCTACC	AGCCTGGTGTTCACACTC	NM_153739.1
<i>Dio1</i>	TTTAAGAACAACGTGGACATCAGG	GGTTTACCCTTG TAGCAGATCCT	NM_021653.3
<i>Dio2</i>	TGACTCGGTCAATCTGCTCA	CACACTGGAATTGGGAGCAT	NM_031720.3
<i>Maoa</i>	TACTTGCCCGAAAGCTGAT	CCCGGAGTACTGCTCCTCAC	NM_033653.1
<i>Maob</i>	TTCATGCCATTTGGGAAGATT	GATGGTGGTCAATCCA	NM_013198.1
<i>Glut1</i>	AGCCTGTGTATGCCACCATC	AGGACCAGGGCCTACTTCAA	NM_138827.1
<i>Dio3</i>	AGCTGTACCTGACCACCGTT	TGACACGGTCTTCCAAGCTG	NM_017210.4
<i>Slc7a1</i>	ACGGGCTCAGCCTACCTCTA	ACGCGAGAACTCTCCGATGG	NM_013111.3
<i>Slc16a7</i>	AACAAGTGGCTAATGCGGCT	TCCGGAGGAAGTGGGAATGG	NM_017302.2
<i>Slc17a5</i>	CGGCGGGAAACGATGATGAG	TCCACTAGCGCCACACTCAG	NM_001009713.2
<i>Slco4a1</i>	ACACGCTGGGTGTCACGTAT	ACAGTGGGCTGTCAGTGGTC	NM_133608.2
<i>Slc29a2</i>	ACATCATGGCGCACGGAAAC	TGTGGGACTGGTGTGGTTGG	NM_031738.1
<i>Slc31a1</i>	CCTCACACTCCCACGAGATGA	TTTCGAAGCAGACCCCTCTCGG	NM_133600.1
<i>Slco4c1</i>	GGCAGGTACCCCCATAACTGT	GGCCCAGGTATCGTGCC TAA	NM_001002024.1
<i>Slc43a3</i>	CCCCGGAGAGCAAAGCTGTA	GTGAGGGCTTCTGGGCTAGG	NM_001107743.1
<i>Mct10</i>	GCATTGGCGTCACTTCAGGG	GGACGTCAGGCCGATGAAGA	NM_138831.1
<i>Lat1</i>	GTGTGAAGGCTGCTACCCGT	ACACAATGTTCCCCACGTCCA	NM_017353.1
<i>Lat2</i>	GGCCACCCGGGTTCAAGATA	CGAGGCCGATGTCTGGTTCT	NM_053442.1
<i>Mct8</i>	TACCGTATCTGGGCCTTTGG	CTGATGTGGCCTGAGACGAG	NM_147216.1

Die qPCR ermöglicht es im Gegensatz zur herkömmlichen PCR nicht nur beliebige DNA-Abschnitte zu vervielfältigen, sondern diese Abschnitte zeitgleich zu quantifizieren, um Aussagen über die Menge eines aktiven Gens in der untersuchten Probe zu erhalten.

Die wie beschrieben hergestellte cDNA aus *in vitro* oder *in vivo* Versuchen wurde 1:20 mit nukleasefreiem H₂O verdünnt. Je 5 µl dieser Verdünnungen wurden in Duplikaten auf eine qPCR 96-well Platte aufgetragen. In die entsprechenden wells der Platte wurden dann 20 µl des Reaktionsmixes mit für das Zielgen spezifischen Primern gegeben. Um die Menge des amplifizierten Produktes quantifizieren zu können, wurde dem unten beschriebenen Reaktionsansatz *SybrGreen* zugesetzt, ein Farbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert und daraufhin fluoresziert. Die qPCR erfolgte im BioRad Connect Cycler nach folgendem Programm: 1. Initiale Denaturierung und Aktivierung der Polymerase: 15 min 95°C; 2. Denaturierung 30 s 95°C; 3. Annealing: 40 s 62°C; 4. Elongation 25 s 72°C. Schritte 2-4 wurden zyklisch 40-mal wiederholt.

qPCR Reaktionsmix

Sybr Green	12,5 µl
Template	5 µl
Vorwärtsprimer	0,25 µl
Rückwärtsprimer	0,25 µl
Nukleasefreies H ₂ O	Ad 25 µl

Auswertung der qPCR

Sybr Green lagert sich zwischen die Basen doppelsträngiger DNA und wird so zur Fluoreszenz angeregt. Unter Annahme 100%-iger Effizienz verdoppelt sich mit jedem Zyklus der qPCR die DNA-Produktmenge und dementsprechend auch das Fluoreszenzsignal. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig ein festgelegtes Fluoreszenzniveau übersteigt (Beginn der exponentiellen Phase der PCR), wird als *cycle of threshold* (Ct)-Wert bezeichnet. Da an diesem Punkt ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen der Ausgangsmenge des Zielgens und der vervielfältigten Produktmenge besteht, kann der Ct-Werte für eine quantitative Aussage über die Ausgangsmenge des Zielgens herangezogen werden. Die Expression von Zielgenen wurde auf nicht regulierte Referenzgene normalisiert. Für Analysen von Zellkulturproben wurde die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (*Hprt*) als Referenzgen verwendet. Daten aus Tierversuchen wurden auf 2 Referenzgene (*18S* und *Hprt*) normalisiert. Daten aus *in vitro* Follikeln wurden auf TATA *box-binding protein* (*Tbp*) normalisiert.

Für die Auswertung mit einem Referenzgen wurde die $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode verwendet. Wurden 2 Referenzgene verwendet, so wurde folgende modifizierte Formel verwendet (176):

$$n - \text{fache Induktion} = \frac{2^{\Delta Ct \text{ Zielgen}}}{\sqrt{2^{\Delta Ct \text{ Hprt1}} \times 2^{\Delta Ct \text{ 18S}}}}$$

Die Berechnung wurde an die jeweilige Effizienz des verwendeten Primerpaares angepasst.

2.4.2 Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Spezifität der qPCR-Produkte

10 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

Tris	0,5 M
Natriumacetat	0,2 M
EDTA	0,02 M
H ₂ O	ad 1 l
pH 8,0	

1 x TAE-Puffer

TAE-Puffer (10 x)	10% (v/v)
H ₂ O	ad 1 l

2% Agarosegel

Agarose	2% (w/v)
1 x TAE-Puffer	ad 150 ml

Die Lösung wurde in der Mikrowelle aufgekocht, im Wasserbad auf ca. 60°C abgekühlt und anschließend mit 5 µl Ethidiumbromidlösung/100 ml versetzt.

6 x DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Glycerol	30% (v/v)
H ₂ O	ad 10 ml

Primerspezifität und Größe der qPCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Ethidiumbromid-haltige 2% Agarosegellösung wurde in eine Flachbettkammer gegossen, Probenkämme wurden an entsprechender Stelle eingesteckt und das Gel ca. 20 min polymerisiert. Das ausgehärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt und vollständig mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. 25 µl Probe aus der qPCR-Analyse wurden mit 5 µl 6 x Ladepuffer versetzt, gemischt und 20 µl des Ansatzes in die Geltasche pipettiert. Um die DNA-Fragmentlänge zu bestimmen, wurde bei jeder Elektrophorese ein Längenstandard mitgeführt. Die Proben wurden im Agarosegel bei 120 V für ca. 50 min aufgetrennt. Zur Visualisierung mit dem *Alpha Imager System* wurde die Fluoreszenz von Ethidiumbromid, das in die doppelsträngige DNA interkaliert, genutzt.

2.4.3 Analyse des Transkriptoms von PCCL3 Zellen

PCCL3 Zellen wurden kultiviert und RNA wie oben beschrieben extrahiert. Alle weiteren Schritte wurden in einer Kooperation von Janine Golchert (Universität Greifswald) durchgeführt. Eventuell verbliebene Verunreinigungen durch genomische DNA wurden mittels DNase Verdau aus der RNA-Präparation entfernt. Nach einem Aufreinigungsschritt wurde die Integrität der RNA mittels Bioanalyzer überprüft. Die *RNA Integrity Number (RIN)* lag für alle Proben über 9,0. Mittels *Affymetrix GeneChip® Rat 1.0 ST Array* wurde die Transkriptomanalyse nach Herstellerangaben durchgeführt und die Daten mittels *Rosetta Resolver Software* ausgewertet.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Western Blot

Stammlösungen

EDTA pH 8,0	0,5 M
SDS	20% (w/v)
Bromphenolblau	1% (w/v)
Ammoniumpersulfat	10% (w/v)
Tris HCl pH 6,8 oder 7,5	1 M
Gel A	30% Acrylamid
Gel B	2% Bisacrylamid

Homogenisierungspuffer

Saccharose	250 mM
HEPES	20 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
pH 7,4	

Trenngelpuffer

Tris HCl pH 7,5	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)
H ₂ O	ad 250 ml
pH 8,8	

Sammelgelpuffer

Tris HCl pH 6,8	0,5 M
20 % SDS	0,4%
H ₂ O	ad 100 ml
pH 6,8	

20% Gellösung

Gel A	162,3 ml
Gel B	65 ml
H ₂ O	ad 250 ml

MATERIAL & METHODEN

4 x Probenpuffer mit DTT

Tris HCl pH 7,5	200 mM
Glycerol	40% (v/v)
SDS	4% (w/v)
Bromphenolblau	0,04% (w/v)
DTT	125 mM
H ₂ O	ad 10 ml

4 x Probenpuffer mit β -ME

Tris HCl pH 7,5	200 mM
Glycerol	40% (v/v)
SDS	16% (w/v)
β -ME	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,02% (w/v)
H ₂ O	ad 10 ml

10 x SDS Laufpuffer

Glycin	1,92 M
Tris	0,25 M
SDS	1%
H ₂ O	ad 2 l

10 x Transferpuffer

Tris	250 mM
Glycin	1,5 M
H ₂ O	ad 1 l

1 x Transferpuffer

10 x Transferpuffer	10% (v/v)
Methanol	10% (v/v)
H ₂ O	ad 1 l

20 x Ponceau S

Ponceau S	5% (v/v)
Eisessig	5% (v/v)
H ₂ O	ad 500 ml

1 x Ponceau S

20 x Ponceau S	2% (w/v)
Eisessig	10% (v/v)
H ₂ O	ad 500 ml

10 x PBS

Siehe 2.3.1

1 x PBS-T

10 x PBS	10% (v/v)
Tween	0,1% (v/v)
H ₂ O	ad 1 l

Blockierlösung

Magermilchpulver oder BSA	5% (w/v)
1 x PBS-T (0,1%)	ad 100 ml

Herstellung von Proteinlysaten

Nach Ablauf der Inkubationszeit eines Zellexperiments wurde das Medium von den Zellen entfernt, jedes *well* zweimal mit 1 x PBS gewaschen und Homogenisierungspuffer hinzugefügt (100-250 μ l, je nach Größe des Formats). Die Zellen wurden unter Eiskühlung lysiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Um die Zellen aufzuschließen, wurden die Lysate unter Eiskühlung 12-mal sonifiziert (Stärke 100%; 0,6). Die Membranfraktion der Proben wurde angereichert, indem die Lysate bei 13000 x *g* für 15 min bei 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand, entsprechend der Cytosolfraktion, wurde abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet mit der angereicherten Membranfraktion wurde in der gewünschten Menge Homogenisierungspuffer resuspendiert und noch einmal wie oben angegeben sonifiziert. Zur Herstellung von Gesamtproteinlysaten wurden die Lysate lediglich sonifiziert und direkt in den Assay eingesetzt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung aus Zelllysaten erfolgte nach der Methode von Bradford mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 (177). Der Farbstoff bildet im sauren Milieu Komplexe mit Seitenketten von Proteinen, was eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums nach 595 nm zur Folge hat, die photometrisch gemessen werden kann. Die Messung erfolgte in einer durchsichtigen 96-*well* Flachbodenmikrotiterplatte. Zunächst wurde eine BSA-Standardreihe in Duplikaten in die Platte pipettiert. Anschließend wurden 5 μ l der unverdünnten Proben ebenfalls in Duplikaten aufgetragen. 200 μ l einer 1:5 in H₂O verdünnten Bradfordlösung wurden in jedes *well* pipettiert. Nach 5minütiger Inkubation auf einem Plattenschüttler (500 rpm, RT) wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt.

μ l BSA-Stammlösung	BSA [μ g]	H ₂ O
10	13,8	ad 200 μ l
7,5	10,35	
5	6,9	
2,5	3,45	
2	2,76	
1	1,38	
0	0	

BSA-Stammlösung 1,38 μ g/ μ l.

Probenaufbereitung und Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach Größe und unabhängig von ihrer Ladung aufzutrennen, wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Trenn- und Sammelgel wurden wie folgt gegossen:

<u>Trenngel</u>	10%	12,5%
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
20% Gellösung	5 ml	6,25 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml
Temed	10 µl	10 µl
H ₂ O	ad 10 ml	ad 10 ml

<u>Sammelgel</u>	5%
Sammelgelpuffer	1 ml
20% Gellösung	1 ml
10% APS	40 µl
Temed	4 µl
H ₂ O	ad 4 ml

Zwei Glasplatten wurden mit Isopropanol gereinigt und in die Western Blot Gelapparatur gespannt. Zunächst wurde das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 5 cm gegossen und mit wenig Isopropanol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde die Isopropanolschicht entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein Probenkamm wurde von oben zwischen die Glasscheiben gesteckt und das Gel zum Polymerisieren für ca. 1 h bei Raumtemperatur belassen.

Die Proteinlysate wurden entsprechend einer Menge von 25 µg Protein mit H₂O auf ein maximales Volumen von 33 µl verdünnt und mit 4 x Ladepuffer versetzt. Für die Analyse der Nis-Expression wurde Dithiothreitol (DTT)-Ladepuffer verwendet und die Proben für 10 min bei 40°C denaturiert. Für alle anderen Proteine wurde β-ME Ladepuffer verwendet und die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt, um sie zu denaturieren.

Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

Eine Nitrocellulosemembran und 2 Filterpapiere (Whatman) wurden in 1 x Transferpuffer äquilibriert. Auf der Anodenplatte des Blotgeräts wurden von unten beginnend ein Filterpapier, die Membran, das SDS-Gel und ein weiteres Filterpapier übereinander gelegt. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und der Transfer der Proteine erfolgte 40 min bei 18 V.

Immunologischer Nachweis der Proteine

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S, einer unspezifischen Proteinfärbung, sichtbar gemacht, um zu prüfen, ob der Transfer von Proteinen auf die Membran gleichmäßig erfolgt ist. Die Membran wurde in 1 x PBS-T wieder entfärbt und für 1 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt um unspezifische potentielle Bindestellen für Antikörper abzusättigen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (verdünnt in Blockierlösung) gegen das zu analysierende Protein erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Nach der Erstantikörperinkubation wurde die Membran 3 x 10 min mit 1 x PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem Zweitantikörper in Blockierlösung inkubiert. Es folgten 3 10minütige Waschschrte in PBS-T. Zum Sichtbarmachen des immunologischen Signals wurde die Membran für 1 min mit einer 1:1 Mischung aus ECL Reagenz 1 und 2 (Pierce) benetzt, überschüssiges Reagenz entfernt und in der Dunkelkammer ein Film für 1-60 min aufgelegt. Der Film wurde entwickelt, fixiert und eingescannt. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mittels Image J im nicht komprimierten Dateiformat (Tiff).

2.5.2 Iodidaufnahme-Assay in PCCL3 Zellen

HBSS

HBSS Pulver, #H1387 Sigma-Aldrich	9,7 g
HEPES	10 mM
ddH ₂ O	ad 1 l
pH 7,2	

Nal Inkubationspuffer

Basis: HBSS	
Nal	10 µM
BSA	0,1 % (w/v)

Perchlorat Inhibitions-puffer

Basis: HBSS	
Nal	10 µM
BSA	0,1 % (w/v)
NaClO ₄	100 µM

Ceriumlösung

(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄	25 mM
H ₂ SO ₄	0,5 M
ddH ₂ O	ad 40 ml

Arsenitlösung

Na ₃ AsO ₃	25 mM
H ₂ SO ₄	0,5 M
NaCl	0,2 M
ddH ₂ O	ad 40 ml

PCCL3 Zellen wurden wie unter 2.3.2 beschrieben ausgesät und entweder mittels Standard- oder verlängertem Protokoll von FCS und TSH depletiert. Anschließend erfolgte die Stimulation \pm TSH \pm 3-T₁AM/T₀AM/3-TA₁/1 μ M NaI/0,1 μ M NaI/Retinsäure (RA). Nach 48 h Inkubation wurde das Medium vollständig von den Zellen abgesaugt, diese mit 200 μ l 1 x PBS gewaschen und 20 min mit 10 μ M NaI inkubiert. Je zwei *wells* jeder Stimulation wurden parallel mit NaI und 100 μ M NaClO₄ inkubiert, um die Nis-spezifische Iodidaufnahme zu hemmen. Nach der 20-minütigen Inkubation wurde die 96-*well* Platte auf eine eisgekühlte Metallplatte gestellt, um den Iodidtransport zu unterbinden. Das NaI-haltige Inkubationsmedium wurde abgesaugt und die Zellen schnell mit 150 μ l eiskaltem PBS/*well* und 200 μ l eiskaltem H₂O gewaschen. Jedes *well* wurde mit 50 μ l H₂O befüllt, um das Iodid aus den Zellen freizusetzen. Das freigesetzte Iodid wurde mit Hilfe der Sandell-Kolthoff-Reaktion nachgewiesen und quantifiziert (178, 179). Dafür wurden 50 μ l Ceriumlösung und 50 μ l Arsenitlösung in jedes *well* pipettiert und die OD bei 415 nm sofort und nach 20 min gemessen. Die Δ OD 20 min-1min wurde für jedes *well* berechnet und für jede Stimulation die Δ OD der jeweiligen Perchloratkontrolle subtrahiert um den Wert der spezifischen Nis-vermittelten Iodidaufnahme zu erhalten. Die Aufnahme wurde prozentual im Vergleich zur maximalen TSH-abhängigen Iodidaufnahme dargestellt.

2.5.3 Aktivitätsmessung der Dio1 in PCCL3 Zellen

Stammlösungen

K ₂ HPO ₄	1 M
KH ₂ PO ₄	1 M
Essigsäure	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
DTT	1 M
PTU	10 mM

Homogenisierungspuffer

Siehe 2.5.1

1 M KPO₄ Puffer

1 M K ₂ HPO ₄	49,7% (v/v)
1 M KH ₂ PO ₄	50,3% (v/v)
EDTA pH 8,0	10 mM

Die Enzymaktivität der Dio 1 wurde über den Nachweis des aus rT₃ durch Deiodaseaktivität freigesetzten Iodids bestimmt (180). Gesamtlysat aus PCCL3 Zellen wurde wie unter 2.5.1 beschrieben hergestellt. Die Lysate wurden wie folgt verdünnt:

MATERIAL & METHODEN

	Zu vermessende Probe	PTU-Kontrolle
PCCL3-Lysat	7,5 µl	7,5 µl
10 mM PTU	-	10 µl
1 mM DTT in Homogenisationspuffer	Ad 50 µl	Ad 50 µl

50 µl eines Substratmixes wurden zu jeder Probe sowie zu den PTU-Kontrollen gegeben und die Reaktionsansätze für 2 h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert:

Substratmix	1x
KPO ₄ Puffer pH 6,8	10 µl
Verdünnte Probe	7,5 µl
1 mM rT ₃	1 µl
1 M DTT	4 µl
H ₂ O	Ad 50 µl

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Reaktionsansätze gleichzeitig auf Trockeneis schockgefroren, um die Deiodase-Reaktion zu beenden. Die Proben wurden aufgetaut und über Dowex-Säulen von rT₃ und dessen Metaboliten gereinigt. Dazu wurden die Säulen zunächst 1 x mit je 150 µl 50% Essigsäure und anschließend 3 x mit je 150 µl 10% Essigsäure mit Hilfe einer Vakuumpumpe gespült. Anschließend wurden die Säulen mit je 75 µl Reaktionsansatz und 150 µl 10% Essigsäure beladen und mittels Vakuum eluiert. Die Eluate wurden anteilig in einer Verdünnung von 1:4 in 10% Essigsäure in einem Gesamtvolumen von 50 µl pro well auf eine 96-well Platte übertragen. Es folgte der Iodidnachweis mittels Sandel-Kolthoff-Reaktion wie bereits unter 2.5.2 beschrieben.

2.6 Immunhistochemische Analysen von Gewebeschnitten und *in vitro* Follikeln

2.6.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und manuelle morphologische Analysen

Stammlösungen

Dinatriumhydrogenphosphat	0,2 M
Natriumdihydrogenphosphat	0,2 M

Natriumphosphatpuffer (0,2 M)

0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat	80% (v/v)
0,2 M Natriumdihydrogenphosphat	20% (v/v)
pH 7,4	

Hämatoxylinlösung

Mayer's Hämatoxylin (Chroma, Münster)	0,2% (w/v)
Kalialaun	6,25% (w/v)
Chloralhydrat	6,25% (w/v)
Zitronensäure	0,125% (w/v)
NaIO ₃	0,025% (w/v)

MATERIAL & METHODEN

Eosinlösung

Eosin Yellowish (Chroma, Münster)	1,25% (w/v)
EtOH	70% (v/v)
Eisessig (direkt vor Gebrauch)	4% (v/v)

Jeweils ein SD-Lobus wurde mitsamt der Trachea präpariert, in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend in Natriumphosphatpuffer gewaschen. Die fixierten Gewebe wurden in Paraffin gebettet, mit dem Mikrotom in 5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger aufgezogen. Die Paraffinschnitte wurden auf einer Heizplatte für 20 min bei ca. 60°C geschmolzen. Nachdem die Schnitte wieder abgekühlt waren, wurden sie in Xylol überführt und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe entwässert (2 x 10 min Xylol, 3 min 100% Ethanol, 3 min 96% Ethanol, 3 min 70% Ethanol, 3 min 40% Ethanol, Spülen in H₂O). Zur Färbung basophiler Strukturen wie Zellkernen wurden die Schnitte 3 min in einer Hämatoxylinlösung inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Hämatoxylin mit Leitungswasser abgespült und die Schnitte 5 min unter Leitungswasser gebläut. Um azidophile Zellstrukturen rot zu färben wurden die Präparate für 1 min in Eosin-Lösung inkubiert und im Anschluss mit H₂O gespült. Die Schnitte wurden über eine aufsteigende Ethanolreihe in die Xylollösung überführt und dann mit Entellan eingedeckt.

Manuelle Analyse der Morphologie HE-gefärbter SD-Schnitte

Morphologische Strukturen wurden manuell mit dem Axio Vision Programm von Zeiss vermessen. Follikel- und Lumenumfang eines jeden Follikels wurden markiert und deren Fläche mit Hilfe des Programmes berechnet. Mit folgender Formel wurde die Ausdehnung des Epithels berechnet (27):

$$\text{Epithelhöhe} = ((\text{Follikelfläche} - \text{Lumenfläche}) / (\text{Follikelumfang} + \text{Lumenumfang})) \times 0,5.$$

Die Anzahl der Follikel/SD wurde ebenfalls manuell gezählt.

2.6.2 Automatisierte Erfassung der Morphologie fluoreszenzgefärbter SD-Schnitte

1 x PBS

Siehe 2.3.1

Blockierlösung

BSA	3%
PBS	ad 1 l

Waschlösung

BSA	0,1%
PBS	ad 1 l

MATERIAL & METHODEN

Die automatisierte Phänotypisierung der SD-Morphologie wurde im Rahmen einer Kooperation im Labor von Prof. Klaudia Brix (Jacobs University, Bremen) durchgeführt (181). 5 µm Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylen, anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe und in 1% Natriumborhydrid inkubiert um sie zu deparaffinieren. Nachdem die Schnitte in H₂O und 1 x PBS gespült wurden, wurden sie 1 h bei 37°C in Blockierlösung inkubiert um unspezifische Bindungsstellen für die folgende Antikörperinkubation abzusättigen. Nach drei 5-minütigen Waschschrritten wurden die Schnitte über Nacht mit dem Kollagen-Antikörper (Collagen IV, 1:100) inkubiert. Im Anschluss wurden die Präparate 7 x gewaschen und der Zweitantikörperinkubation (Alexa Fluor 488) sowie der Färbung mit den Farbstoffen *cell mask orange* (CMO) und *Draq5* (alle 1:500) in 0,1% BSA in PBS unterzogen (1 h, 37°C). Die Schnitte wurden 6 x gewaschen, in H₂O gespült und mit Mowiol eingedeckt. Bilder wurden mit dem 10 x und dem 20 x Objektiv des Zeiss LSM 510 META *laser scanning* Mikroskop (augestattet mit Argon- und Helium-Neon-Laser, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen) mit einer *Pinhole*-Öffnung von 1 *airy unit* und einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel aufgenommen. Mit dem 20 x-Objektiv aufgenommene Bilder wurden mittels GIMP passgenau so fusioniert, dass ein gesamter SD-Lobus in einem Bild analysiert werden konnte. Die automatisierte Phänotypisierung der fertigen Bilder führten Jonas Weber und Maria Qatato (Mitarbeiter der Arbeitsgruppe K. Brix) mit dem dafür entwickelten Programm durch (181).

2.6.3 Fluoreszenzfärbung von *in vitro* Follikeln und Konfokalmikroskopie

Blockierlösung

BSA	3%
Pferdeserum	5%
Triton X100	0,3%
1 x PBS	ad 20 ml

Antikörper-Inkubationslösung

BSA	3%
Pferdeserum	1%
Triton X100	0,1%
1 x PBS	ad 20 ml

In vitro Follikelkulturen auf Glasdeckgläschen wurden an Tag 23 für 30 min in 4% PFA fixiert und anschließend mit 1 x PBS gewaschen. Nach 45-minütiger Inkubation in Blockierlösung erfolgte die Erstantikörperinkubation gegen Nis (1:1000) und Tg (1:1000) bei 4°C über Nacht. Die Präparate wurden 3 x mit 1 x PBS gewaschen und anschließend für 1,5 h bei RT unter

MATERIAL & METHODEN

Lichtausschluss mit DAPI (1:30000) und Zweitantikörpern (Alexa Fluor 488 goat anti rabbit 1:400; Cy 3 goat anti mouse, 1:1000) inkubiert. Die gefärbten Proben wurden in PBS gespült und mit Immumount eingedeckt. Die Analyse erfolgte mittels Konfokalmikroskopie (Leica DMI8 inverted) mit der Lasx Software.

3. ERGEBNISSE

Neben vielfältigen und zum Teil SDH-antagonistischen Wirkungen von 3-T₁AM auf verschiedene Organe wurde auch die Suppression der HPT-Achse in Ratten nach einmaliger hochdosierter 3-T₁AM-Injektion beschrieben (125). 3-T₁AM könnte daher möglicherweise in die Regulation der SDH-Homöostase involviert sein. Über Wirkungen von 3-T₁AM auf die SD als potenzielles Zielorgan ist jedoch bisher wenig bekannt.

3.1 Untersuchungen zum Einfluss von SDH-Metaboliten auf die SDH-Homöostase in Mäusen

Um zu untersuchen, ob 3-T₁AM mit der SD-Funktion oder der HPT-Achse interferiert, wurden männliche 3-4 Monate alte C57BL/6 Mäuse täglich für 7 Tage i.p. mit 5 mg/kg 3-T₁AM injiziert. Einer parallel behandelten Kontrollgruppe wurde dieselbe Menge Lösungsmittel (60% DMSO in PBS; pH 7,4) unter gleichen Bedingungen verabreicht. Die Tötung und Organentnahme der Mäuse erfolgte an Tag 8 (24 h nach der letzten Injektion) (Abb. 8 A).

3.1.1 Wiederholte Behandlung mit 5 mg/kg 3-T₁AM erhöht die 3-T₁AM-Serumkonzentration von Mäusen signifikant

Die 3-T₁AM-Serumkonzentration betrug nach 7 d Behandlung mit 3-T₁AM im Durchschnitt 67,7 nM und war damit ca. 4-mal so hoch wie der endogene Wert der Kontrollgruppe von 17,4 nM (Abb. 8 B).

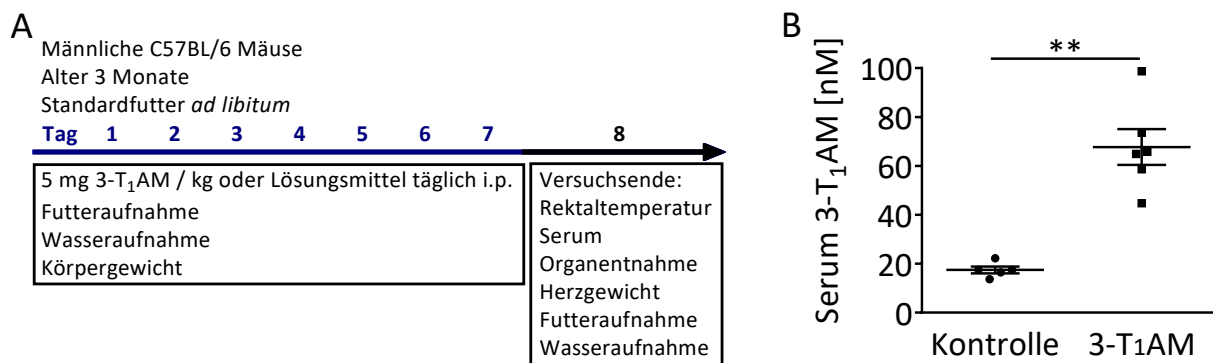


Abbildung 8: 7-tägige Behandlung mit 5 mg/kg 3-T₁AM erhöht die 3-T₁AM-Serumkonzentration in Mäusen signifikant.

Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden 7 Tage lang täglich 5 mg/kg 3-T₁AM oder die entsprechende Menge Lösungsmittel i.p. injiziert (A). Die 3-T₁AM-Serumkonzentration wurde mit einem kompetitiven CLIA gemessen und war in 3-T₁AM behandelten Mäusen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. ** p < 0,01 Mann-Whitney Test, Kontrolle n = 5, 3-T₁AM n = 6 (B).

3.1.2 Kein Einfluss wiederholter 3-T₁AM-Behandlung auf Futter- und Wasseraufnahme, Körpergewicht und Temperatur

Während des gesamten Behandlungszeitraums wurden Körpergewicht, Nahrungs- und Wasseraufnahme täglich protokolliert, um das Wohlergehen der Tiere zu überwachen. Temperatur und Herzgewicht als klassische Ziele der SDH-Wirkung wurden am Ende der Studie bestimmt. Wie in Tab. 10 dargestellt wurden keine Unterschiede in Körpergewicht, Nahrungs- oder Wasseraufnahme sowie Rektaltemperatur zwischen 3-T₁AM- und Kontrollgruppe detektiert. Ebenso wurde keine Veränderung des Herzgewichts beobachtet.

Tabelle 10: Physiologische Parameter nach wiederholter Behandlung mit 3-T₁AM.

Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden 7 Tage lang täglich 5 mg/kg 3-T₁AM oder Lösungsmittel i.p. injiziert. Futter und Wasseraufnahme, Körpergewicht, Rektaltemperatur (24 h nach der letzten Injektion) und Herzgewicht unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Mittelwerte ± SEM, n.s. p > 0,05 t-Test, Kontrolle n = 8, 3-T₁AM n = 8.

	Kontrolle	3-T ₁ AM
Körpergewicht Tag 8 [g]	29,2±0,2	29,4±0,4
Nahrungsaufnahme gesamt [g]	33,7±1,2	33,0±2,5
Wasseraufnahme gesamt [g]	47,3±1,1	44,3±1,4
Rektaltemperatur Tag 8 [°C]	36,8±0,2	37,1±0,1
Herzgewicht Tag 8 [g]	0,18±0,06	0,19±0,07

3.1.3 Wiederholte 3-T₁AM-Behandlung reduziert die mRNA-Expression einzelner SDH-Synthesegene

Ein möglicher Einfluss von 3-T₁AM auf die Funktion der SD wurde zuerst anhand der mRNA-Expression von Genen, die an der SDH-Biosynthese beteiligt sind, per qPCR analysiert. Die 7-tägige Behandlung der Mäuse mit 3-T₁AM resultierte in signifikant verminderter Genexpression von *Nis*, *Tg* und *Pds* verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 9 A). Die Expression aller weiteren untersuchten SDH-Biosynthesegene (*Tshr*, *Tpo*, *Duox2*, *Dio1*) unterschied sich nicht zwischen 3-T₁AM behandelten und Kontrolltieren.

3.1.4 Wiederholte 3-T₁AM-Behandlung interferiert nicht mit der HPT-Achse in Mäusen

Da eine Regulation der Expression von SDH-Biosynthesegenen nach dem akzeptierten, klassischen Konzept über die HPT-Achse erfolgt, wurde untersucht, inwiefern relevante regulatorische Komponenten in der Hypophyse durch die 3-T₁AM-Behandlung beeinflusst waren. Die mRNA-Abundanz der SDH-responsiven Gene *Tshb*, *Trhr*, *Thrde* und *Dio2* in der

ERGEBNISSE

Hypophyse war nach 3-T₁AM-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Abb. 9 B). Auch in der Leber wurde keine veränderte Expression der T₃-responsiven Gene *Spot 14* und *Dio1* nach 7-tägiger 3-T₁AM-Gabe detektiert. Darüberhinaus war auch die Genexpression der T₃-metabolisierenden Enzyme *Sult1a1* und *Ugt1a1* unverändert (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den unveränderten Expressionen SDH-responsiver Gene in Leber und Hypophyse war auch die Serumkonzentration von tT₄ und tT₃ in beiden Behandlungsgruppen der Mäuse gleich (Abb. 9 C).

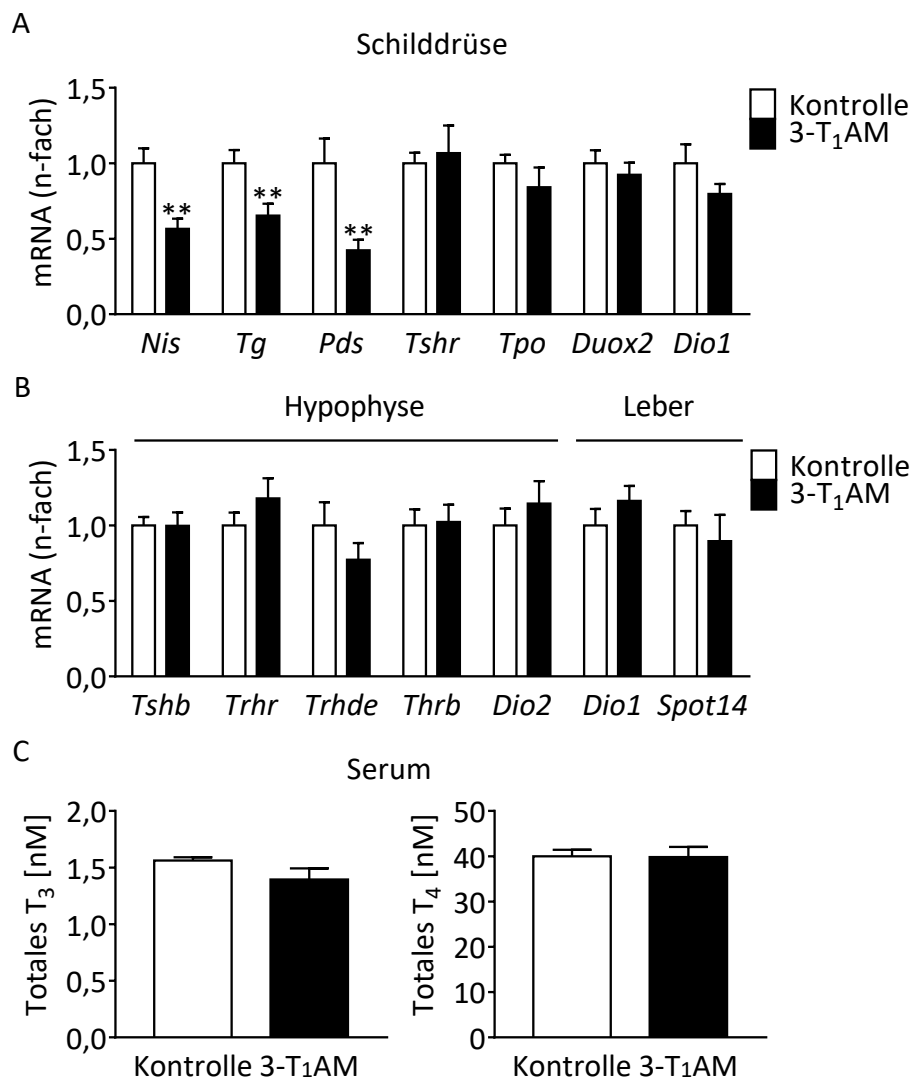


Abbildung 9: Einfluss wiederholter 3-T₁AM-Behandlung auf die SDH-Homöostase in Mäusen.

Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden 7 Tage lang täglich 5 mg/kg 3-T₁AM oder Lösungsmittel i.p. injiziert. Genexpressionen in SD- (A), Hypophysen bzw. Lebergewebe (B) wurden mittels qPCR bestimmt. 3-T₁AM-Behandlung verminderte die thyroideale *Nis*-, *Tg*- und *Pds*-mRNA signifikant (A). Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. A: Kontrolle n = 8, 3-T₁AM n = 7, **p < 0,01, Mann-Whitney Test. B: Hypophyse: Kontrolle n = 10, 3-T₁AM n = 9, Leber: Kontrolle n = 6, 3-T₁AM n = 6; n.s. p > 0,05 Mann-Whitney Test. C: Die mit einem Radioimmunoassay gemessenen Serumkonzentrationen von totalem T₃ und T₄ unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Mittelwerte + SEM, Kontrolle n = 8, 3-T₁AM n = 8, n.s. p > 0,05, t-Test.

3.1.5 Morphologie der murinen SD nach wiederholter 3-T₁AM-Behandlung

Die Morphologie der SD kann Aufschluss über die funktionelle Aktivität und mögliche pathologische Veränderungen des Organs geben. Grobe morphologische Änderungen waren mit bloßem Auge nicht erkennbar (Abb. 10). Nur in wenigen Follikellumina waren vereinzelte tote Zellen zu erkennen, Zeichen einer Entzündung (z.B. Lymphozyteninfiltration) waren nicht zu beobachten (Abb. 10). Detailliertere morphologische Analysen wurden zunächst manuell an HE-gefärbten SD-Schnitten vorgenommen. Die Ausmessung zeigte sowohl für die Follikel- als auch für die Lumenfläche eine Vergrößerung nach 3-T₁AM-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 11 A und B). Auch die Epithelhöhe war nach 3-T₁AM-Behandlung leicht vergrößert (Abb. 11 D). Die Genexpression von *Vegf* sowie *Vegfr1* und *2*, Parameter, die sowohl mit der Struma-Entstehung assoziiert sind (182, 183) als auch durch Iodidüberschuss reguliert werden (184), waren jedoch laut qPCR-Analyse unverändert (Daten nicht gezeigt).

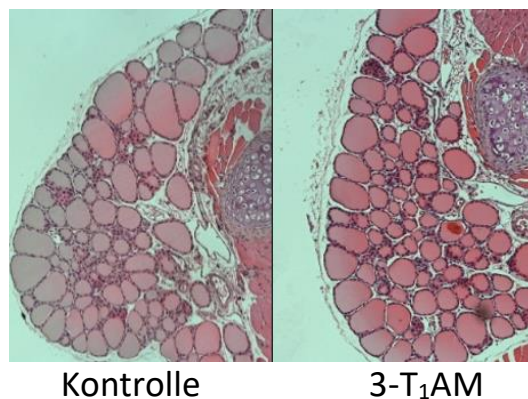


Abbildung 10: HE-Färbung muriner Schilddrüsenschnitte 3-T₁AM- und Lösungsmittel-behandelter C57BL/6 Mäuse.

Mäuse wurden für 7 d täglich mit 5 mg/kg 3-T₁AM oder Lösungsmittel i.p. injiziert. Schilddrüsen wurden 24 h nach der letzten Injektion entnommen, in PFA fixiert und HE gefärbt. Dargestellt ist je ein repräsentatives Bild der Behandlungsgruppen. Die Analyse zeigt keine groben morphologischen Veränderungen nach 3-T₁AM-Behandlung.

Da sich anhand der manuell vermessenen histologischen SD-Präparate behandlungsbedingte morphologische Veränderungen abzeichneten, sollten die SD mit Hilfe eines von der Arbeitsgruppe von Prof. K. Brix (Jacobs University, Bremen) entwickelten Programms automatisiert phänotypisiert werden, um die manuell erhobenen Daten zu verifizieren und zusätzliche Parameter zu analysieren. SD-Schnitte wurden nach Fluoreszenzfärbung mikroskopiert und fotografiert.

ERGEBNISSE

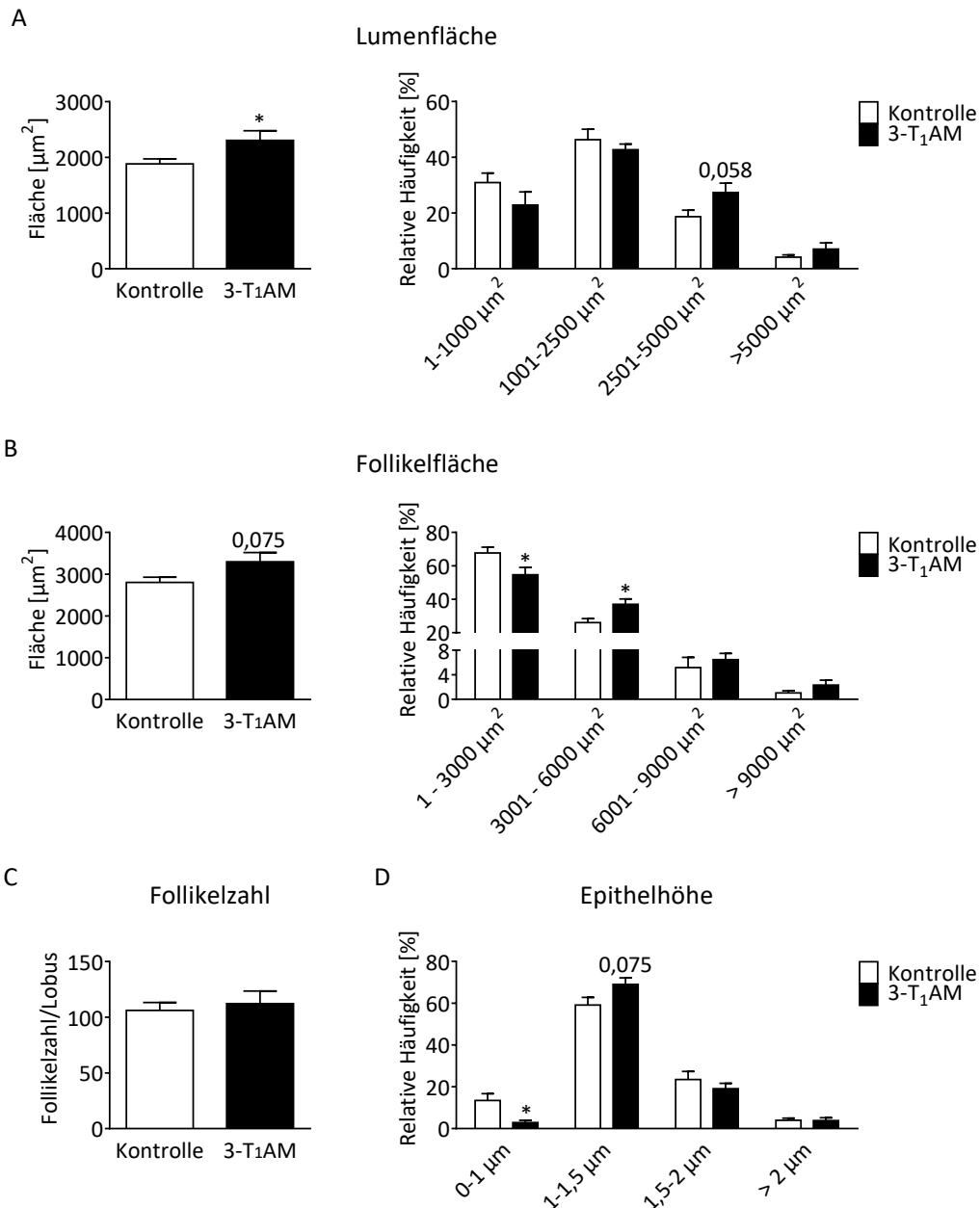


Abbildung 11: Manuell gemessene morphologische Veränderungen der murinen SD nach wiederholter 3-T₁AM-Behandlung.

Männliche C57BL/6 Mäuse wurden für 7 Tage täglich i.p. mit 5mg/kg 3-T₁AM oder Lösungsmittel behandelt. 5 μm dicke Paraffinschnitte von SD wurden einer HE-Färbung unterzogen und morphologische Parameter mittels Zeiss Software manuell vermessen. Die Analyse zeigt morphologische Änderungen der SD nach 3-T₁AM-Behandlung. Mittelwerte + SEM, Kontrolle n = 6, 3-T₁AM n = 5, * p < 0.05, t-Test.

Aus den Bildern wurden die morphologischen Parameter der SD von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Brix mit dem automatisierten Phänotypisierungsprogramm ermittelt. Die automatisierte Analyse bestätigte, dass die Follikellumen der SD nach 3-T₁AM-Gabe im Vergleich zur Kontrolle vergrößert waren (Abb. 12 B). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Anzahl der Follikel unverändert war (Abb. 12 C). Weitere Parameter, die mit der automatisierten Methode erfasst werden sollten, waren die Anzahl von Thyreozyten pro

ERGEBNISSE

Schnitt, die Anzahl toter Zellen in den Lumina, sowie die Ausdehnung der Epithelhöhe. Die Epithelhöhe konnte aufgrund fehlender Kollagenfärbung nicht bestimmt werden. Bei der Bestimmung der Anzahl aller und toter Zellen pro Schnitt traten Ungenauigkeiten in der Bildererkennung auf. Beide Zellzahlparameter wurden laut der präliminären Auswertung durch die Behandlung nicht verändert. Für validierte Aussagen muss die Bildererkennung jedoch überarbeitet werden, daher werden die Daten an dieser Stelle nicht gezeigt.

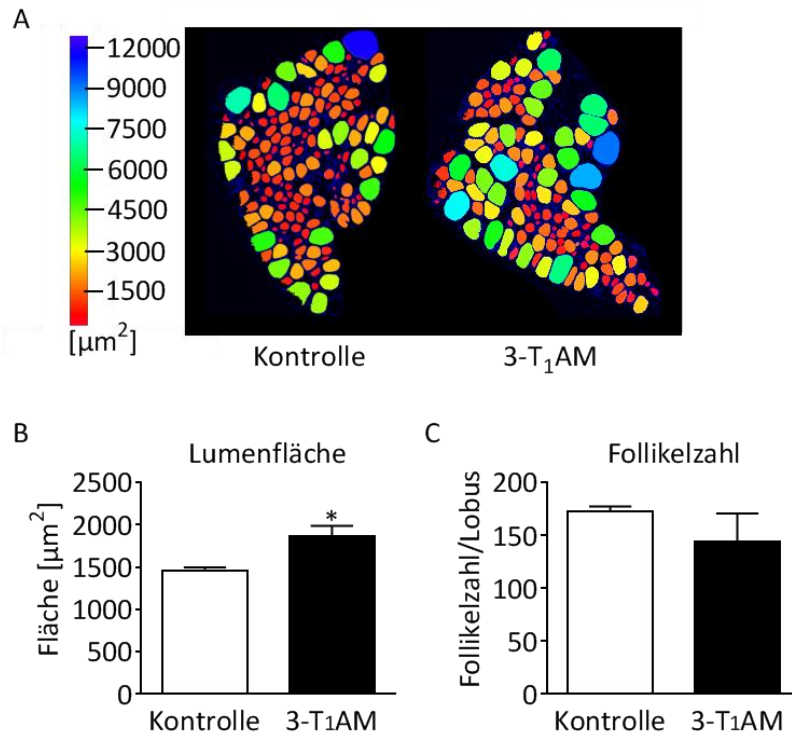


Abbildung 12: Automatisierte Phänotypisierung der SD-Morphologie von Mäusen nach 7-tägiger Behandlung mit 3-T₁AM.

Männliche C57BL/6 Mäuse wurden täglich i.p. mit 5mg/kg 3-T₁AM oder Lösungsmittel behandelt. 5 μm Paraffinschnitte von SD wurden der Immunfärbung mit Antikörpern unterzogen und morphologische Parameter automatisiert mit einer dafür entwickelten Software (AG K. Brix, Jacobs University Bremen) analysiert. A: Repräsentative Auswertung der Lumenflächen von SD-Schnitten. Wiederholte 3-T₁AM-Behandlung veränderte die Lumengröße der Follikel (B), jedoch nicht deren Anzahl (C). Mittelwerte + SEM, B: n = 4 pro Gruppe, C: n = 5 pro Gruppe, *p < 0,05, t-Test.

3.1.6 Kein Einfluss wiederholter T₀AM-Injektion auf Futter- und Wasseraufnahme, Körpergewicht und Temperatur in C57BL/6 Mäusen

Literaturdaten legen nahe, dass T₀AM in Hinsicht auf die Interferenz mit der SD-Funktion oder der HPT-Achse ein aktiver Metabolit des 3-T₁AM sein könnte (125). Es wurde daher eine Mausstudie mit T₀AM analog zur 3-T₁AM *in vivo* Studie durchgeführt. Körpergewicht, Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie Rektaltemperatur und Herzgewicht unterschieden sich wie in Tab. 11 dargestellt nicht zwischen T₀AM- und Lösungsmittel-behandelten Mäusen.

Tabelle 11: Physiologische Parameter nach wiederholter Behandlung mit T₀AM.

Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden 7 Tage lang täglich 5 mg/kg ToAM oder Lösungsmittel i.p. injiziert. Futter und Wasseraufnahme, Körpergewicht, Rektaltemperatur (24 h nach der letzten Injektion) und Herzgewicht unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Mittelwerte ± SEM, n.s. p > 0,05 Mann-Whitney Test, Kontrolle n = 6, T₀AM n = 6.

	Kontrolle	T ₀ AM
Körpergewicht Tag 8 [g]	28,5±0,8	27,8±0,8
Nahrungsaufnahme gesamt [g]	35,6±1,4	33,6±0,8
Wasseraufnahme gesamt [g]	53,1±2,9	51,5±2,4
Rektaltemperatur Tag 8 [°C]	35,9±0,3	35,8±0,1
Herzgewicht Tag 8 [g]	0,16±0,01	0,16±0,01

3.1.7 Der 3-T₁AM-Metabolit T₀AM reduziert die thyroideale mRNA-Expression des *Tshr*

Nach 7-tägiger Behandlung der Mäuse mit i.p. 5 mg/kg T₀AM war die mRNA-Expression des *Tshr* in der SD im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (Abb. 13 A). Die mRNA-Expression aller anderen untersuchten SDH-Biosynthesegene in der SD (*Nis*, *Tg*, *Pds*, *Tpo*, *Dio1*, *Duox2*) war unverändert.

3.1.8 Wiederholte Behandlung mit T₀AM supprimiert die HPT-Achse in Mäusen nicht

Um zu überprüfen, ob sich die verminderte Genexpression des *Tshr* der SD in einer Modulation der HPT-Achse widerspiegelt, wurde die Expression relevanter Gene in der Hypophyse gemessen. Die mRNA-Expression der SDH-abhängig regulierten Gene *Tshb*, *Trhr*, *Trhde*, *Thrb* und *Dio2* in der Hypophyse war nach wiederholter Behandlung der Mäuse mit T₀AM im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert (Abb. 13 B). Auch die totale Konzentration zirkulierender SDH wurde von dieser Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 13 C). Interessanterweise war die mRNA-Expression des T₃-responsiven Gens *Spot14* in der Leber nach T₀AM-Behandlung verringert (Abb. 13 B), während die Expression der *Dio1* in Übereinstimmung mit unveränderten Serum-SDH-Konzentrationen unverändert war.

ERGEBNISSE

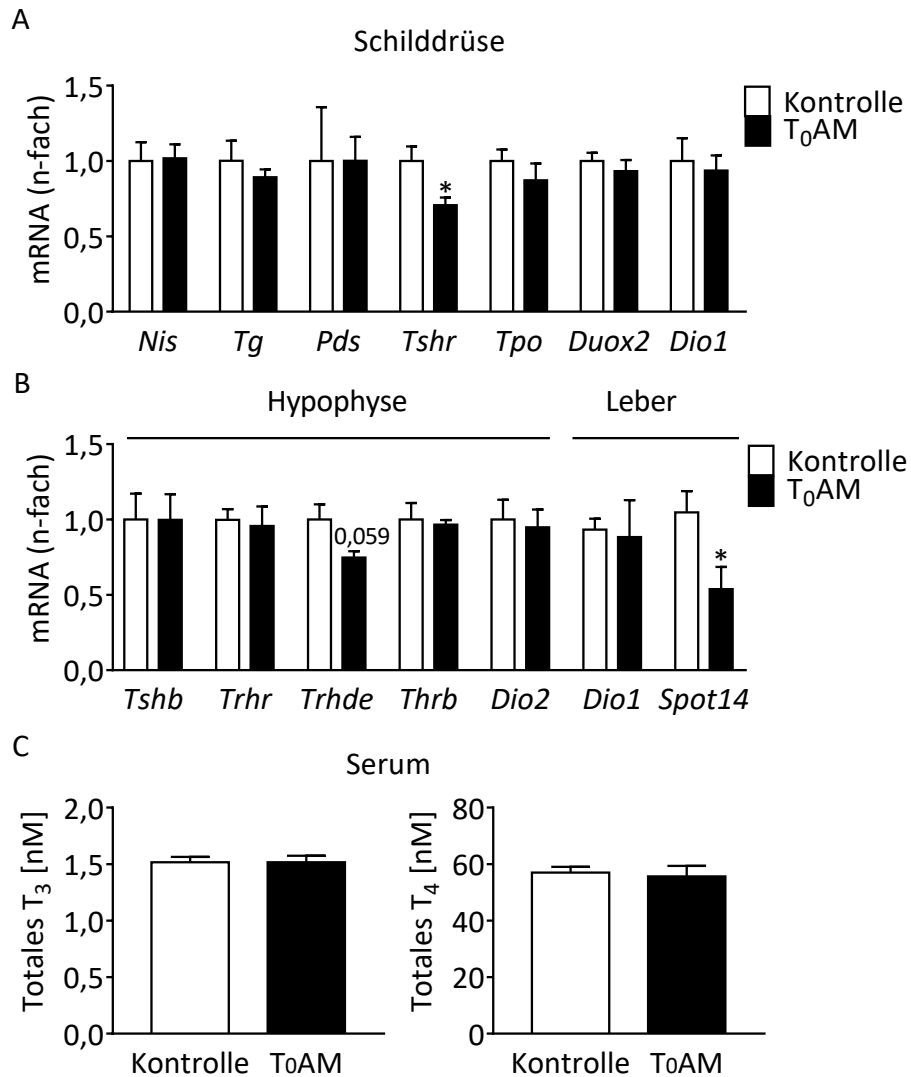


Abbildung 13: Einfluss wiederholter T₀AM-Behandlung auf die SDH-Homöostase in Mäusen.

Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden täglich für 7 d 5 mg/kg T₀AM oder Lösungsmittel injiziert. Genexpressionsanalysen mittels qPCR zeigten verminderte *Tshr*-Genexpression in SD nach T₀AM-Behandlung (A). Die Expression T₃-responsiver Gene in der Hypophyse unterschied sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen, während die hepatische *Spot14*-Expression vermindert war (B). Mittelwerte + SEM, A: Kontrolle n = 5, 3-T₁AM n = 6, B: Hypophyse n = 4 pro Gruppe, Leber: n = 6 pro Gruppe, C: n = 6 pro Gruppe, * p < 0,05, Mann-Whitney Test.

3.1.9 Morphologie der murinen SD nach 7-tägiger T₀AM-Behandlung

Auch am Ende der T₀AM-Mausstudie wurden SD-Loben entnommen, fixiert und nach Färbung einer automatisierten morphologischen Analyse unterzogen. Im Gegensatz zur 3-T₁AM-Behandlung, waren die SD-Folikellumen der Mäuse nach wiederholter T₀AM-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe verkleinert (Abb. 14 B). Die Anzahl von Follikeln/SD-Lobus war wie in der 3-T₁AM-Studie nicht signifikant verändert (Abb. 14 C). Die Analyse der Zellzahlen unterlag auch hier den für die 3-T₁AM-Studie beschriebenen Limitationen, muss daher noch validiert werden und wird nicht gezeigt.

ERGEBNISSE

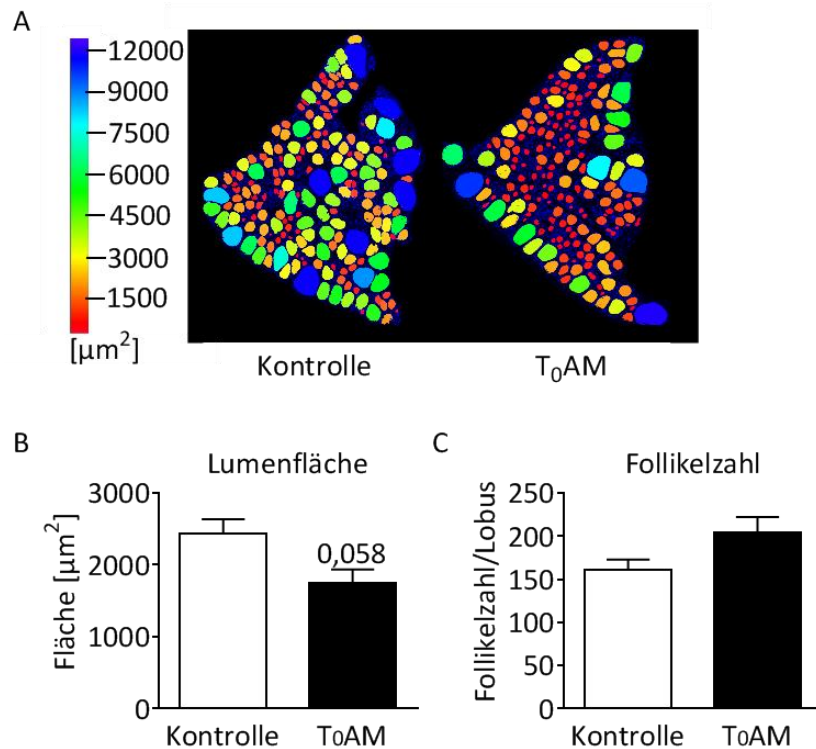


Abbildung 14: Automatisierte Phänotypisierung der murinen SD-Morphologie nach wiederholter T₀AM-Behandlung.

Männliche C57BL/6 Mäuse wurden für 7 Tage täglich i.p. mit 5mg/kg T₀AM oder Lösungsmittel behandelt. 5 µm Paraffinschnitte von SD wurden der Immunfärbung mit Antikörpern unterzogen und morphologische Parameter automatisiert mit einem dafür entwickelten Programm (AG K. Brix, Jacobs University Bremen) analysiert. Wiederholte Behandlung mit T₀AM führte zu verkleinerten Follikellumen. Mittelwerte + SEM, Kontrolle n = 3, T₀AM n = 3, t-Test.

Die präliminäre Analyse zeigte jedoch keine Veränderung der Gesamtzellzahl sowie toter Zellen durch die T₀AM-Behandlung. Rein optisch waren in beiden Behandlungsgruppen nur in wenigen Follikellumen einzelne tote Zellen erkennbar.

3.1.10 T₃ reduziert die Expression von SDH-Synthesegenen über eine Suppression der HPT-Achse

Ein Tierversuch mit einer niedrigen Dosis des klassischen aktiven SDH T₃ wurde als Positivkontrolle durchgeführt. Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden 7 Tage lang täglich 5 ng/kg T₃ i.p. injiziert. Futter- und Wasseraufnahme sowie Körpergewicht der Tiere waren nach 7-tägiger T₃-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Tab. 12).

Tabelle 12: Physiologische Parameter in Mäusen nach wiederholter Behandlung mit T₃.

Futter- und Wasseraufnahme sowie Körpergewicht von männlichen C57BL/6 Mäusen waren nach täglicher i.p. Injektion mit 5 ng/kg T₃ für 7 d unverändert. Rektaltemperatur und Herzgewicht (24 h nach der letzten Injektion) waren nach T₃-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05, t-Test, n = 5 pro Gruppe.

	Kontrolle	T ₃
Körpergewicht Tag 8 [g]	29,0±0,7	29,0±0,5
Nahrungsaufnahme gesamt [g]	37,4±3,8	34,4±1,5
Wasseraufnahme gesamt [g]	39,3±1,6	41,8±4,8
Rektaltemperatur Tag 8 [°C]	36,2±0,1	36,8±0,1*
Herzgewicht Tag 8 [g]	0,18±0,01	0,21±0,01*

Herzgewicht und Körpertemperatur waren in T₃-behandelten Tieren an Tag 8 erwartungsgemäß höher als in Kontrolltieren (Tab. 12). Die qPCR-Analyse der SD zeigte, dass die an der SDH-Synthese beteiligten Gene *Nis*, *Tg*, *Pds*, *Tshr*, *Tpo*, *Dio1* und *Duox2* nach T₃-Behandlung schwächer exprimiert waren als in der Kontrollgruppe (Abb. 15 A). Die Analyse bekannter T₃-responsiv regulierter Gene in der Hypophyse sollte zeigen, ob die HPT-Achse durch die T₃-Dosis supprimiert wurde. Die Transkriptkonzentration von *Tshb* war nach T₃-Gabe im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant vermindert (Abb 15 B). *Trhde*, ein durch T₃ positiv reguliertes Gen, war nach T₃-Behandlung stärker exprimiert als in den Kontrolltieren (Abb. 15 B). Während sich die zirkulierende tT₃-Konzentration nicht signifikant erhöhte, war die tT₄-Serumkonzentration der Mäuse entsprechend der gemessenen *Tshb*-Suppression durch die T₃-Behandlung signifikant vermindert (Abb. 15 C). Die im Vergleich zu den anderen in der Doktorarbeit beschriebenen Tierstudien höheren endogenen T₄-Konzentrationen könnten in individuellen Unterschieden der Tiergruppe oder in der Verwendung unterschiedlicher Nachweismethoden, wie unter 2.2 beschrieben, begründet sein.

ERGEBNISSE

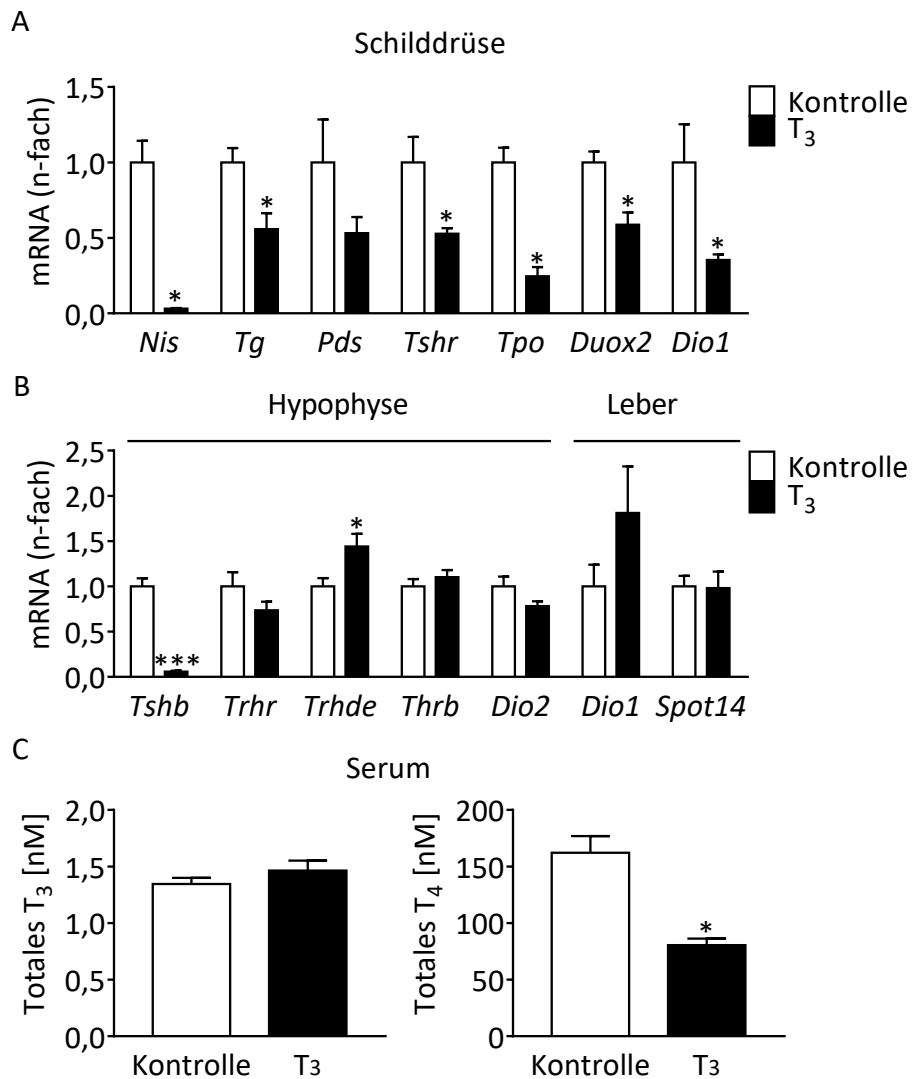


Abbildung 15: Einfluss wiederholter T₃-Behandlung auf die SDH-Homöostase in Mäusen.

Männlichen C57BL/6 Mäusen wurden 7 Tage lang täglich 5 ng/kg T₃ oder Lösungsmittel i.p. injiziert. Genexpressionsanalysen mittels qPCR zeigten verminderte mRNA-Expression aller analysierten SDH-Synthesegene nach wiederholter T₃-Behandlung (A). Die Behandlung mit T₃ supprimierte die hypophysäre *Tshb*-Expression, während die *Trhde*-mRNA erhöht wurde (B). Mittelwerte + SEM, A: Kontrolle n = 5, T₃ n = 4, B: n = 5 pro Gruppe, C: T₃: n = 5 pro Gruppe, T₄: Kontrolle n = 4, T₃ n = 5, * p < 0,05, Mann-Whitney Test.

3.2 *In vitro* Studien in der Thyreozytenzelllinie PCCL3

Die Thyreozytenzelllinie PCCL3 wurde als *in vitro* Modell herangezogen, um die 3-T₁AM-Wirkung auf Thyreozyten im isolierten System und auf molekularer Ebene untersuchen zu können. PCCL3 Zellen sind voll differenzierte und nicht transformierte SD-Epithelzellen, die aus 18 Monate alten Fisher Ratten gewonnen wurden (171).

3.2.1 Expressionsprofil von 3-T₁AM-Transporterkandidaten und -metabolisierenden Enzymen in PCCL3 Zellen

Neben der Wirkung über Plasmamembranrezeptoren wurde die Aufnahme von 3-T₁AM in Gewebe und Zellen sowie intrazellulärer Metabolismus des SDH-Derivats in verschiedenen experimentellen Systemen demonstriert (siehe 1.5.5). Dies spielt eine wichtige Rolle für die Aufklärung des Wirkmechanismus von 3-T₁AM in der entsprechenden Zielzelle. Um die genetische Voraussetzung unseres Zellmodells für 3-T₁AM-Aufnahme und -Metabolismus zu überprüfen, wurde ein Expressionsprofil per Microarray Transkriptomanalyse erstellt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse hinsichtlich 3-T₁AM-metabolisierender Enzyme, möglicher 3-T₁AM-Transporterkandidaten und klassischer SDH-Transporter dargestellt. Um die Expressionsstärke in ein Verhältnis zu setzen sind exemplarisch 3 SDH-Biosynthesegene in ihrer detektierten Expressionsstärke dargestellt. Die detektierten mRNA-Mengen von *Dio1*, *Maoa*, *Mct8*, *Lat1*, *Slc7a1*, *Slc17a5*, *Slc31a1* lagen zwischen denen von *Tpo* und *Tshr*. Eine Expressionsstärke vergleichbar mit der des hochabundanten *Tg* wurde für keines der Gene gemessen. Mittels qPCR wurde die mRNA-Detektion für *Dio1*, *Mao A*, *Mct8*, *Lat1*, *Slc7a1*, *Slc17a5*, *Slc29a2*, *Slc31a1*, *Slc43a3* verifiziert. Für diese Gene wurden unter Verwendung der von uns entworfenen Primerpaare Cts < 40 verlässlich in allen technischen Replikaten in der qPCR-Analyse detektiert.

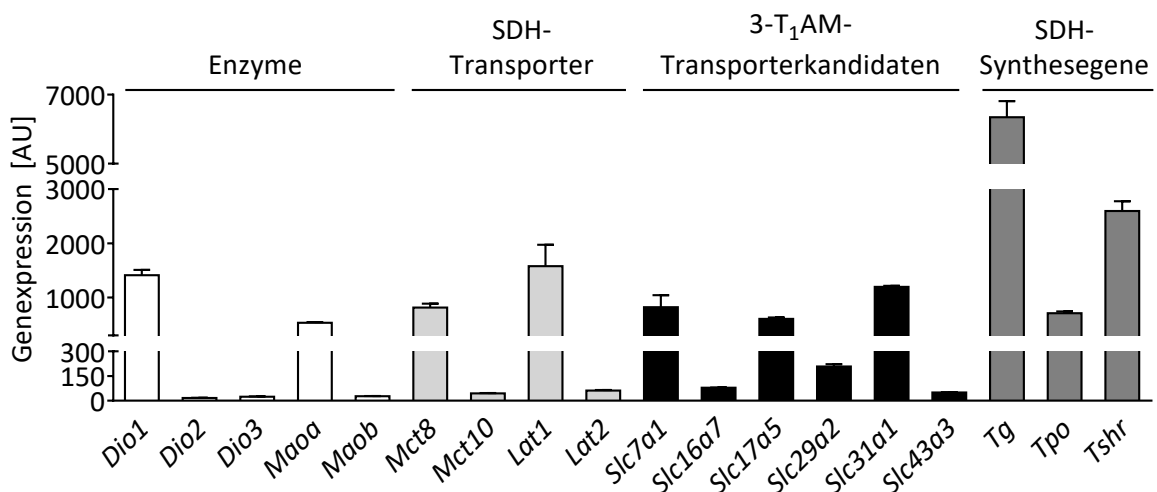


Abbildung 16: Vergleichendes Expressionsprofil 3-T₁AM-metabolisierender Enzyme und möglicher Transporter in PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden TSH- und FCS-depletiert und anschließend mit 0,1 mU/ml TSH restimuliert. Die mRNA-Expression wurde mittels Array gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von 3 unabhängigen Versuchen.

3.2.2 Aufnahme und enzymatischer Metabolismus von 3-T₁AM in PCCL3 Zellen

Basierend auf dem Wissen um das Expressionsprofil relevanter Enzyme und Transporter für 3-T₁AM-Aufnahme und -Metabolismus, wurden funktionelle Studien durchgeführt. PCCL3 Zellen wurden mit 3-T₁AM inkubiert, SDH-Metaboliten aus Zellen und Überständen extrahiert und mittels LC-MS/MS analysiert. In Zellen und konditionierten Überständen, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt waren, wurden weder 3-T₁AM noch die potentiellen Metaboliten T₀AM und 3-TA₁ detektiert (Zeitpunkt 0 min). In Überständen und Extrakten 3-T₁AM-inkubierter Zellen wurde die Ausgangssubstanz detektiert. Wie in Abb. 17 A/B dargestellt, verringerte sich die 3-T₁AM-Konzentration im Zellkulturmedium im Verlauf der Inkubationszeit, während diese im Zellextrakt anstieg. Dies spricht für zelluläre Aufnahme oder Bindung von 3-T₁AM. Zu allen Inkubationszeitpunkten konnten T₀AM und 3-TA₁ in Überständen und Extrakten 3-T₁AM-behandelter Zellen detektiert werden. Dabei stieg die Konzentration der Metaboliten im Überstand im Zeitverlauf deutlich an, während sie in den Zellextrakten für 3-TA₁ bis zu 30 min relativ konstant blieb und für T₀AM bereits nach 10 min nicht mehr anstieg. Dies spricht für eine intrazelluläre Verstoffwechslung von 3-T₁AM und anschließenden Export der Produkte in den Extrazellulärraum. Um diese Hypothese zu testen und die beteiligten Enzyme funktionell zu identifizieren, wurden PCCL3 Zellen vor der Behandlung mit 3-T₁AM entweder mit dem spezifischen Dio1-Inhibitor PTU, dem Mao-Inhibitor Iproniazid oder entsprechendem Lösungsmittel als Negativkontrolle vorinkubiert. Unter Verwendung von PTU wurde nahezu kein T₀AM im Überstand detektiert (Abb. 17 D), was auf eine Beteiligung der Dio1 an der Deiodierung von 3-T₁AM schließen lässt. Analog dazu wurde nach Vorinkubation mit Iproniazid nahezu keine 3-TA₁ mehr im Zellkulturüberstand detektiert (Abb. 17 C). Dies legt die Katalyse der oxidativen Desaminierung des 3-T₁AM durch MaoA nahe, da die Zellen die Isoform B nicht exprimieren (Abb. 17 E).

ERGEBNISSE

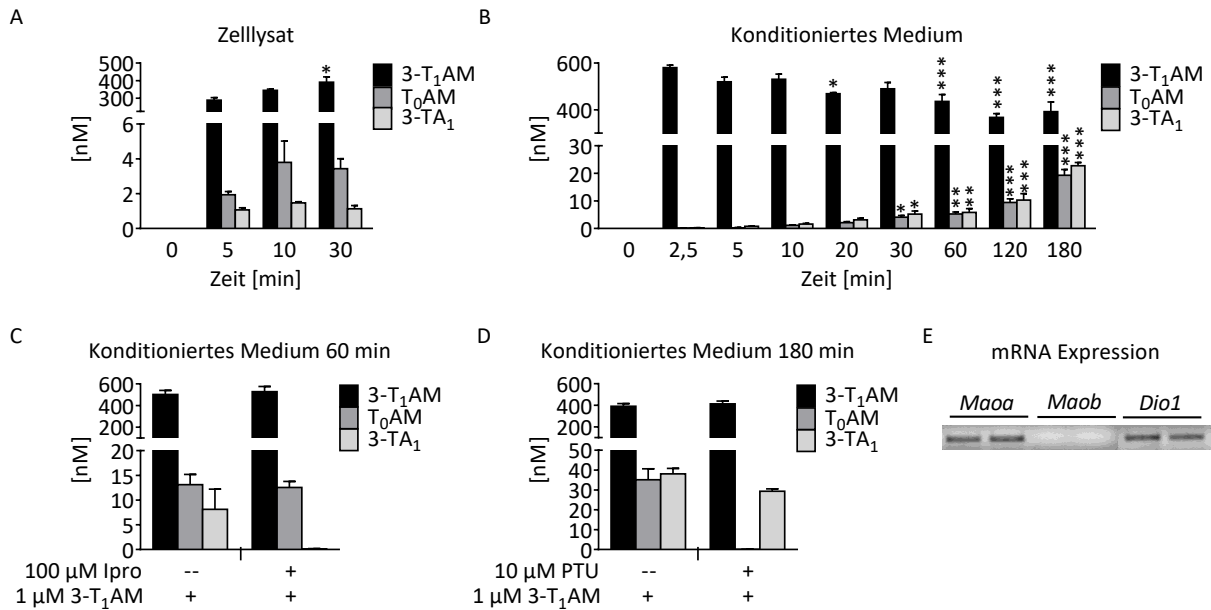


Abbildung 17: Aufnahme und Metabolismus von 3-T₁AM in PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden nach 24-stündiger FCS-Depletion für die angegebenen Zeitspannen in Krebs-Ringer-Puffer \pm 3-T₁AM \pm Dio1-Inhibitor PTU oder Mao Inhibitor Iproniazid inkubiert. Die LC-MS/MS-Analyse der extrahierten SDH-Metaboliten zeigte, dass 3-T₁AM von PCCL3 Zellen aufgenommen und enzymatisch deiodiert und desaminiert wird (A-D). Mittelwerte \pm SEM, A: n = 3, B: n = 2 (Triplikate), * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 versus 5 min (A) oder 2,5 min (B); C/D: n = 3. Agarosegelelektrophorese von qPCR-Produkten mit spezifischen MaoA- und Dio1-Primern verifiziert die mRNA-Expression der 3-T₁AM metabolisierenden Enzyme Dio1 und MaaA. Repräsentatives Gelbild (E).

3.2.3 Überprüfung der Viabilität von PCCL3 Zellen nach Inkubation mit SDH-Metaboliten

Bevor biologische Wirkungen von 3-T₁AM und dessen Metaboliten T₀AM und 3-TA₁ auf PCCL3 Thyreozyten analysiert wurden, wurde überprüft, ob diese die Zellviabilität beeinflussen. PCCL3 Zellen wurden nach Anwendung des Standard-FCS-/TSH-Depletionsprotokolls für 48 h mit TSH \pm 1 μ M T₁AM, T₀AM oder 3-TA₁ behandelt. Wie erwartet erhöhte die Behandlung der Zellen mit TSH die Viabilität (Abb. 18). Dies konnte auch mikroskopisch in Form erhöhter Zellzahl im Vergleich mit TSH-depletierten Zellen beobachtet werden. Die 48 h Coinkubation mit 3-T₁AM, T₀AM oder 3-TA₁ beeinflusste die TSH-abhängige Zellviabilität nicht.

ERGEBNISSE

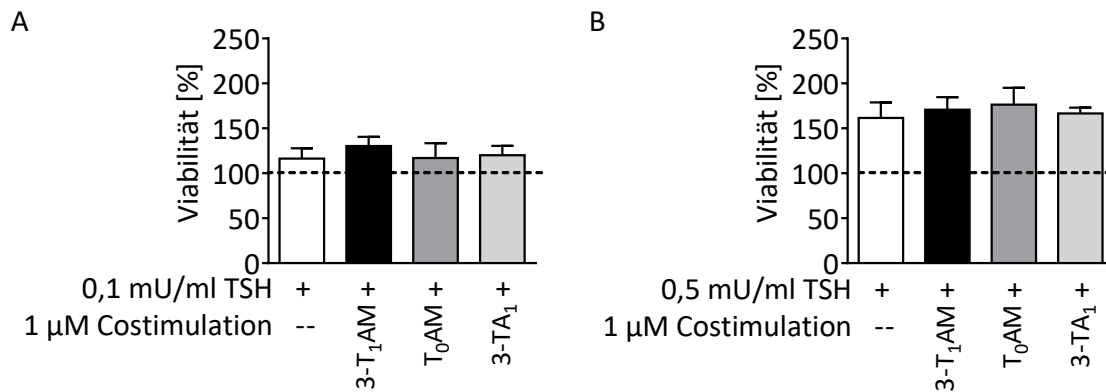


Abbildung 18: Einfluss von TSH, 3-T₁AM, T₀AM und 3-TA₁ auf die Viabilität von PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden TSH- und FCS-depletiert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h ± 0,1 oder 0,5 mU/ml TSH ± 1 µM T₁AM, T₀AM oder 3-TA₁ inkubiert. Die Costimulanzen wurden nach 24 h aufgefrischt. Die TSH-bedingte Viabilität der PCCL3 Zellen (MTT Test) wurde durch die Coinkubation mit SDH-Metaboliten nicht verändert. Die gestrichelte Linie markiert die Viabilität nicht mit TSH stimulierter Zellen. Mittelwerte + SEM, n.s. p > 0,05, One-Way ANOVA, n = 3.

3.2.4 Einfluss von 3-T₁AM auf die TSH-abhängige Expression von Nis

Da die mRNA-Expression bestimmter SDH-Synthesegene im Tierversuch nach 7 d Behandlung mit 3-T₁AM vermindert war, wurde die Expression von SDH-Synthesegenen auch in PCCL3 Zellen untersucht. Die Zellen wurden wie beschrieben TSH- und FCS-depletiert und anschließend mit TSH ± 3-T₁AM stimuliert. In Vorversuchen wurde zunächst die TSH-Konzentration für die Induktion von *Nis* titriert. Die Konzentration von 0,1 mU/ml war ausreichend, um die *Nis*-mRNA gegenüber unstimulierten Zellen signifikant zu steigern. 3-T₁AM senkte die TSH-induzierte mRNA-Expression von *Nis* konzentrationsabhängig (Abb. 19 A). Die TSH-abhängige mRNA-Expression von *Tg*, *Tshr*, *Dio1*, *Tpo*, *Pds* und *Duox1* war hingegen nach 3-T₁AM Coinkubation nicht signifikant verändert. Um zu prüfen, ob sich die inhibitorische 3-T₁AM-Wirkung auf das *Nis*-Transkript ebenfalls auf Proteinebene manifestiert, wurden PCCL3 Zellen nach Depletion für 48 h mit TSH stimuliert um eine vollständige *Nis*-Translation, posttranslationale Modifikation und Integration in die Plasmamembran zu ermöglichen (185). In Vorversuchen zeigte sich, dass für die Proteinexpression von *Nis* eine höhere TSH-Konzentration als für die mRNA-Induktion nötig war. Mit einer TSH-Konzentration von 0,5 mU/ml wurde im Western Blot eine deutliche *Nis*-Bande detektiert. Die Titration der Coinkubation mit 3-T₁AM zeigte für Konzentrationen < 1 µM keinen konsistenten Effekt auf die *Nis*-Expression. Die Coinkubation mit 1 µM 3-T₁AM verminderte die TSH-abhängige Proteinexpression von *Nis* um ca. 40% (Abb. 19 B und C).

ERGEBNISSE

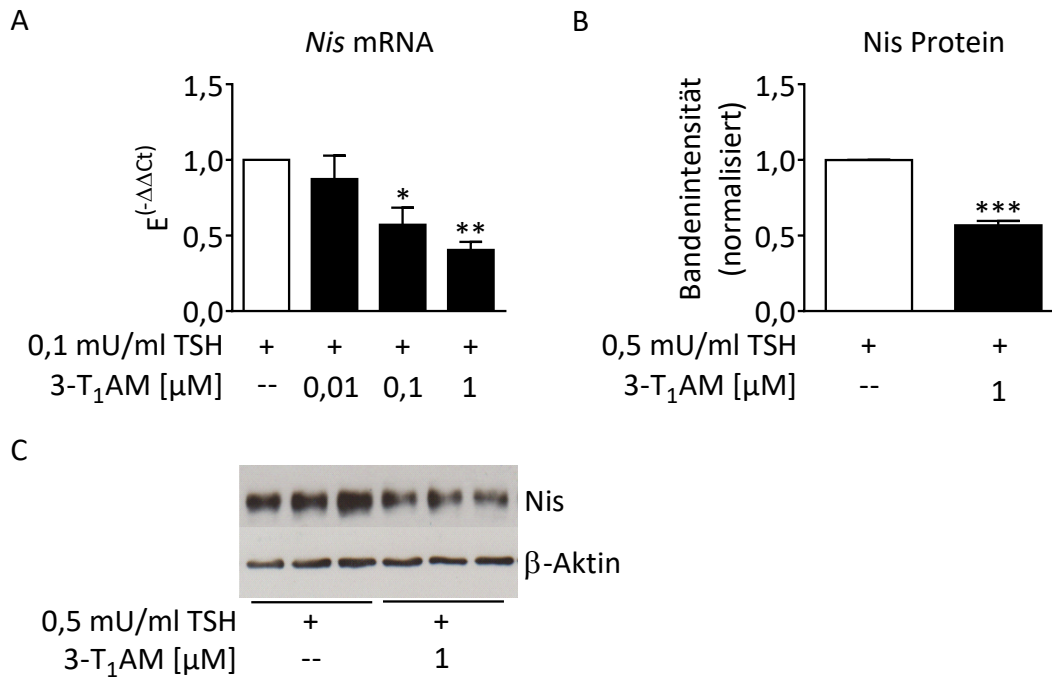


Abbildung 19: Partielle Inhibition der TSH-abhängigen Nis-Expression in PCCL3 durch 3-T₁AM.

Nach FCS- und TSH-Depletion wurden PCCL3 Zellen für 3 h mit 0,1 mU/ml TSH (mRNA-Analyse) oder für 48 h mit 0,5 mU/ml TSH (Analyse des Proteins) ± 3-T₁AM stimuliert. Die qPCR-Analyse zeigte, dass die relative TSH-abhängige *Nis*-Genexpression durch 3-T₁AM dosisabhängig vermindert wurde (A). Die Proteinexpression von Nis wurde nach Anreicherung der Membranproteinfraktion im Western Blot mit spezifischen polyklonalen Antikörpern im Verhältnis zu β-Aktin bestimmt. 3-T₁AM-Behandlung verminderte die TSH-abhängige Nis-Expression (B). Mittelwerte + SEM, A: n = 3, * p < 0,05; ** p < 0,01; One-Way ANOVA, Dunnett's Post-hoc Test. B: n = 5, ***p < 0,001; t-Test mit Welch Korrektur. C: repräsentativer Western Blot.

3.2.5 Effekt von 3-T₁AM und 3-T₁AM-Metaboliten auf die Nis-vermittelte Iodidaufnahme

Die funktionelle Relevanz der verminderten Nis-Expression durch 3-T₁AM-Behandlung wurde mit einem nichtradioaktiven Iodidaufnahmeassay untersucht. Zunächst wurden die Zellkulturbedingungen der PCCL3 Zellen für die Anwendung des Assays optimiert. Der Assay wurde im 96-well Format durchgeführt und die Iodidaufnahmemenge der Zellen nach deren Lyse mit Hilfe der Sandell-Kolthoff-Reaktion bestimmt. Als relative Angabe der Iodidaufnahme diente die Differenz der OD (ΔOD) zwischen Beginn und Ablauf der Sandell-Kolthoff-Reaktion. PCCL3 Zellen wurden in einer Dichte von 2000 bis 20000 Zellen pro well im 96-well Format kultiviert und wie beschrieben FCS-/TSH-depletiert. Die Zellen wurden anschließend mit einer moderaten Dosis TSH von 0,5 mU/ml stimuliert. Die Menge des intrazellulären detektierbaren Iodids erhöhte sich mit steigender Zellzahl (Abb. 20 A). Für weitere Experimente wurde eine Zellzahl von 20000 pro well ausgewählt, da die ΔOD bei dieser Zellzahl am höchsten war. Unter Verwendung dieser Zellzahl wurde eine TSH-Titration durchgeführt.

ERGEBNISSE

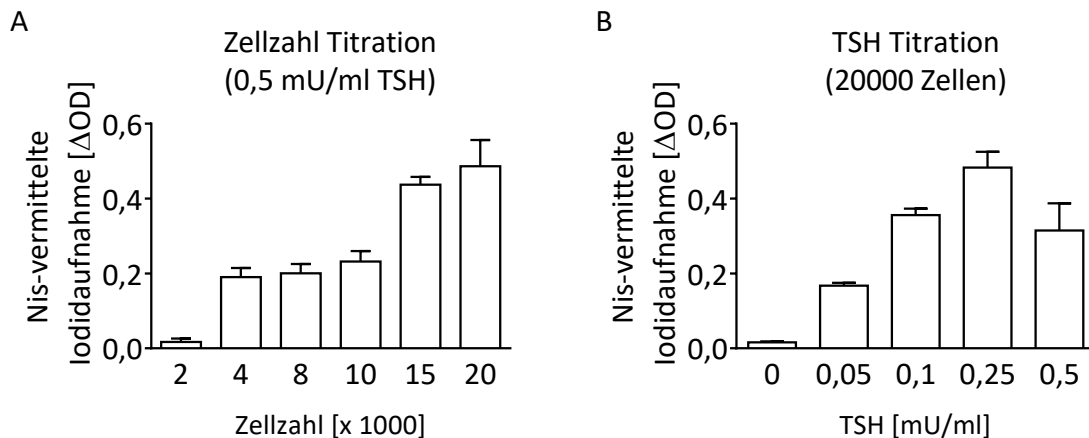


Abbildung 20: Etablierung der Rahmenbedingungen für den nichtradioaktiven Iodidaufnahme-Assay mit PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden in unterschiedlichen Zellzahlen im 96-well Format ausgesät und FCS-/TSH-depletiert. Die Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen TSH-Konzentrationen stimuliert und anschließend für 20 min mit 10 μ M NaI inkubiert. Die aufgenommene intrazelluläre Iodidmenge wurde mittels Sandell-Kolthoff Reaktion bestimmt. Die Menge aufgenommenen Iodids war abhängig von Zellzahl und TSH-Konzentration. Mittelwerte + SEM, Vorversuche, n = 1 in Quadruplikaten.

Die Iodidaufnahme wurde durch TSH konzentrationsabhängig beeinflusst (Abb. 20 B). Sie wurde bis zu einer TSH-Konzentration von 0,25 mU/ml gesteigert und flachte dann ab. Für den weiteren Verlauf wurde die Konzentration von 0,1 mU/ml TSH gewählt, da sich diese im dynamischen Bereich der Titrationskurve befand und somit Raum für eine eventuelle Steigerung oder Verminderung des Signals durch die Behandlung ließ.

Für die Analyse des Effekts von 3-T₁AM und dessen in PCCL3 Zellen gebildeten Metaboliten T₀AM und 3-TA₁ auf die Iodidaufnahme, wurden die Zellen nach Depletion mit 0,1 mU/ml TSH \pm 1 μ M 3-T₁AM, T₀AM oder 3-TA₁ stimuliert. Die TSH-abhängige Iodidaufnahme in PCCL3 Zellen wurde wider Erwarten durch 3-T₁AM nicht beeinflusst (Abb. 21 A). Wurden die Zellen vor der Stimulation jedoch einem verlängerten Depletionsprotokoll unterzogen (TSH- und FCS-Entzug um weitere 24 h verlängert), so hemmte 3-T₁AM die TSH-abhängige Iodidaufnahme der Zellen um 50% (Abb. 21 B). Da 3-T₁AM von PCCL3 Zellen zu T₀AM und 3-TA₁ verstoffwechselt wird, wurde überprüft, ob einer der Metaboliten selbst biologische Aktivität hinsichtlich der Iodidaufnahme in diese Zellen besitzt. Die Costimulation mit 3-TA₁ hatte keinen Effekt auf die TSH-abhängige Iodidaufnahme in PCCL3 Zellen. Der deiodierte Metabolit T₀AM hingegen reduzierte die TSH-abhängige Iodidaufnahme in die Zellen unabhängig vom zuvor verwendeten Depletionsprotokoll um die Hälfte (Abb. 21 A und B). 3-T₁AM ist ein iodidhaltiges Molekül, das wie unter 3.2.2 gezeigt in PCCL3 Zellen zu T₀AM deiodiert wird. Das freigewordene Iodid könnte theoretisch selbst am Thyreozyten wirksam werden und die Nis-Expression und -Funktion beeinträchtigen (Wolff-Chaikoff-Effekt). Als

ERGEBNISSE

Kontrolle wurde das Iodidaufnahme-Experiment auch nach Inkubation mit 0,1 und 1 μM Iodid durchgeführt. Während die 48-stündige Inkubation mit insgesamt 2 x 1 μM Iodid die Iodidaufnahme hemmte, hatte die 10fach geringere Dosis keinen Effekt. Die als inhibitorische Kontrolle verwendete Retinsäure (RA) hemmte die Iodidaufnahme erwartungsgemäß (186).

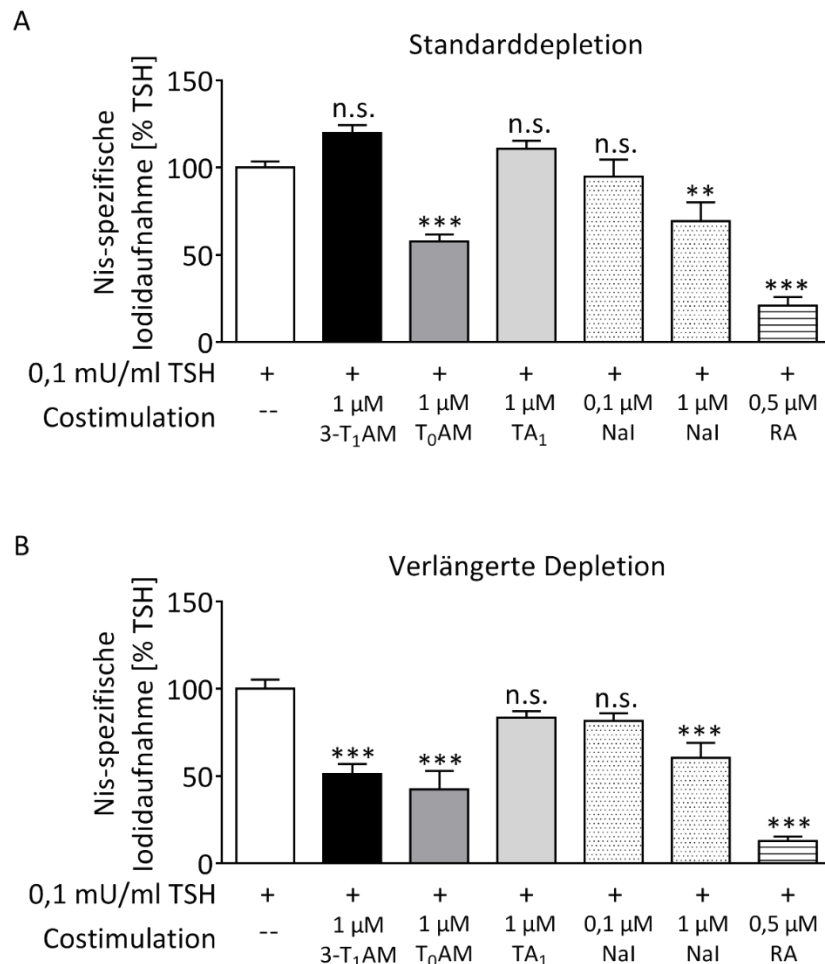


Abbildung 21: Modulation der TSH-abhängigen Nis-medierten Iodidaufnahme in PCCL3 durch verschiedene Stimulanzen nach Standard- und verlängerter Depletionsprotokoll.

PCCL3 Zellen wurden im 96-well Format kultiviert und entweder nach Standard- oder verlängerter Protokoll von TSH und FCS depletiert. Die Zellen wurden anschließend für 48 h mit Lösungsmittel oder 0,1 mU/ml TSH \pm T₁AM/T₀AM/3-TA₁/0,1 μM Nal/1 μM Nal/0,5 μM RA stimuliert. Die Iodidaufnahmekapazität wurde nach 20-minütiger Inkubation mit 10 μM Nal in HBSS Puffer mittels Sandel-Kolthoff Reaktion bestimmt. 3-T₁AM verminderte die TSH-abhängige Iodidaufnahme nur nach verlängerter Depletion, während T₀AM dies unabhängig vom Depletionsprotokoll bewirkte. A: n = 3, B: 3-T₁AM/Nal/RA n = 3, T₀AM/3-TA₁ n = 2 in Quadruplikaten; **p < 0,01, ***p < 0,001, One-Way ANOVA, Dunnett's post hoc Test.

3.2.6 Effekt von 3-T₁AM und unterschiedlichen Depletionsprotokollen auf die Dio1-Aktivität

Die TSH-abhängige Iodidaufnahme in PCCL3 Zellen wurde durch T₀AM-Costimulation unabhängig des verwendeten Depletionsprotokolls vermindert und T₀AM könnte demnach hinsichtlich der Nis-Inhibition der eigentlich aktive 3-T₁AM-Metabolit sein. Da 3-T₁AM-

Inkuabation die Iodidaufnahme nur nach verlängerter Depletion hemmte, wurde überprüft, ob die unterschiedlichen Depletionsprotokolle das Ausmaß der 3-T₁AM-Deiodierung beeinflussten. Wurden PCCL3 Zellen mit TSH stimuliert, so steigerte dies die spezifische Aktivität der Dio1 erwartungsgemäß (Abb. 22 A). Costimulation mit 3-T₁AM hemmte die TSH-abhängige Induktion der Dio1-Aktivität nach Standarddepletion signifikant. Auch nach Anwendung der verlängerten Depletion wurde eine Verminderung der TSH-abhängigen Dio1-Aktivität durch 3-T₁AM beobachtet. Diese war jedoch nicht signifikant und schwächer als nach Standarddepletion (Abb. 22 A). Dies weist auf einen verstärkten Metabolismus von 3-T₁AM zu T₀AM nach verlängerter TSH-/FCS-Depletion hin. 3-T₁AM inhibierte die Dio1-Aktivität von PCCL3 Zellen auch, wenn diese nicht mit TSH stimuliert wurden (Abb. 22 B). Nach verlängerter TSH-/FCS-Depletion wurde am Ende der Inkubationszeit deutlich weniger 3-T₁AM in Zellen und konditionierten Überständen detektiert als nach Standarddepletion (Abb. 22 C und D).

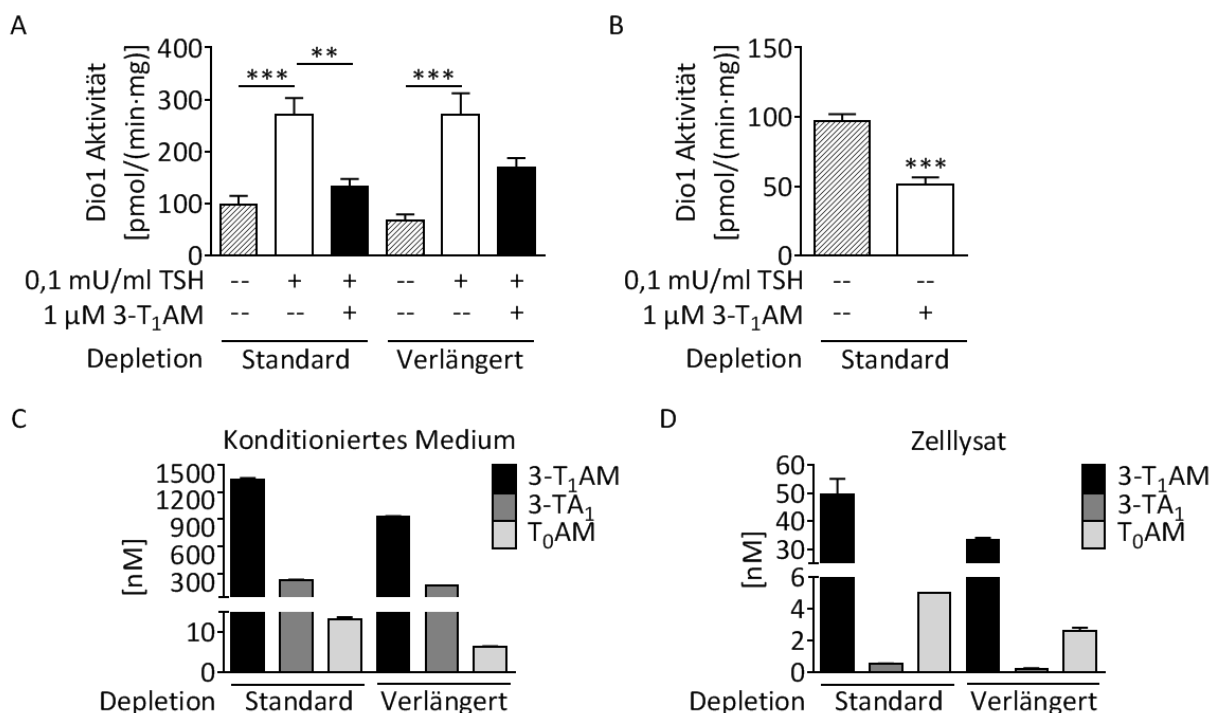


Abbildung 22: Einfluss der Depletionsprotokolle auf die Dio1-katalysierte Deiodierung von 3-T₁AM in PCCL3 Zellen.

Zellen wurden im 6-well Format kultiviert und wurden entweder nach Standardprotokoll oder mit verlängerter TSH- und FCS-depletiert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h mit 0,1 mU/ml TSH ± 3-T₁AM inkubiert (A, C, D) oder nur ± 3-T₁AM behandelt (B). 3-T₁AM wurde nach 24 h erneuert. Die Dio1-Aktivität wurde durch 3-T₁AM-Inkubation vermindert. Die Anwendung des verlängerten Depletionsprotokolls schwächte diesen Effekt ab (A, B). Nach verlängerter Depletion war am Ende der Inkubationszeit weniger 3-T₁AM in Überständen und Zellen detekierbar als nach Anwendung des Standarddepletionsprotokolls. Mittelwerte + SEM. A, B: n = 3, **p < 0,01, ***p < 0,001, One-Way ANOVA mit Dunnett's post hoc Test. C, D: n = 1 in Triplikaten.

Die Konzentrationen von T₀AM und 3-TA₁ unterschieden sich zwischen den Depletionsprotokollen im Vergleich zu den Änderungen der 3-T₁AM-Konzentration nur marginal. Weitere mögliche Metabolisierungsprodukte wie Glucuronide oder Sulfate konnten mit der aktuell validierten LC-MS/MS-Methode nicht analysiert werden.

3.2.7 Einfluss von 3-T₁AM auf die Mct8-Expression in PCCL3 Zellen

Im Tierversuch zeichnete sich nach wiederholter 3-T₁AM-Behandlung ein Trend zur Erhöhung des Mct8 auf Proteinebene ab (n = 3 Tiere pro Behandlungsgruppe, Daten nicht gezeigt). Veränderte Expression von Mct8 könnte den Transport von SDH aus der SD modulieren. Da hier kein ausreichendes Material zur Verfügung stand, um diesem Befund *in vivo* detaillierter nachzugehen, wurde die Mct8-Proteinexpression in PCCL3 analysiert. Nach 48 h 3-T₁AM-Stimulation war die Proteinexpression von Mct8 im Vergleich zur TSH-Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 23).

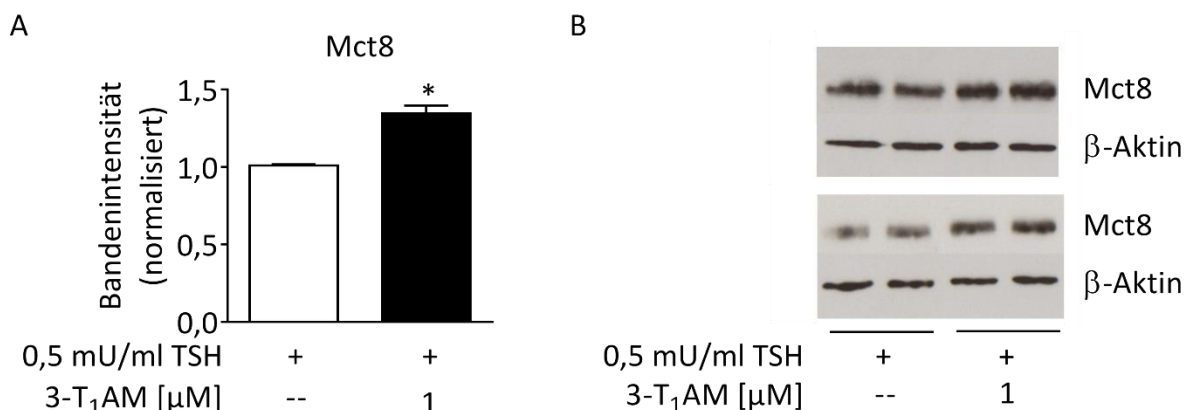


Abbildung 23: Erhöhung der Mct8-Proteinexpression durch 3-T₁AM in PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden nach FCS- und TSH-Depletion für 48 h mit 0,5 mU/ml TSH ± 3-T₁AM stimuliert. Die Proteinexpression von Mct8 in der Membranproteinfraktion der Zelllysate wurde mittels Western Blot mit spezifischen polyklonalen Antikörpern im Verhältnis zu β-Aktin bestimmt. 3-T₁AM-Behandlung steigerte die Mct8-Expression. A: Mittelwerte + SEM, n = 3, * p < 0,05, t-Test mit Welch-Korrektur. B: Repräsentative Western Blots von 2 unabhängigen Experimenten.

3.2.8 Einfluss von 3-T₁AM auf den zellulären Energiestoffwechsel

3-T₁AM agiert direkt an molekularen Zielstrukturen im Mitochondrium und beeinflusst die zelluläre Atmung (156, 157). Des Weiteren wurde ein Einfluss von 3-T₁AM auf den Glucosestoffwechsel beschrieben (siehe 1.4.2). Der zelluläre Energiestoffwechsel von PCCL3 Zellen wurde deshalb mittels Extracellular Flux Analyzer (Seahorse/Agilent) untersucht. Vor der Durchführung von eigentlichen Experimenten wurde die Methode für PCCL3 Zellen

ERGEBNISSE

optimiert. Die Titration von PCCL3 Zellen zeigte einen Zellzahl-abhängigen Anstieg von OCR und ECAR (Abb. 24 A, B). Es wurde eine Anzahl von 12500 Zellen pro *well* für alle weiteren Assays ausgewählt, da sich OCR und ECAR bei dieser Zelldichte in einem vom Hersteller als optimal angegebenen Bereich befanden (OCR ca. 100 pmol/min, ECAR ca. 20 mpH/min). Um die mitochondriale Atmung hinsichtlich der Kopplungseffizienz der Elektronentransportkette, des Protonenlecks, der maximalen Atmung und Reservekapazität genauer zu charakterisieren, wurden der ATPase-Inhibitor Oligomycin und der Entkoppler FCCP verwendet.

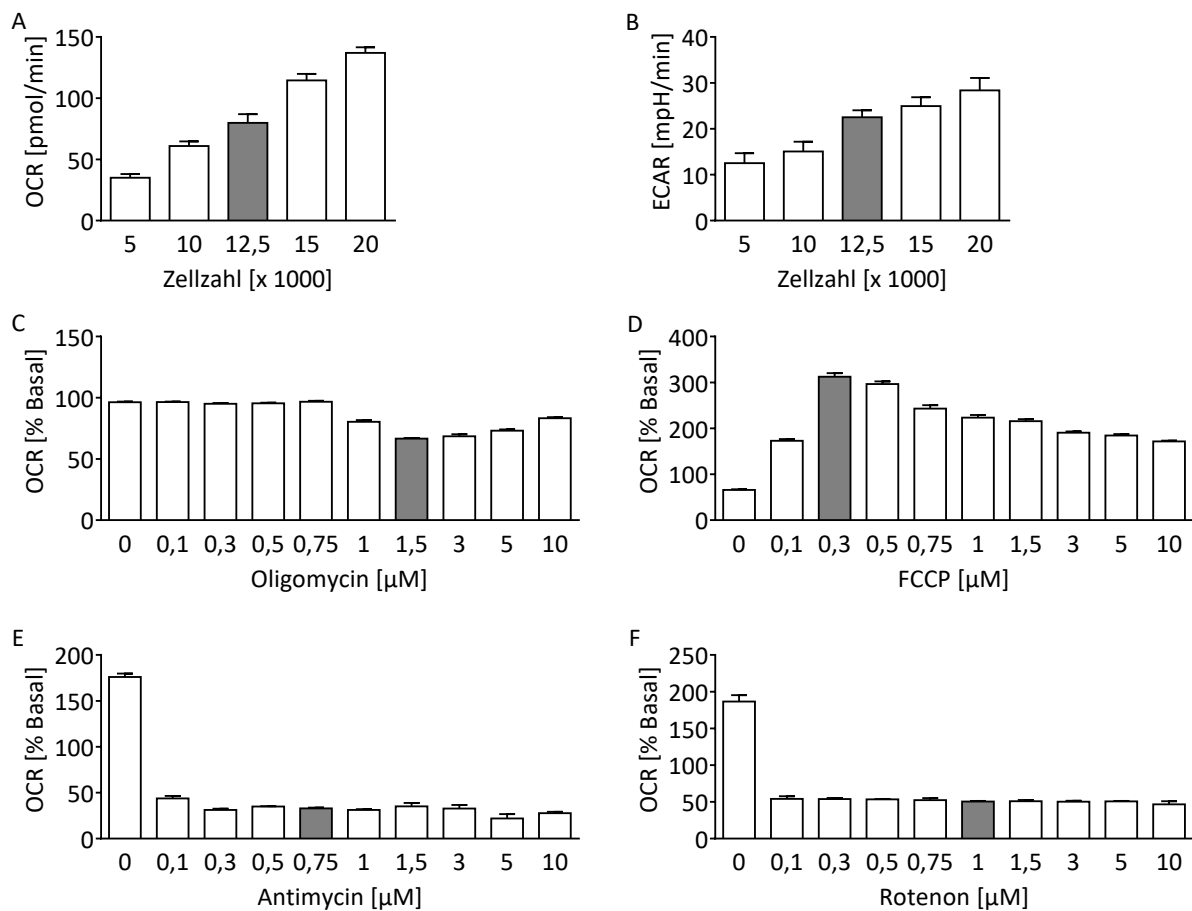


Abbildung 24: Optimierung der Bedingungen für die Analyse des zellulären Energiestoffwechsels.

PCCL3 Zellen wurden in 96-*well* Seahorse Zellkulturplatten kultiviert, TSH und FCS depletiert und anschließend für 1 h mit TSH CO₂ frei bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden ECAR und OCR simultan im Seahorse Extracellular Flux Analyzer gemessen. Die Zugabe der zu titrierenden Substanzen erfolgte durch automatische Injektion im Gerät. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM, Vorversuche, A-D: n = 1 in 6 technischen Replikaten, E/F n = 1 in Triplikaten.

Zur Abgrenzung der nicht-mitochondrialen von der mitochondrialen Atmung, wurden Inhibitoren für Komplex I (Antimycin) und III (Rotenon) verwendet, um die Elektronentransportkette am Ende jedes Seahorse Assays vollständig zu hemmen. Alle verwendeten Substanzen wurden zunächst titriert. Oligomycin-Applikation reduziert die OCR um den Wert, der für die ATP-Synthese verwendet wurde. Der Inhibitor wurde in der Konzentration

ERGEBNISSE

verwendet, die die OCR am stärksten hemmte (1,5 μM ; Abb. 24 C). FCCP als Entkoppler der Atmungskette wirkt nach Überschreitung einer kritischen Dosis toxisch. Für die Titration wurde daher eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungsbeziehung beobachtet (Abb. 24 D). Für weitere Experimente wurde die Konzentration verwendet, die im Vorversuch zur höchsten OCR führte (0,3 μM). Antimycin und Rotenon wurden in den Konzentrationen gewählt, die die OCR am stärksten hemmten (0,75 μM bzw. 1 μM ; Abb. 24 E und F).

TSH-abhängige Steigerung des Glucosemetabolismus und des mitochondrialen O_2 -Verbrauchs in PCCL3 Zellen

Die physiologische Nähe des Testsystems wurde hinsichtlich der Regulation des Energiestoffwechsels zunächst mittels TSH, dem natürlichen Stimulator der Thyreozytenfunktion, überprüft (Abb. 25).

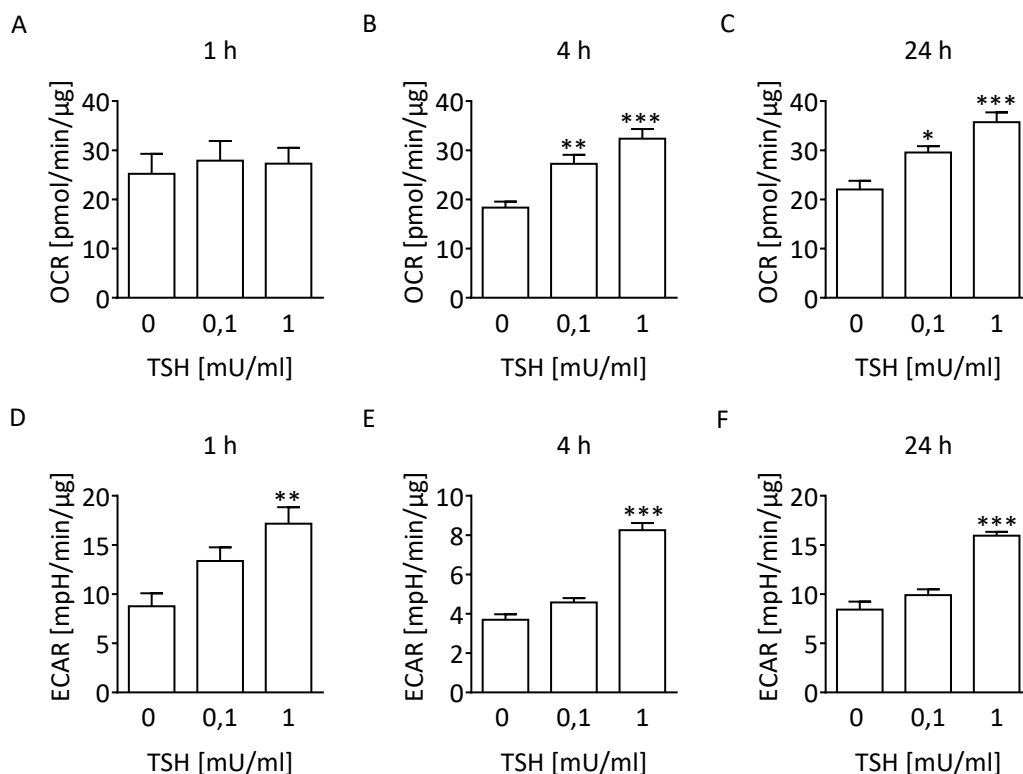


Abbildung 25: Modulation des Energiestoffwechsels von PCCL3 Zellen durch TSH.

PCCL3 wurden TSH- und FCS-depletiert und anschließend für 1, 4 oder 24 h \pm 0,1 oder 1 mU/ml TSH stimuliert. Laut Seahorse-Analyse erhöhte TSH-Inkubation sowohl ECAR als auch OCR der PCCL3 Zellen. Mittelwerte + SEM, A-C & E-F: n = 1 in 6 technischen Replikaten, D: n = 4 in jeweils 6 technischen Replikaten. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, One-Way ANOVA mit Dunnett's post hoc test.

ERGEBNISSE

Während die TSH-Stimulation die OCR nach 1 h noch nicht messbar veränderte, wurde diese nach 4 h und 24 h durch 0,1 mU/ml und 1 mU/ml TSH signifikant erhöht (Abb. 25 A-C). 1 mU/ml TSH erhöhte die basale ECAR bereits nach 1 h sowie nach 4 h und 24 h signifikant (Abb. 25 D-F). Die auf OCR wirksame Konzentration von 0,1 mU/ml TSH veränderte die ECAR zu keinem der getesteten Zeitpunkte signifikant. Die Einzel- oder TSH-Costimulation mit 3-T₁AM hatte auf keine Funktion der OCR (basal, FCCP, Protonenleck, ATP Synthese, nicht-mitochondriale Atmung) Einfluss (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde die TSH-abhängige basale ECAR durch Costimulation mit 1 μ M 3-T₁AM um ca. 30% gehemmt (Abb. 26).

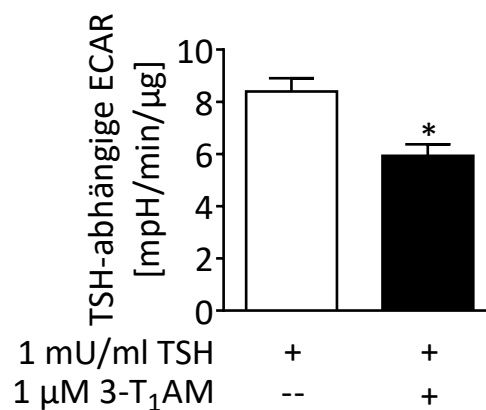


Abbildung 26: Einfluss von 3-T₁AM auf die TSH-abhängige Glucoseverwertung in PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden in 96-well Seahorse-Zellkulturplatten kultiviert, FCS- und TSH-depletiert und anschließend für 1 h unter Ausschluss von CO₂ \pm 1 mU/ml TSH \pm 3-T₁AM stimuliert. Die TSH-abhängige ECAR wurde definiert als die Differenz aus basaler ECAR mit und ohne TSH-Behandlung. 3-T₁AM verminderte die basale TSH-abhängige ECAR in PCCL3 Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM, n = 4, * p < 0,05, t-Test.

3.2.9 Analyse intrazellulärer Signalwege in Thyreozyten nach 3-T₁AM-Inkubation

Die intrazelluläre Signaltransduktion in PCCL3 Zellen nach 3-T₁AM-Applikation wurde untersucht, um zu klären, wie die beobachteten Effekte nach 3-T₁AM-Gabe im Tierversuch und *in vitro* vermittelt werden. Da 3-T₁AM in hier durchgeführten Experimenten physiologische Prozesse modifiziert, die im Thyreozyten zum größten Teil der Kontrolle durch TSH unterliegen, wurde zuerst geprüft, ob 3-T₁AM mit Tshr nachgeschalteten Signalwegen interferiert.

3.2.9.1 Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

Sekundäre Botenstoffe aus den TSH-stimulierten Signalwegen Gs und Gq wurden untersucht. Die Gs-Signalkaskade bewirkt durch Adenylatzyklaseaktivierung einen Anstieg

intrazellulären cAMPs. Die Inkubation von PCCL3 Zellen mit TSH ohne vorherige TSH-Depletion erhöhte die intrazelluläre cAMP-Konzentration in Vorversuchen nur minimal. In Zellen, die FCS- und TSH-depletiert waren, führte die TSH-Behandlung wie erwartet zu einem deutlichen konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Abb. 27 A). Die Stimulation mit 3-T₁AM modulierte weder die basale noch die TSH-bedingte cAMP-Konzentration der Zellen (Abb. 27 B-D).

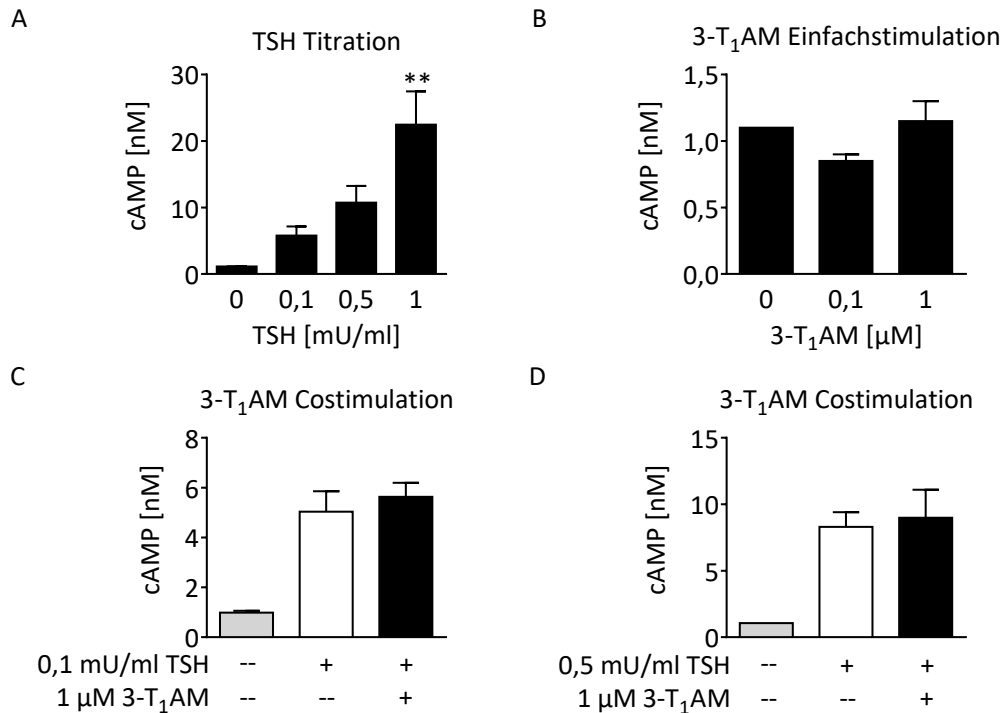


Abbildung 27: Modulation der intrazellulären cAMP-Konzentration in PCCL3 Zellen durch TSH und 3-T₁AM.

PCCL3 Zellen wurden in 96-well Platten kultiviert, depletiert und anschließend für 45 min mit Lösungsmittel, TSH, 3-T₁AM oder TSH + 3-T₁AM stimuliert. Die Quantifizierung intrazellulären cAMPs erfolgte nach Zellyse mit einem kompetitiven Assay über Chemilumineszenzmessung unter Verwendung einer cAMP Standardkurve. A: n = 3, ** p < 0,005, One-Way ANOVA, Dunnett's post hoc Test (A). B: n = 2 in Triplikaten, C: n = 3, D: n = 2 in Triplikaten, n.s. p > 0,05, One-Way ANOVA.

Funktionelles Rezeptorscreening

3-T₁AM moduliert die cAMP-Konzentration wie unter 1.5.4 beschrieben als Ligand an mehreren Zielstrukturen. Je nach aktiviertem Rezeptor kann das cAMP-Signal dadurch in gegensätzliche Richtungen verändert werden. Um auszuschließen, dass sich durch die Aktivierung verschiedener 3-T₁AM-Rezeptoren in PCCL3 Zellen entgegengerichtete Signale überlagern und somit eine bestehende cAMP-Modulation verdecken, wurde ein funktionelles *Screening* mit etablierten Liganden für publizierte 3-T₁AM-Rezeptorkandidaten ± Forskolin durchgeführt. Die Zellen wurden für 45 min mit 25 μM Forskolin, einem direkten

ERGEBNISSE

Adenylatzyklasestimulator, oder mit 10 μM Rezeptoragonist \pm Forskolin inkubiert. Forskolin erhöhte die cAMP-Konzentration der Zellen wie erwartet (Abb. 28 B und D). Phenylethylamin (Pea), der endogene Agonist des Taar1, beeinflusste die intrazelluläre cAMP-Konzentration in PCCL3 Zellen nicht (Abb. 28 A). In Übereinstimmung damit wurden nur minimale Mengen *Taar1*-mRNA detektiert (Abb. 28 E).

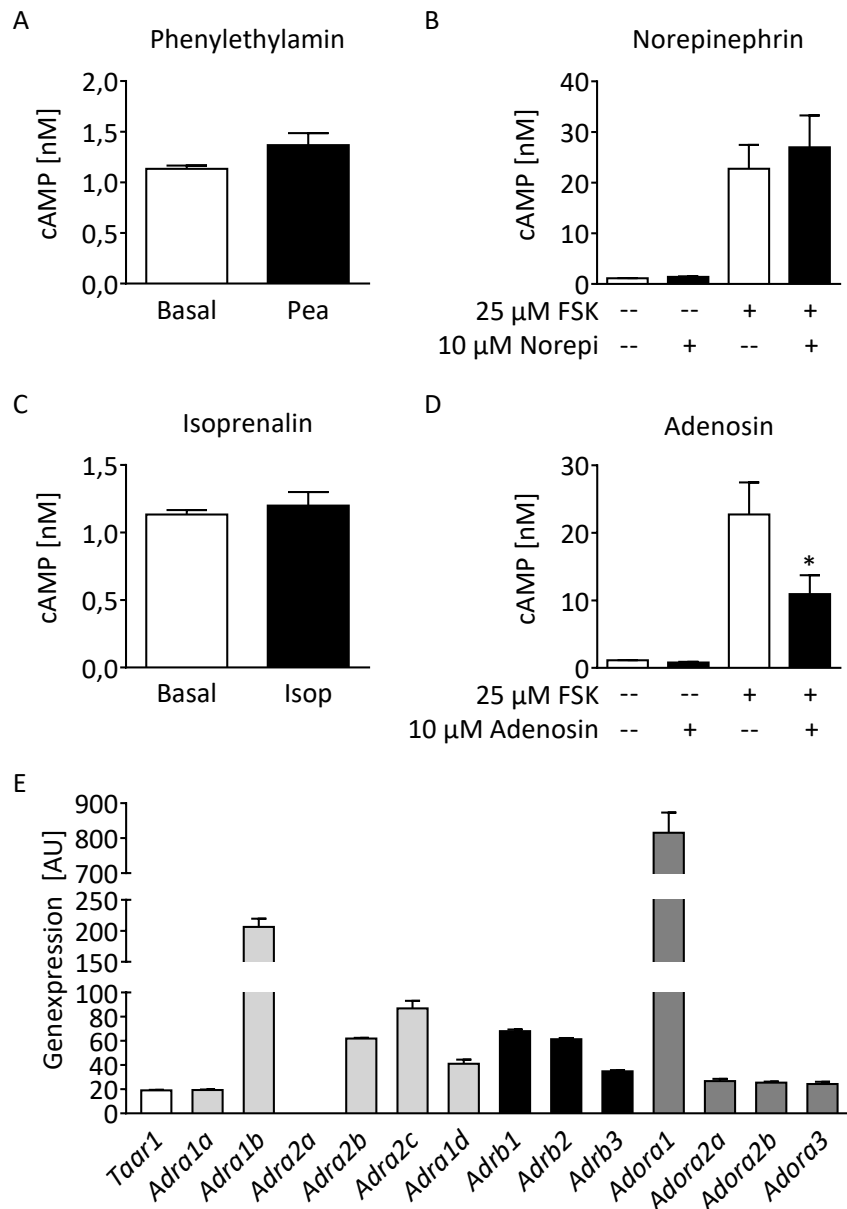


Abbildung 28: Funktionelles cAMP-Screening nach 3-T₁AM Rezeptorkandidaten in PCCL3 Zellen.

A-D: PCCL3 Zellen wurden in 96-well Platten kultiviert, FCS- und TSH-depletiert und anschließend für 45 min mit Lösungsmittel oder Liganden stimuliert. Die Quantifizierung der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgte mit einem kompetitiven Assay unter Verwendung einer cAMP Standardkurve durch Chemilumineszenzmessung. Nur Adenosin modulierte die cAMP-Konzentration der Zellen. Mittelwerte + SEM, n = 3, n.s. p > 0,05, t-Test bzw. One-Way ANOVA. E: Transkriptomanalyse in PCCL3-RNA mittels Genchip, n = 3.

Norepinephrin (Norepi) ist ein adrenerger Rezeptorligand und kann sowohl α - als auch β -adrenerg via cAMP Signale weiterleiten. Weder die basale und noch die Forskolin-abhängige cAMP-Konzentration in PCCL3 Zellen wurde durch Norepi verändert (Abb. 28 B). Fehlende Gi-Signalgebung nach Norepi-Stimulation bestätigt die fehlende Detektion des *Adra2a* in den Zellen (Abb. 28 E). Um die Möglichkeit β -adrenerger Signalgebung auszuschließen wurde das synthetische β -selektive Norepi-Derivat Isoprenalin (Isop) verwendet. Auch dieser Ligand veränderte die basale intrazelluläre cAMP-Konzentration nicht (Abb. 28 C). Transkripte β -adrenerger Rezeptoren wurden in vergleichsweise geringer Menge jedoch detektiert (Abb. 28 E). Die als Positivkontrolle durchgeführte Stimulation der Zellen mit Adenosin verminderte die basale und die FSK-stimulierte cAMP-Konzentration der Zellen signifikant (Abb. 28 D und (187, 188)). Dementsprechend wurde der Gi-koppelnde Adenosinrezeptor *Adora1* auf Transkriptebene in PCCL3 Zellen als prädominanter Adenosinrezeptor detektiert (Abb. 28 E).

3.2.9.2 Indirekte Analyse intrazellulärer IP₃-Bildung

Auch der zweite dem Tshr nachgeschaltete Signalweg, der über die Aktivierung eines Gq Proteins unter anderem die intrazelluläre IP₃-Konzentration erhöht, wurde untersucht. IP₃ ist sehr kurzlebig, weshalb stellvertretend das Abbauprodukt IP₁ mittels ELISA gemessen wurde. TSH in Konzentrationen, die in PCCL3 Zellen physiologische Effekte wie Nis- und Dio1-Induktion sowie Proliferation und Steigerung von OCR und ECAR vermitteln, veränderten die IP₁-Konzentration in PCCL3 Zellen innerhalb von 60 min nicht (n = 3, Daten nicht gezeigt). 3-T₁AM veränderte die IP₁-Konzentration der Zellen ebenfalls nicht in Konzentrationen, die in anderen Experimenten zu messbaren Veränderungen wie Hemmung der Nis-Expression führten.

3.2.9.3 Analyse der Ampk-Aktivierung

Die Ampk spielt eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel von Zellen und wird durch SDH und 3-T₁AM in ihrer Aktivität reguliert (siehe 1.3.3 und 1.5.4). Es wurde außerdem demonstriert, dass TSH die Ampk-Aktivierung in PCCL3 Zellen hemmt und diese eine Rolle in der Expression von Nis zu spielen scheint (189). In PCCL3 Zellen wurde daher untersucht, ob 3-T₁AM die TSH-abhängige Ampk-Regulation moduliert. TSH-Depletion oder Inkubation mit der Positivkontrolle Oligomycin erhöhte die pAmpk/Ampk-Ratio in PCCL3 Zellen.

ERGEBNISSE

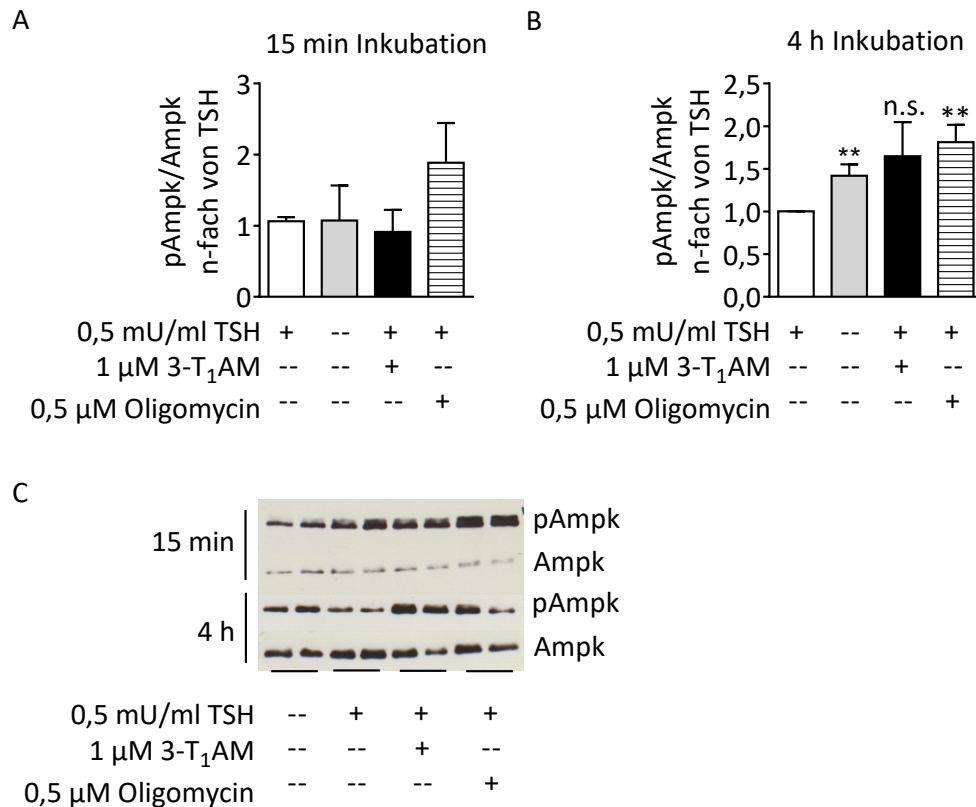


Abbildung 29: Einfluss von TSH und 3-T₁AM auf die Ampk-Phosphorylierung in PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden in 6-well Platten kultiviert, depletiert und anschließend für 15 min oder 4 h mit Lösungsmittel, TSH, TSH + 3-T₁AM oder TSH + Oligomycin inkubiert. 30 μ g Gesamtprotein wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western Blot auf eine Membran übertragen. Die Quantifizierung erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen Ampk und pAmpk auf unterschiedlichen Membranen. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM der pAmpk/Ampk Verhältnisse, A: n = 3, B: n = 7, ** p < 0,01 signifikant versus + TSH, One-Way ANOVA mit Dunnett's post hoc Test.

In einer Kinetik von 15 min - 48 h deuteten sich Trends für eine Erhöhung der pAmpk/Ampk-Ratio nach 3-T₁AM-Gabe bei 4 h an. Nach wiederholter Durchführung des Experiments konnte jedoch kein konsistenter, signifikanter Effekt auf das Verhältnis pAmpk/Ampk durch 3-T₁AM festgestellt werden (Abb. 29 B).

3.2.9.4 Calcium

Calcium spielt als Regulator des Iodidmetabolismus in Thyreozyten eine Rolle (190). Da die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in Zellen des Auges durch 3-T₁AM reguliert wird (153), wurde die 3-T₁AM-abhängige Ca²⁺-Signalgebung in PCCL3 Thyreozyten in Kooperation mit Dr. Stefan Mergler (Experimentelle Ophthalmologie, Charité) analysiert. 3-T₁AM erhöhte die cytosolische freie Ca²⁺-Konzentration der PCCL3 Zellen in Vorversuchen beginnend bei einer Konzentration von 300 nM. Der Effekt war bei Verwendung von 1 μ M 3-T₁AM signifikant und verlässlich reproduzierbar (Abb. 30). In Gegenwart des TRPV1/TRPM8 Inhibitors BCTC wurde

ERGEBNISSE

kein Einfluss von 1 μM 3-T₁AM auf die intrazelluläre freie Ca²⁺-Menge beobachtet. Transkripte beider Rezeptoren, an denen BCTC als Blocker aktiv ist, wurden in geringen Mengen in PCCL3 Zellen detektiert. Im Vergleich dazu ist die mRNA-Expressionsstärke des *Trpc2*, der in der Regulation der FRTL-5 Zellphysiologie (ebenfalls eine Rattenthyreozyten-Zelllinie) eine Rolle spielt, dargestellt (Abb. 30 D).

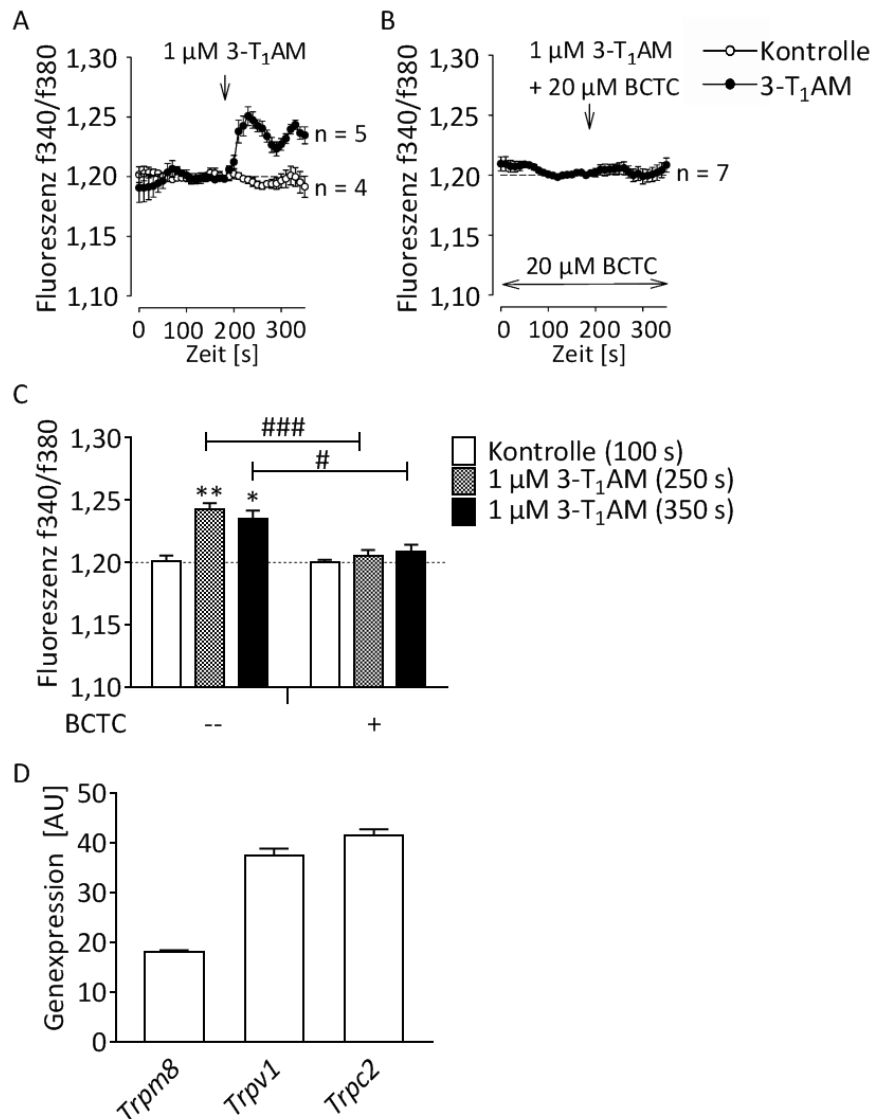


Abbildung 30: Einfluss von 3-T₁AM auf die freie cytosolische Ca²⁺-Konzentration in PCCL3 Zellen.

PCCL3 Zellen wurden auf 24 mm Deckgläschen in 12-well Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 50% kultiviert, mit Fura-2/AM präinkubiert und mit 3-T₁AM \pm 20 μM BCTC stimuliert. Das Verhältnis der Fluoreszenz f340nm/f380nm repräsentiert Änderungen der cytosolischen freien Ca²⁺-konzentration. A, B: repräsentative Calciumspuren. C: Zusammenfassung der Daten aus A und B. Mittelwerte + SEM der angegebenen Anzahl von Experimenten, * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle (basale Ca²⁺-Konzentration) und 3-T₁AM-induziertem Ca²⁺-Anstieg, gepaarter t-Test. ## $p < 0,05$ und ### $p < 0,005$, signifikanter Unterschied zwischen 3-T₁AM-induziertem Ca²⁺-Signal mit und ohne BCTC, ungepaarter t-Test. D: Transkriptdetektion relevanter TRP-Kanäle in PCCL3 mittels Transkriptom Array.

Die Signalweiterleitung muscarinischer Rezeptoren, an denen 3-T₁AM antagonistisch wirkt, wurde nicht analysiert, da gezeigt wurde, dass muscarinische Agonisten den Iodidmetabolismus in Rattenthreozyten hemmen (155, 191).

3.3 Effekte von 3-T₁AM in einem Modell differenzierter Thyreozyten aus primären murinen ESC

Während Thyreozyten *in vivo* als Kolloid-gefüllte Follikel organisiert sind, wachsen sie in der gewöhnlichen Zellkultur in Form von Monolayern und sind daher nicht befähigt SDH zu synthetisieren. Um die Diskrepanz zwischen Zellkultur und *in vivo* System zu überbrücken, wurde ein Modell verwendet, mit dem ESC durch die temporäre Tetrazyklin-abhängige Induktion exogener Nkx2-1- und Pax8-Expression und anschließender rhTSH-Inkubation zu funktionellen 3D-Follikeln differenziert werden (172). Das Modell musste zunächst im eigenen Institut etabliert werden. Die kombinierte, sequentielle Behandlung mit Tetrazyklin und rhTSH führte zu signifikant stärkerer endogener Genexpression der SD-spezifischen Transkriptionsfaktorkombination aus *Nkx2-1*, *Pax8* und *Foxe1* verglichen mit undifferenzierten Zellen an Tag 23 (Abb. 31 A und B). Auch die Schilddrüsendifferenzierungsmarker *Tg*, *Nis*, *Tpo*, *Tshr* wurden durch das Differenzierungsprotokoll induziert. Die mRNA-Expression von *Mct8*, *Ano1*, *Dio2*, *Dio3* und *Duox2* wurde ebenfalls detektiert, aber durch die Differenzierung nicht weiter oder nur sehr schwach induziert. *Dio1*-Transkripte waren an Tag 23 der Differenzierung nicht detektierbar. Die Analyse mittels Konfokalmikroskopie zeigt, dass nach dem Differenzierungsprotokoll an Tag 23 Follikelformation *in vitro* sowie Proteinexpression von Nis und Tg zu beobachten ist (Abb. 31 C). Die LC-MS/MS-Analyse von Überstandextrakten zeigte stärkere Detektion von T₄ im Medium differenzierter Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (Abb. 31 D). Auch in Überständen undifferenzierter Zellen wurde T₄ detektiert. Costimulation der Ansätze mit 10 nM 3-T₁AM für 7 Tage verminderte die Expression der TSH-abhängig am stärksten induzierten Gene *Pax8*, *Tg* und *Tpo* signifikant (Abb. 31 E).

ERGEBNISSE

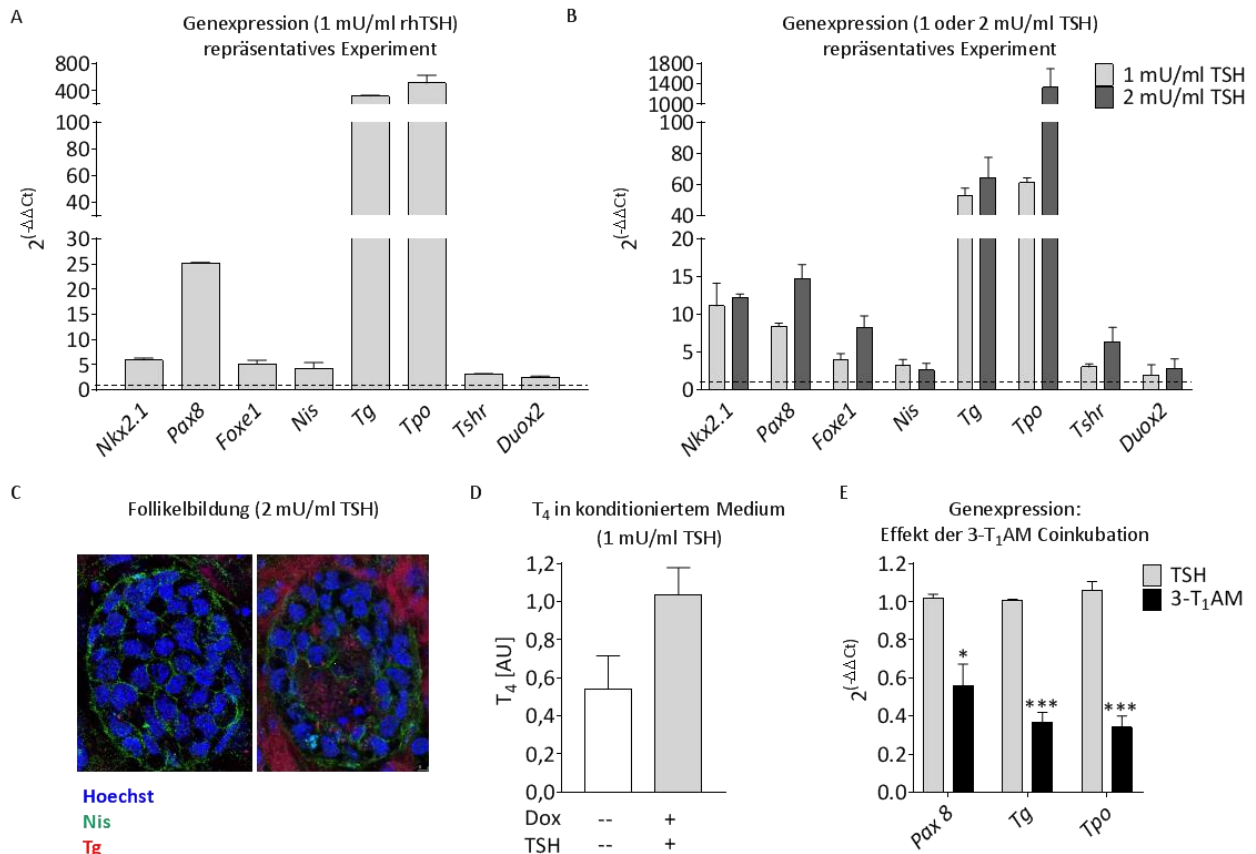


Abbildung 31: Etablierung eines Modells funktioneller *in vitro* SD-Follikel aus mESC.

A2Lox Nkx2-1-Pax8 ESC wurden in EB differenziert und mittels temporärer Tetrazyklin- sowie anschließender rhTSH-Stimulation differenziert. A, B: Mittels qPCR-Analyse wurde die Induktion von Schilddrüsen-differenzierungsmarkern im Vergleich zu undifferenzierten Zellen („-Dox“, gestrichelte Linie) an Tag 23 des Differenzierungsprotokolls („+rhTSH“) detektiert. C: Bei Analyse fluoreszenzgefärbter Präparate mittels Konfokalmikroskop war Follikelformation mit Proteinexpression von Nis und Tg an Tag 23 des Differenzierungsprotokolls erkennbar. Repräsentative Aufnahmen. D: Vermehrte Detektion von T₄ in konditionierten Überständen differenzierter Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. AU = *arbitrary units*. E: Wiederholte Behandlung mit 3-T₁AM verminderte die Induktion von Pax8, Tg und Tpo auf mRNA-Ebene. * p < 0,05; *** p < 0,001, n = 3, t-Test.

4. DISKUSSION

3-T₁AM ist ein SDH-Derivat, das im Menschen und in verschiedenen Nagern endogen nachweisbar ist (119, 121). Strukturell unterscheidet sich 3-T₁AM von T₄ durch eine fehlende Carboxylgruppe an der Alanin-Seitenkette und den geringeren Iodierungsstatus mit nur einem Iod-Atom am inneren Ring. Trotz seiner strukturellen Verwandtschaft mit T₄ vermittelt 3-T₁AM *in vivo* in Nagern Effekte, die den klassischen Wirkungen der SDH zum Teil entgegengesetzt sind (119). Weiterhin wurde die Interferenz von 3-T₁AM mit der HPT-Achse in Ratten beschrieben (125). In murinem *ex vivo* Intestinalgewebe kann 3-T₁AM aus T₄ synthetisiert werden (137). Demnach könnte neben der Aktivierung von T₄ zu T₃ durch Deiodierung zusätzlich die Decarboxylierung von T₄ zu Thyronamin einen relevanten regulatorischen Pfad des T₄-Metabolismus darstellen. Dieser könnte wichtig sein, um in peripheren Geweben ein Molekül zu produzieren, das die SDH-Homöostase beeinflusst und an der Feinregulation der SDH-Wirkung beteiligt ist (119, 192).

Die Hypothese dieser Doktorarbeit ist, dass der SDH-Metabolit 3-T₁AM durch eine direkte Wirkung auf die SD an der Feinregulation der SDH-Homöostase beteiligt ist. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Einfluss von 3-T₁AM auf die HPT-Achse und die SD-Funktion im Mausmodell untersucht. Die Daten wurden ergänzt durch *in vitro* Studien in der Zelllinie PCCL3, einem Modell differenzierter, nicht transformierter Thyreozyten mit Rattenursprung. Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche mit Kontrollsubstanzen (z.B. T₃) durchgeführt.

4.1 Wahl der Dosis und Überprüfung des 3-T₁AM-Status im Mausmodell *in vivo*

Klieverik *et al.* lieferten 2009 erste Hinweise, dass die einmalige Injektion einer pharmakologischen 3-T₁AM-Dosis mit der SDH-Homöostase in Ratten interferiert (125). Weitere *in vivo* Daten hinsichtlich dieser 3-T₁AM-Wirkung wurden anschließend jedoch nicht publiziert. In dieser Doktorarbeit wurde eine *in vivo* Studie mit wiederholter 3-T₁AM-Behandlung in Mäusen durchgeführt, um zu analysieren, ob 3-T₁AM die HPT-Achse oder die SD-Funktion in Mäusen in einer chronischen Behandlungssituation beeinflusst. Die von Klieverik *et al.* verwendete hohe Dosis von 50 mg/kg 3-T₁AM (entspricht 140 µmol 3-T₁AM/kg Körpergewicht), die auch in vielen anderen *in vivo* Studien als Einmaldosis verwendet wurde, senkt die Körpertemperatur von Mäusen innerhalb von Minuten für

mehrere Stunden drastisch, jedoch reversibel und ohne adverse Nebenwirkungen (119, 120, 124). Kälteexposition beeinflusst über die Aktivierung von TRH im Hypothalamus jedoch die gesamte HPT-Achse (siehe 1.2.2). In dieser Doktorarbeit wurde deshalb für die Behandlungsdauer von 7 Tagen die 10fach niedrigere Dosis von 5 mg/kg gewählt, die die Körpertemperatur von Mäusen nicht beeinflusst ((119) und Tab. 10), um so die Komplexität des experimentellen Systems durch die Kältekomponente nicht zusätzlich zu erhöhen. Mit der vergleichsweise niedrigen Dosis wurden außerdem toxische Effekte, wie sie bei höheren Dosen beobachtet wurden (119), vermieden, wie sich in unverändertem Körpergewicht sowie unveränderter Futter- und Wasseraufnahme der Mäuse bestätigte (Tab 10). Serumanalysen am Studienende bestätigten, dass das angewandte Behandlungsprotokoll die zirkulierende 3-T₁AM-Konzentration der Mäuse signifikant gegenüber der endogenen Konzentration der Lösungsmittelkontrolle gesteigert hat (Abb. 8 B). 3-T₁AM wird *in vivo* in Mäusen innerhalb von Minuten bis Stunden in Gewebe aufgenommen und metabolisiert (165). Dementsprechend war die 3-T₁AM-Serumkonzentration zum Zeitpunkt der Messung (24 h nach der letzten 3-T₁AM-Injektion) im Vergleich zur Kontrollgruppe nur ca. 4fach erhöht (Abb. 8 B). Es ist jedoch davon auszugehen, dass zu anderen Zeitpunkten und in bestimmten Geweben höhere Mengen 3-T₁AM vorhanden waren (165, 193). Dies konnte aufgrund der limitierten Serumengen und der noch nicht validierten Methoden zur Analyse von SDH-Metaboliten in Gewebe im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht genauer bestimmt werden. Eine Studie mit radioaktiv markiertem 3-T₁AM ([¹²⁵I]-3-T₁AM) deutet darauf hin, dass exogen appliziertes 3-T₁AM in Mäusen die Schilddrüse erreicht (193). Die Autoren quantifizierten hier jedoch nicht 3-T₁AM selbst, sondern lediglich die mit der Markierung einhergehende Radioaktivität. Daher sind die thyroidalen Signale besonders unter dem Aspekt des 3-T₁AM-Metabolismus *in vivo* mit Bedacht zu betrachten (165).

4.2 3-T₁AM-Behandlung reduziert die Expression essentieller SDH-Synthesegene in Thyreozyten

Es wurde vielfach demonstriert, dass eine eingeschränkte Expression bzw. Funktion von NIS (194), PDS (195) und TG (196) in der Ausbildung einer Hypothyreose resultieren, da diese essentielle Komponenten der SDH-Biosynthese sind. Die beobachtete verminderte thyroideale mRNA-Expression von *Nis*, *Tg* und *Pds* nach 3-T₁AM-Behandlung (Abb. 9 A) unterstützt demnach die Hypothese, dass 3-T₁AM die SDH-Homöostase beeinflusst. Nis ist

als basolateraler Iodidtransporter in Thyreozyten für die Anreicherung von Iodid in der SD und damit für den initialen Schritt der SDH-Biosynthese verantwortlich (11). Allein eine eingeschränkte Iodidaufnahme in die SD durch 3-T₁AM-abhängig verminderte Nis-Expression könnte wie im Falle von Iodmangelversorgung zur Entwicklung einer Hypothyreose führen (70, 197). Die Relevanz der 3-T₁AM-Wirkung auf die thyroideale Nis-mRNA-Expression *in vivo* wird durch verminderte Nis-Expression und -Funktion in PCCL3 Thyreozyten *in vitro* untermauert (Abb. 19). Tg, das den Hauptbestandteil des follikulären Kolloids ausmacht, wird als Ausgangsmatrix für die SDH-Biosynthese benötigt. Es stellt die Tyrosinreste bereit, die iodiert und zu SDH gekoppelt werden (198). Eine Verminderung der Tg-mRNA nach 3-T₁AM-Behandlung (Abb. 9 A) könnte demnach zu geringerer Tg-Synthese und -Verfügbarkeit führen und so die SDH-Produktion einschränken. Pendrin ist einer der apikalen Iodidtransporter des Thyreozyten und transportiert Iodid aus dem Thyreozyten in das Follikellumen, wo es zur Iodierung der Tyrosinreste des Tg benötigt wird (13, 199). Die potentielle Bedeutung einer Kombination aus 3-T₁AM-abhängig eingeschränkter Iodidaufnahme in den Thyreozyten via Nis und gleichzeitig verringerter *Pds*-Expression (Abb. 9 A) kann am Krankheitsbild Pendred Syndrom verdeutlicht werden. Patienten mit biallelischer Mutation im *PDS*-Gen zeigen verminderte thyroideale Iod-Organifizierung (14, 200), die sich besonders in Situationen knapper Iodidversorgung als Hypothyreose manifestiert (200).

4.2.1 Direkte Wirkung von 3-T₁AM auf Thyreozyten ohne Interferenz mit der HPT-Achse

Im klassischen Konzept der HPT-Achse wird die SD-Funktion inklusive der Expression von SDH-Biosynthesegenen durch TSH aus der Hypophyse kontrolliert. TSH wiederum unterliegt der Kontrolle von TRH (siehe 1.2). Die Hypothese dieser Doktorarbeit ist jedoch, dass 3-T₁AM unabhängig von einer HPT-Achsen-Regulation eine direkte Wirkung auf die SD vermittelt. Die nach 3-T₁AM-Gabe unveränderte Expression von hypophysärem *Tshb* (Abb. 9 B), das für die spezifische β -Untereinheit des TSH kodiert, ist ein erster Hinweis, dass die HPT-Achse im experimentellen System nicht beeinflusst wurde. Die Analyse der *Tshb*-Genexpression ist ein sehr sensibler Marker für Veränderungen im SDH-Status des Organismus. Dies wird an der als Positivkontrolle durchgeführten Behandlung mit einer 1·10⁶mal niedrigeren T₃-Konzentration (5 ng/kg) deutlich. Hier war *Tshb* nach demselben Behandlungszeitraum mit der vergleichsweise geringen T₃-Dosis klar supprimiert (Abb. 15 B). Hinzu kommt, dass das Muster der nach 3-T₁AM-Behandlung in der SD regulierten Gene an sich nicht für eine

DISKUSSION

Konsequenz veränderter TSH-Spiegel spricht. Im T_3 -Kontrollversuch ist zu sehen, dass einhergehend mit dem supprimierten TSH neben *Nis*, *Tg* und *Pds* auch *Tshr*, *Tpo*, *Duox2* und *Dio1* herunterreguliert waren (Abb. 15 A). Die Expression dieser Gene war nach 3- T_1 AM-Gabe jedoch unverändert (Abb. 9 A). Dies zusammen mit unveränderten SDH- Serumkonzentrationen nach 3- T_1 AM-Behandlung (Abb. 9 C) spricht gegen eine Beteiligung von TSH an der 3- T_1 AM-induzierten thyroidalen Genregulation. Die TSH-Konzentration in Mausseren selbst wurde nicht bestimmt. In der Literatur beschriebene Daten für *Tshb* und im Serum gemessene TSH-Konzentrationen korrelieren (201, 202) und eine Diskrepanz wurde bei Verwendung einer adäquaten Analyseverfahren nicht beschrieben. Das begrenzt verfügbare Serum, das am Ende der Studie gesammelt wurde, wurde für die Analytik von SDH und SDH-Metaboliten verwendet.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte 3- T_1 AM-Mausstudie umfasste einen Behandlungszeitraum von 7 Tagen. Genexpressionen und Hormonkonzentrationen wurden 24 h nach der letzten 3- T_1 AM-/Lösungsmittel-Injektion analysiert. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eventuelle durch die Behandlung induzierte Genregulationen oder hormonellen Veränderungen bis zum Zeitpunkt der Analysen kompensiert oder abgeschwächt wurden. Die HPT-Achse der Mäuse wurde deshalb genauer auf Spuren von Veränderungen untersucht. Die TSH-Expression wird im Rahmen der HPT-Achse durch TRH aus dem Hypothalamus stimuliert. *Trhr* und *Trhde* sind für Transduktion bzw. Terminierung des TRH-Signals an der Hypophyse verantwortlich und werden durch SDH (siehe 1.2.2) und TRH reguliert (51, 203). Besonders die *Trhde*-Genexpression reagiert langanhaltend und sensitiv nach T_3 -Stimulation (Abb. 15 B). Die unveränderte Expression von *Trhr* und *Trhde* nach wiederholter 3- T_1 AM-Injektion (Abb. 9 B) weist auf unveränderte hypothalamische TRH-Sekretion und einen unveränderten hypophysären SDH-Status hin. Die in der Hypophyse exprimierte *Dio2* ist ein durch T_3 negativ reguliertes Gen (204) und deiodiert T_4 zu T_3 , welches dann am *Thrb* das entsprechende Signal zur Supprimierung der TSH-Sekretion gibt. Zusätzlich zur Regulation dieser Gene als Indikator veränderter hypophysärer SDH-Konzentrationen, könnte eine direkt 3- T_1 AM-abhängig veränderte Expression dieser Gene, das SDH-Feedback auf die TSH-Expression möglicherweise indirekt beeinflussen. Beide Möglichkeiten werden aufgrund der unveränderten Genexpression von *Dio2* und *Thrb* nach 3- T_1 AM-Behandlung (Abb. 9 B) ausgeschlossen. Interessanterweise war auch im Kontrollversuch mit T_3 -Behandlung keine signifikante Änderung der mRNA-Expressionsstärke dieser

Gene zu verzeichnen (Abb. 15 B). Dies könnte an der vergleichsweise geringen verwendeten T_3 -Konzentration und der kurzen Halbwertszeit von T_3 (ca. 1 d) *in vivo* liegen (169), die auch dazu führte, dass keine signifikante Erhöhung der T_3 -Serumkonzentration am Studienende messbar war.

Zusammenfassend sprechen die Daten dafür, dass die HPT-Achse durch wiederholte 3- T_1 AM-Behandlung über 7 Tage nicht beeinflusst wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass die 3- T_1 AM-Behandlung die Expression von SDH-Synthesegenen durch direkte Wirkung an der SD verminderte.

4.2.2 Unveränderte Serum-SDH-Konzentration trotz verringerter Expression essentieller SDH-Synthesegene nach wiederholter 3- T_1 AM-Behandlung

Basierend auf der von Klieverik *et al.* beschriebenen Suppression der HPT-Achse nach einmaliger hochdosierter 3- T_1 AM-Injektion (125) und der verringerten thyroidalen *Nis*-, *Tg*- und *Pds*-Expression nach wiederholter 3- T_1 AM-Injektion mit niedrigerer Dosis (Abb. 9 A), wurden verminderte SDH-Serumkonzentrationen der Mäuse erwartet. Analysen der Seren (Abb. 9 C) zeigten jedoch, dass die 3- T_1 AM-abhängige Generegulation der SDH Synthesemaschinerie (Abb. 9 A) sich nicht in den zirkulierenden SDH manifestiert hat. Dafür spricht auch, dass Herzgewicht und Körpertemperatur als klassische Ziele der T_3 -Wirkung (Tab. 12) nach 3- T_1 AM-Behandlung unverändert waren (Tab. 10). Aus Serumkonzentrationen der SDH kann jedoch nicht direkt auf deren Gewebekonzentrationen geschlossen werden (205, 206). Um festzustellen, ob die Mäuse tatsächlich euthyreot waren, müssten Gewebe-SDH-Konzentrationen gemessen werden (205). Die Validierung der entsprechenden Methoden muss am IEE jedoch zunächst noch abgeschlossen werden.

Die Wirkung der SDH auf die Expression SDH-responsiver Gene kann jedoch Hinweise über den SDH-Status von Geweben geben. Die Leber ist ein wichtiges Zielorgan der SDH-Wirkung und ein Ort des SDH-Metabolismus, des SDH-Abbaus sowie der SDH-Eliminierung. Während hepatische Dio-Aktivität SDH aktivieren oder inaktivieren kann, spielt die Glucuronidierung und Sulfokonjugation von SDH eine Rolle für deren Eliminierung. Zusätzlich reguliert die Sulfokonjugation die SDH-Deiodierung (116). Unveränderte Genexpression der T_3 -responsiven Gene *Dio1* (207, 208) und *Spot 14* lassen darauf schließen, dass die hepatische SDH-Homöostase durch die 3- T_1 AM-Behandlung nicht verändert wurde (Abb. 9 B). Zusätzlich sprechen unveränderte Genexpressionen der T_3 -metabolisierenden Enzyme

Sult1a1 (209) und *Ugt1a1* (210) gegen die Möglichkeit, dass 3-T₁AM die SDH-Eliminierung über einen sekundären Mechanismus moduliert und damit die Serum-SDH-Konzentrationen beeinflusst haben könnte (211, 212). Um diese Möglichkeit vollständig auszuschließen, müssten diese Enzymaktivitäten allerdings in weiterführenden Experimenten bestimmt werden.

Ein möglicher Erklärungsansatz für den unveränderten SDH-Serumstatus der Mäuse ist, dass die 3-T₁AM-Behandlungsdauer von 7 d nicht ausreichte, um die thyroidalen SDH-Speicher zu depletieren und sich ein potenzieller Effekt von 3-T₁AM so noch nicht im Serum manifestieren konnte (28, 213). Di Cosmo *et al.* beschrieben beispielsweise, dass die SD-Speicher von Mäusen unter chemischer Blockade der SDH-Synthese in Kombination mit Iodmangel-Ernährung erst nach einer Dauer von 2 Wochen nahezu depletiert waren (28). Demnach kann die zirkulierende Menge an SDH auch bei verminderter SDH-Synthese durch Sekretion der intrathyroidalen Speicher für einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten werden. Eine weiterführende Theorie ist, dass nach 3-T₁AM-Behandlung eine Kompensation verminderter SDH-Biosynthese über vermehrten SDH-Transport aus der SD heraus über hochregulierte SDH-Transporter stattgefunden hat, wie es für Mct8 im Rahmen einer Iodmangel-induzierten Hypothyreose in Mäusen beschrieben wurde (214). Die Tendenz erhöhter thyroidaler Mct8-Proteinexpression nach 3-T₁AM-Behandlung *in vivo* unterstützt diese Theorie. Allerdings stand nicht genügend SD-Material zur Verfügung um dieser Regulation in einer angemessenen Anzahl von Tieren nachzugehen. Die 3-T₁AM-abhängig erhöhte Mct8-Proteinexpression in PCCL3 Zellen (Abb. 23) bestärkt die Theorie, dass tatsächlich erhöhte Mct8-Proteinexpression in der SD zu vermehrter SDH-Sekretion führen und damit die Serum-SDH-Konzentration trotz eingeschränkter SDH-Biosynthese für einen begrenzten Zeitraum aufrechterhalten könnte.

4.2.3 Morphologische Veränderungen der murinen SD nach wiederholter Behandlung mit 3-T₁AM

Morphologische Änderungen der SD geben Aufschluss über deren Funktion oder Pathologie. So ist beispielsweise die Reduktion der Epithelhöhe und ein Anstieg des folliculären Kolloids in Ratten parallel zu verminderter SDH-Synthesekapazität im Rahmen des Wolff-Chaikoff-Effekts dokumentiert (72). Die veränderte SD-Morphologie nach 3-T₁AM-Behandlung

DISKUSSION

(Abb. 11) macht daher deutlich, dass 3-T₁AM trotz unveränderter SDH-Serumkonzentration am Studienende funktionelle Effekte an der SD bewirkt hat.

Niedrige SDH-Konzentrationen erhöhen die TSH-Konzentration in der Zirkulation (215). Über einen längeren Zeitraum kann die dadurch auftretende gesteigerte TSH-Stimulation der SD zumindest in Nagern eine Vergrößerung der Follikel aufgrund von Hyperproliferation der SD-Epithelzellen bewirken (27, 216). Nach 3-T₁AM-Behandlung vergrößerte SD-Follikel und Follikellumina könnten einen solchen Sachverhalt indizieren (Abb. 11 und 12). Dagegen spricht jedoch, dass die Mäuse in der hier durchgeführten Studie nur 7 d behandelt wurden, die Zahl der Thyreozyten pro SD-Lobus nach 3-T₁AM-Behandlung unverändert und die hypophysäre *Tshb*-Genexpression nicht reguliert war (Abb. 9 B). Da also höchstwahrscheinlich keine Follikelvergrößerung aufgrund von Hyperproliferation der Thyreozyten stattgefunden hat, muss hier ein anderer Mechanismus zugrunde liegen. Weil die Aufrechterhaltung der SDH-Serumkonzentration von solch essentieller Bedeutung ist (siehe 1.3.1), hat die Speicherung von Tg in hohen Konzentrationen im SD-Follikellumen eine wichtige physiologische Funktion. Auf diese Weise kann Tg als Iodidspeicher fungieren und schnell mobilisiert werden um SDH freizusetzen (217). Erhöhter luminaler Tg-Gehalt könnte für die Vergrößerung von Follikellumina der SD nach 3-T₁AM-Behandlung verantwortlich sein (27). Der Tg-Gehalt im Follikellumen wird bestimmt durch Export von intrazellulär synthetisiertem Tg in das Lumen und endozytotischer Wiederaufnahme des iodierten Tg zur Freisetzung der SDH (218). Aufgrund der verminderten *Tg*-mRNA nach 3-T₁AM-Behandlung erscheint es unwahrscheinlich, dass gesteigerte intrazelluläre Tg-Synthese und -Export in die Lumina deren Volumina vergrößert haben. Bei unverändertem Export und gleichzeitig verringerter Aufnahme von Tg in die Thyreozyten würde sich der luminaler Tg-Gehalt ebenfalls erhöhen (218). Geringere Aktivität von Cathepsinen, die das Tg partiell solubilisieren und für die Aufnahme in den Thyreozyten vorbereiten, könnte hier eine Rolle spielen ((27) und Abb. 32). Die Expression und Aktivität von Cathepsinen nach 3-T₁AM-Behandlung sollte daher in zukünftigen Studien untersucht werden.

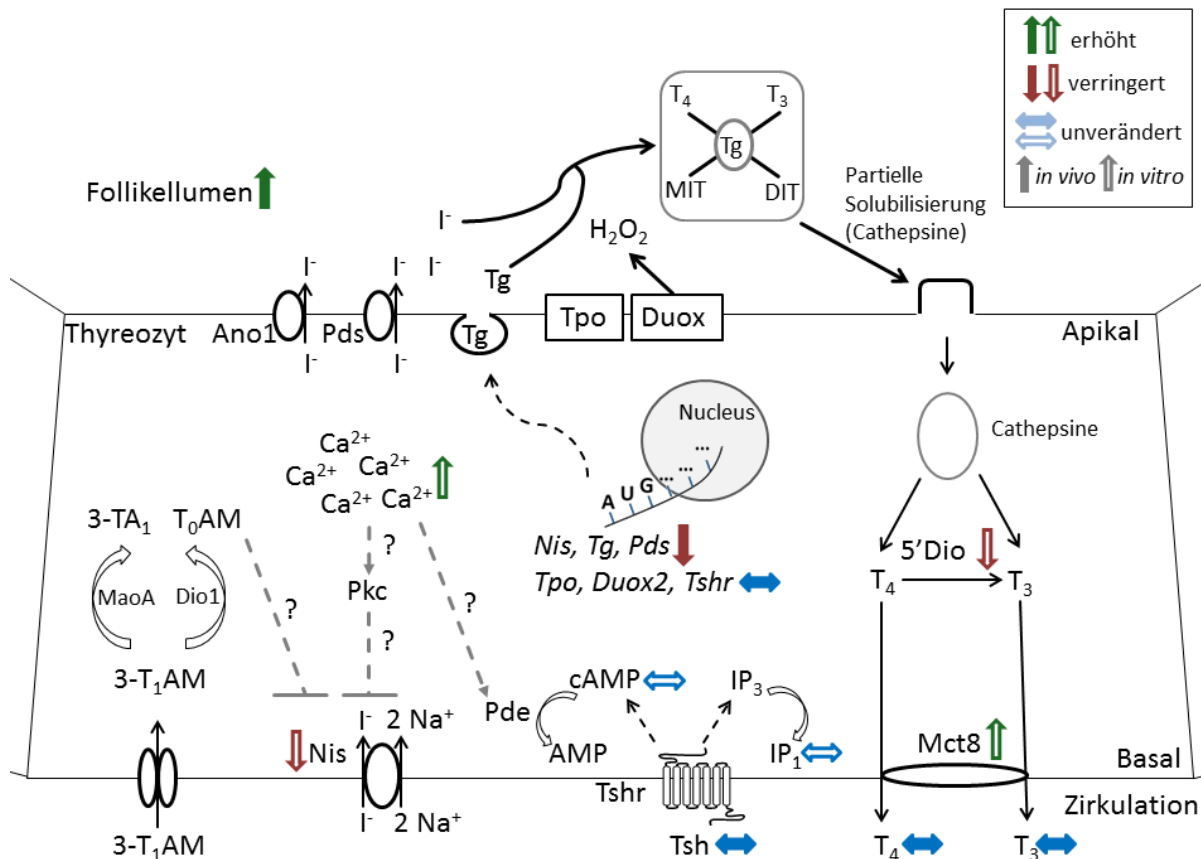


Abbildung 32: Kombinierte schematische Übersicht über 3-T₁AM-Wirkungen *in vivo* und *in vitro* mit möglichen Mechanismen.

Abgebildet sind beobachtete Wirkungen wiederholter 7 d Behandlung mit 3-T₁AM in murinen Schilddrüsen *in vivo* sowie Effekte unterschiedlich langer 3-T₁AM-Stimulation (von 3 min bis 48 h) in PCCL3 Thyreozyten *in vitro*.

4.3 Überlegungen zur Möglichkeit eines Wolff-Chaikoff-Effekts nach 3-T₁AM-Behandlung / Kontrollversuch mit Iod-freiem T₀AM

3-T₁AM ist ein iodiertes Molekül, das in verschiedenen experimentellen Systemen deiodiert wird (165) – so auch in Thyreozyten *in vitro* ((140) und Abb. 17). Iodid, das an sich Regulator der SD-Funktion ist, muss also bei der Interpretation von 3-T₁AM-Wirkungen auf die SD in Erwägung gezogen werden (71, 72). Wolff und Chaikoff demonstrierten, dass die Organifizierung von Iodid in der Ratten-SD inhibiert wird, wenn die Plasma-Iodidkonzentration eine kritische Schwelle überschreitet (71). Die inhibierte Iodid-Organifizierung im Rahmen des Wolff-Chaikoff-Effektes ist transient (in Ratten 26-50 h) und kann unter anderem durch verringerte Nis-Expression so kompensiert werden, dass die SDH-Biosynthese wieder fast normal abläuft (72, 76). Ein Tierversuch mit Iodid konnte aufgrund fehlender Tierversuchsgenehmigung nicht durchgeführt werden. Außerdem war nicht abzuschätzen, wie viel Iodid im Rahmen des angewendeten 3-T₁AM-Behandlungsprotokolls tatsächlich freigesetzt wurde. Dies über die Produktion von 3-T₁AM-Deiodierungsprodukten

DISKUSSION

zu bestimmen ist praktisch schwer durchführbar, da alle Gewebekonzentrationen sowie die Konzentration aller Ausscheidungsprodukte von 3-T₁AM und dessen Metaboliten gemessen werden müsste (165, 193). Die Analyse von Iodid im Urin könnte hier in zukünftigen Studien zumindest Anhaltspunkte über das Ausmaß der generellen Iodidbelastung der Tiere geben. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Iod-freie Metabolit T₀AM herangezogen, um der Frage nach der Rolle des Iodids nachzugehen. Da T₀AM wie 3-T₁AM nach Einmalinjektion Plasma SDH und TSH in Ratten supprimiert (125), besteht Anlass zu vermuten, dass T₀AM in dieser Hinsicht als aktiver Iod-freier Metabolit des 3-T₁AM wirkt. Die Daten aus der hier durchgeführten Mausstudie zeigen allerdings, dass T₀AM-Behandlung zwar ebenfalls die thyroideale Genexpression (Abb. 13 A) und Morphologie (Abb. 14) beeinflusst, die Wirkungen von 3-T₁AM jedoch nicht direkt widerspiegelt. Sogar partiell gegensätzliche Wirkungen auf die SD-Morphologie wurden beobachtet. Über die Pharmakokinetik des T₀AM ist wenig bekannt, daher ist schwer abzuschätzen, ob unterschiedliche Wirkungen von 3-T₁AM und T₀AM eventuell von unterschiedlicher Aufnahme, Metabolisierung und Eliminierung der beiden SDH-Metaboliten herrühren. 3-T₁AM ist *in vitro* Substrat von Dio3 (138) und Dio1 (Abb. 17 D), was zur Bildung von größeren Mengen T₀AM führt. *In vivo* jedoch ist T₀AM nach 3-T₁AM-Applikation nur in geringen Mengen detektierbar, wobei die T₀AM-Abundanz durch β -Glucuronidase-Inkubation der analysierten Gewebe erhöht wird (165). Dies ließ die Autoren Hackenmüller und Scanlan vermuten, dass T₀AM *in vivo* schnell ausgeschieden oder weiter metabolisiert wird (165). 3-T₁AM hingegen scheint endogen zumindest im Menschen eine lange Halbwertszeit zu haben (121). Da die Bioverfügbarkeit das Wirkprofil einer Substanz erheblich beeinflusst, lassen die Befunde der T₀AM-Studie letztendlich keine klaren Schlüsse darüber zu, ob speziell das in der 3-T₁AM-Struktur enthaltene Iodid für dessen thyroideale Wirkungen verantwortlich ist oder nicht.

Eine Reihe von Befunden spricht jedoch gegen eine Rolle des Wolff-Chaikoff-Effekts in der Vermittlung der thyroidalen 3-T₁AM-Wirkung. Die *Tpo*-Genexpression war nach 3-T₁AM-Behandlung in Mäusen nicht reguliert (Abb. 9 A), während sie in einem Wolff-Chaikoff-Modell in Ratten nach 6 d Iodidapplikation niedriger als in Kontrollen war (76). Die *Tg*-Genexpression hingegen war in der betreffenden Rattenstudie unverändert (76), während diese in der hier vorliegenden 3-T₁AM-Mausstudie vermindert war (Abb. 9 A). Über die *Pds*-Expression im Rahmen von Iodexzess gibt es widersprüchliche Befunde (219-221). Hier spielen aber Spezies, Iodidkonzentration und Dauer der Behandlung eine Rolle. Nach

Iodidexzess über einen kurzen Zeitraum wurde eine Hochregulation von Pds in PCCL3 Zellen und Ratten beschrieben (219, 220), während in dieser Doktorarbeit *in vivo* eine verminderte und *in vitro* keine Regulation der Pendrin-Expression nach 3-T₁AM-Gabe beobachtet wurde (Abb. 9 A). Zusätzlich entspricht die Änderung des morphologischen Phänotyps nach 3-T₁AM-Gabe wie unter 4.2.3 beschrieben nicht dem Bild, das in Wolff-Chaikoff-Studien beschrieben wurde. So wurde eine verminderte epitheliale Ausdehnung wie im Rahmen von Iodexzess (72, 221) nach 3-T₁AM-Behandlung nicht beobachtet (Abb. 11 E).

Zusammengenommen sprechen die Daten dafür, dass den *in vivo* Effekten der 3-T₁AM-Behandlung ein anderer Wirkmechanismus als ein Iodidüberschuss zu Grunde liegt.

4.3.1 Eigenes Wirkprofil wiederholter T₀AM-Behandlung von Mäusen

Verminderte thyroideale Genexpression des *Tshr* (Abb. 13) sowie kleinere SD-Folikellumina nach T₀AM-Behandlung (Abb. 14) deuten auf eine Interferenz von T₀AM mit der SDH-Homöostase, wie bereits nach Einmaldosis im Rattenversuch beschrieben, hin (125). Eine geringere Expression des *Tshr* könnte dazu führen, dass die TSH-Stimulation der SD trotz unveränderter Serum-TSH-Konzentration (Abb. 13 B) verringert und die SDH-Biosynthese so vermindert wird. Dies könnte z.B. zu reduzierter Tg-Synthese und vermindertem Export in das Follikellumen führen. Bei gleichzeitig unveränderter Wiederaufnahme des iodierten Tg würde dies in verkleinerten Follikellumina resultieren (Abb. 14).

Die verringerte mRNA-Expression des T₃-responsiven Gens *Spot14* in der Leber (Abb. 13 B) unterstützt die Annahme einer Interferenz von T₀AM mit dem SDH-Status der Mäuse. Die zirkulierenden SDH-Konzentrationen am Ende der Studie, sowie die unveränderte hepatische *Dio1*-Expression und die unveränderte Genexpression regulatorischer Komponenten der HPT-Achse hingegen sprechen für einen euthyreoten Zustand der Mäuse (Abb. 13). Auch hier ist wieder zu bedenken, dass die Tiere für 7 Tage behandelt und alle Analysen 24 h nach der letzten Injektion durchgeführt wurden. Eine Kompensation von T₀AM-Wirkungen kann also theoretisch bereits stattgefunden haben. Über die funktionelle Relevanz der nach T₀AM-Behandlung veränderten Genexpressionen können demnach schwer Schlüsse gezogen werden.

Unabhängig von einer veränderten zirkulierenden oder hepatischen SDH-Konzentration könnte die hepatische *Spot14*-Genexpression auch über einen direkten oder indirekten T₀AM-abhängigen Mechanismus verringert worden sein. Analysen der Genstruktur auf

responsive Elemente und Analysen der Genregulation durch intrazelluläre Signaltransduktion können hier in zukünftigen Versuchen Aufschluss geben.

Die nach T₀AM-Behandlung beobachteten thyroidalen und hepatischen Effekte lassen erwarten, dass wiederholte T₀AM-Applikation auf längere Sicht zu verringerten zirkulierenden SDH-Konzentrationen führen könnte. Die Vermittlung dieser Wirkung scheint mechanistisch jedoch anders als nach 3-T₁AM-Behandlung abzulaufen.

4.4 Direkte Wirkungen von 3-T₁AM auf Thyreozyten *in vitro*

Die direkte Wirkung von 3-T₁AM auf Thyreozyten im isolierten System wurde anhand der Rattenzelllinie PCCL3 untersucht (171, 222). Als *in vitro* Modell eignen sich diese Zellen trotz Rattenursprungs gut, da sie hochdifferenziert und nicht transformiert sind, wie es die üblichen humanen Thyreozytenzelllinien wie ML-1 (223) und XTC.UC1 (224) sind. PCCL3 stellen ein *in vivo*-nahes System dar, da ihre Tshr-Signaltransduktion funktional ist und sensitiv auf den TSH-Stimulus reagiert. Weiterhin exprimieren PCCL3 Zellen alle Komponenten der SDH-Biosynthesemaschinerie (171), während beispielsweise das verwandte Rattenthreozytenmodell FRTL5 keine funktionelle Tpo besitzt (225).

4.4.1 3-T₁AM inhibiert die Nis-Expression und -Funktion in PCCL3 Zellen

Die 3-T₁AM-abhängig verringerte TSH-stimulierte *Nis*-mRNA-Expression in PCCL3 Zellen (Abb. 19 A) untermauert die Annahme, dass 3-T₁AM die SDH-Biosynthese über eine verminderte Expression von SDH-Synthesegenen durch direkte Wirkung an Thyreozyten verursachen kann. Im *in vivo* Modell war es aufgrund unzureichender Sensitivität des Antikörpers in der komplexen SD-Matrix und limitierter Probenmenge nicht möglich die *Nis*-Proteinexpression detailliert zu untersuchen. Weiterhin konnte die Iodidaufnahme in die SD im Tier nicht analysiert werden, da hier radioaktives Iod verwendet werden müsste und die Genehmigung für einen solchen Versuch nicht vorlag. Die *in vitro* Daten zeigen jedoch stellvertretend, dass eine 3-T₁AM-abhängige Reduktion der *Nis*-mRNA in einem Ausmaß, das auch im Tierversuch beobachtet wurde, zu verminderter *Nis*-Proteinexpression führt (Abb. 19 B), die sich in reduzierter *Nis*-vermittelter Iodidaufnahme in die Zellen manifestieren kann (Abb. 21 B). Reduzierte *Nis*-Genexpression durch direkte Wirksamkeit von 3-T₁AM an der SD könnte also die Aufnahme von Iodid in die SD vermindern und so zu

einem Mangel für die SDH-Biosynthese verfügbaren Iodids führen und diese in der Folge einschränken.

Auch in PCCL3 Zellen wurde die inhibitorische Wirkung von Iodidexzess auf den Nis demonstriert. In den meisten Studien wurden experimentelle Daten mit 1 mM Iodid präsentiert, allerdings waren laut den Autoren auch niedrigere Dosen (ab 1 μ M) aktiv (226, 227). Ein Wolff-Chaikoff-Effekt wird in der Vermittlung der 3-T₁AM-abhängigen Nis-Inhibition in PCCL3 Zellen jedoch ausgeschlossen, da bereits 100 nM 3-T₁AM die *Nis*-Genexpression hemmen (Abb. 19 A). Selbst im Falle einer vollständigen Deiodierung des 3-T₁AM wäre die freie Iodidmenge dann nicht ausreichend, um in diesem System einen Wolff-Chaikoff-Effekt auszulösen (226, 227). Dies wird dadurch bestätigt, dass eine äquimolare Dosis Iodid die Nis-vermittelte Iodidaufnahme in PCCL3 Zellen nicht signifikant beeinflusste (Abb. 21). Hinzu kommt, dass auch nach Inkubation mit 1 μ M 3-T₁AM die Produktion von Iodidmengen, die eine Nis-Inhibition verursachen, sehr unwahrscheinlich ist, wie an der gebildeten Menge deiodierter Metaboliten nach 3 bzw. 48 h 3-T₁AM-Inkubation abgeschätzt werden kann (Abb. 17 und 22 C).

4.4.2 Potenzielle Rolle von T₀AM in der Vermittlung der 3-T₁AM-abhängigen Nis-Inhibition *in vitro*

3-T₁AM ist endogen in der Zirkulation verschiedener Spezies detektierbar (121) und liegt dort zumindest im humanen Serum gebunden an Apolipoprotein B-100 vor (123). Über die endogene Konzentration besteht noch immer kein Konsens, da die Verwendung unterschiedlicher Methoden in der Vergangenheit zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt hat (121, 132). Aus diesem Grund wurden PCCL3 Zellen vor Experimenten mit 3-T₁AM von FCS depletiert, sodass die Versuche mit einer klar definierten 3-T₁AM-Konzentration durchgeführt werden konnten. Außerdem wurden die Zellen mehrere Tage lang von TSH depletiert, um die Responsivität gegenüber einem TSH-Stimulus im Experiment zu erhöhen. Dass 3-T₁AM die TSH-abhängige Iodidaufnahme in PCCL3 Zellen nur nach Anwendung eines verlängerten Depletionsprotokolls hemmte (Abb. 21), zeigt, dass das biologische Verhalten der Zellen durch die Depletion über unterschiedlich lange Zeiträume verändert wurde. 3-T₁AM wird in PCCL3 Zellen zu 3-TA₁ und T₀AM metabolisiert (Abb. 17). Beide Metaboliten besitzen selbst biologische Aktivität (119, 125, 166) und speziell T₀AM zeigte in einer Rattenstudie ähnliche Effekte auf die HPT-Achse wie 3-T₁AM (125). Verstärkte 3-T₁AM-

Deiodierung nach verlängerter Depletion (Abb. 22) könnte transient mehr T_0AM produzieren, das als aktives Intermediat den inhibitorischen Effekt der $3-T_1AM$ -Stimulation auf die Iodidaufnahme vermittelt (Abb. 32). Die Theorie wird bekräftigt durch T_0AM -abhängige Inhibition der Nis-Funktion unabhängig des zuvor verwendeten Depletionsprotokolls. Während T_0AM die Nis-Funktion *in vitro* inhibierte, gibt es in der *in vivo* Studie keinen Hinweis dafür. Gründe dafür könnten bedingt in Behandlungsdauer oder unterschiedlicher Aufnahme, Metabolisierung und Eliminierung *in vivo* und *in vitro* liegen. Da PCCL3 Zellen aus Rattenursprung sind, die *in vivo* Studien jedoch in Mäusen durchgeführt wurden, können der Diskrepanz auch Spezies-Unterschieden zugrunde liegen. So ist beispielsweise die Art der Signalweiterleitung und die Potenz der Liganden für bestimmte Taar-Isoformen, an denen Thyronamine Liganden sind, speziesabhängig verändert (145, 148, 152). Zusammenfassend ist T_0AM als aktiver Metabolit in der Vermittlung von Effekten nach $3-T_1AM$ -Stimulation nicht ausgeschlossen und sollte weiter untersucht werden.

4.4.3 $3-T_1AM$ und Dio1-Aktivität in PCCL3 Zellen

$3-T_1AM$ wird von PCCL3 Zellen aufgenommen und intrazellulär zu $3-TA_1$ und T_0AM metabolisiert, wie es bereits für andere Zelllinien beschrieben ist (140, 141). In Übereinstimmung mit der Literatur wurde auch in PCCL3 Zellen die Monoaminoxidase A als katalytisches Enzym der Desaminierung von $3-T_1AM$ zu $3-TA_1$ identifiziert (Abb. 17 C) (164, 228). Das $3-T_1AM$ -deiodierende Enzym in PCCL3 Zellen wurde unter Verwendung des spezifischen Inhibitors PTU als Dio1 identifiziert (Abb. 17 D). Dies steht im Widerspruch zu Daten von Piehl *et al.* 2008 (138). Dort wurde gezeigt, dass $3-T_1AM$ nicht durch Lysate Dio1 exprimierender HepG2, jedoch durch Lysate Dio3 exprimierender ECC1 Zellen zu T_0AM deiodiert wird (138). Aufgrund der PTU-Sensitivität der T_0AM -Bildung und des formalen Nachweises hoher TSH-abhängiger Dio1-Aktivität in PCCL3 Zellen (Abb. 22 A) sind die in diesem Zellmodell erhaltenen Daten dennoch überzeugend (229, 230). Die widersprüchlichen Befunde im Vergleich zu den mit HepG2 Zellen durchgeführten Versuchen (138) könnten in Gewebe- oder Speziespezifität der Reaktion begründet sein, da HepG2 Zellen aus einem humanem hepatozellulären Karzinom abgeleitet sind. Weiterhin wurden PCCL3 Zellen als intaktes System verwendet und in Krebs-Ringer-Puffer mit pH 7,4 inkubiert, während in der Studie von Piehl *et al.* Zelllysate in Anwesenheit von Kaliumphosphatpuffer mit pH 6,8 inkubiert wurden (138), was die Aktivität der Dio1 beeinflussen könnte.

In vivo Studien aus Ratten belegen, dass die Dio1-Aktivität verschiedener Gewebe abhängig vom Iodidstatus des Organismus ist. So verringerte Iodexzess die thyroideale Dio1-Aktivität, während diese im Rahmen einer Ioddepletion erhöht wurde (231, 232). Dass die Dio1-Aktivität der PCCL3 Zellen nach 3-T₁AM-Inkubation deutlich vermindert war (Abb. 22 A und B), wirft demnach auch hier wieder die Frage des 3-T₁AM-abhängig induzierten Wolff-Chaikoff-Effekts auf. Iodidexzess vermindert neben der Aktivität jedoch auch die *Dio1*-mRNA-Expression in Ratten (232). In PCCL3 Zellen hingegen modulierte 3-T₁AM die *Dio1*-Genexpression nicht und im verwandten FRTL5-Modell (Rattenthireozyten) wurde selbst nach Inkubation mit der sehr hohen Konzentration von 100 µM 3-T₁AM für bis zu 72 h keine veränderte *Dio1*-Genexpression detektiert (140). Die Inhibition der Enzymaktivität könnte unabhängig von der mRNA-Expression auch durch Inaktivierung und Degradation der Dio1 analog zur Hemmung durch rT₃ oder Iopansäure vermittelt werden (180, 233).

Die 3-T₁AM-bedingte partielle Inhibition der Dio1-Aktivität stärkt die Hypothese, dass 3-T₁AM direkt an der SD auf die SDH-Homöostase Einfluss nimmt. Eine Hemmung der thyroidalen Dio1 würde die von der SD gebildete Menge des aktiven SDH T₃ durch Deiodierung aus T₄ vermindern. Um dieser Theorie nachzugehen, müsste in zukünftigen Untersuchungen die Dio1-Aktivität in SD nach 3-T₁AM-Behandlung bestimmt werden. Weiterhin spricht die 3-T₁AM-abhängige Hemmung der basalen Dio1-Aktivität ohne TSH-Stimulation (Abb. 22 B) dafür, dass hier ein eigener Wirkmechanismus des 3-T₁AM unabhängig von der alleinigen Modulation des TSH-Signals vorliegt.

4.4.4 3-T₁AM-abhängige Modulation des Energiestoffwechsels in PCCL3 Zellen

Da 3-T₁AM glucoregulatorische Wirkung hat (120, 125, 128) und ein Verlust der Iodidaufnahme im Rahmen von SD-Tumorprogression von gesteigerter Glucoseaufnahme begleitet wird (234), wurde untersucht, ob 3-T₁AM auch die Glucosehomöostase von PCCL3 Zellen moduliert und eventuell zu einer Dedifferenzierung der Zellen führt. Die Glucoseverwertung (gemessen als ECAR) der PCCL3 Zelllinie unterliegt trotz mehrerer Passagen *in vitro* noch immer der Regulation durch TSH (Abb. 25 D-F), was in diesem Modell gewonnenen Daten physiologische Relevanz zuspricht (235). Der TSH-abhängigen Stimulation der Glucoseverwertung könnte eine erhöhte Glucoseaufnahme (236) aufgrund gesteigerter Glut1-Translokation zur Membran zugrunde liegen, wie es für das verwandte FRTL-5 Zellmodell in der Literatur beschrieben ist (237). 3-T₁AM greift ebenso regulatorisch in

den Glucosestoffwechsel der Thyreozyten ein (Abb. 26). In FRTL5 Zellen senkte die Inkubation mit 100 μM 3-T₁AM die Glucoseaufnahme in die Zellen innerhalb von 60 min (140). Die 3-T₁AM-abhängige Inhibition der TSH-stimulierten Glucoseverwertung könnte also durch eine verminderte Aufnahme von Glucose in die Zellen vermittelt sein (140). Glut1 ist der wichtigste Glucosetransporter in der Ratten-SD. Zwar war die mRNA-Konzentration des *Glut1* nach 3-stündiger 3-T₁AM-Stimulation nicht signifikant verändert, jedoch wurde in einer Studie von Andrade *et al.* in PCCL3 auch eine mRNA-unabhängige Regulation des Glut1-Proteins demonstriert (238). In zukünftigen Studien könnte geklärt werden, ob eine 3-T₁AM-abhängige Regulation der Glut1-Proteinexpression zu verändertem Glucosemetabolismus in PCCL3 Zellen führt. Der Pentosephosphatweg ist neben der Glycolyse ein Glucoseabbauweg, der im Energiestoffwechsel von Thyreozyten eine wichtige Rolle spielt und TSH-abhängig reguliert wird (235). In weiterführenden Experimenten muss unter Verwendung spezifischer Substrate und Inhibitoren geklärt werden, welchen der beiden Glucoseabbauwege die mittels Seahorse gemessene ECAR repräsentiert.

4.5 Intrazelluläre Signaltransduktion von 3-T₁AM in Thyreozyten

Da 3-T₁AM in den in der Doktorarbeit durchgeführten Experimenten physiologische Prozesse modifiziert, die im Thyreozyten zum größten Teil der Kontrolle durch TSH unterliegen, wurde zuerst geprüft, ob 3-T₁AM mit Tshr nachgeschalteten Signalwegen, die zur Erhöhung intrazellulärer IP₃- oder cAMP-Konzentration führen, interferiert (239).

4.5.1 Keine Modulation der intrazellulären IP₃-Konzentration in PCCL3 durch 3-T₁AM

Der sekundäre Botenstoff IP₃ scheint in PCCL3 Zellen im Kontext der hier durchgeführten Experimente keine offensichtliche Rolle zu spielen, da TSH-Konzentrationen, die zu physiologischen Prozessen wie Proliferation (Abb. 18) und gesteigerter Iodidaufnahme führten, die intrazelluläre IP₃-Konzentration nicht steigerten (3.2.7). Möglicherweise liegt das TSH-stimulierte IP₃-Signal unter der Detektionsgrenze des Assays, prinzipiell ist die fehlende IP₃-Induktion jedoch in Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur. So wurde beschrieben, dass die IP₃-Bildung in FRTL5 Rattenthreozyten nur bei TSH-Konzentrationen über 20 mU/ml detektiert werden konnte (240). Grundsätzlich wurde mehrfach demonstriert, dass zur Stimulation des IP₃-Signals TSH-Mengen verwendet werden müssen, die bis zu 1000fach größer sind als solche, die zu einer cAMP-Antwort (241, 242) oder zum

Wachstum der Zellen führen (243). In einem Mausmodell, in dem die IP₃-vermittelte Signalgebung des Tshr ausgeschaltet ist, wurde außerdem gezeigt, dass dieser Signalweg für die TSH-vermittelte Iodidaufnahme in murinen Thyreozyten verzichtbar ist (244). Dass die Modulation der IP₃-Formation in PCCL3 nicht in die Vermittlung der 3-T₁AM-Effekte wie verminderter Nis-Funktion und Glucoseaufnahme involviert ist, wird durch die fehlende Modulation der IP₃-Konzentration durch 3-T₁AM bestätigt (3.2.7). Dieser Signalweg wurde daher als Mechanismus zur Vermittlung der thyroidalen 3-T₁AM-Wirkung nicht weiter verfolgt.

4.5.2 Keine Hinweise auf 3-T₁AM-abhängige Modulation der cAMP-Bildung in PCCL3

Die Modulation der intrazellulären cAMP-Konzentration schien aus zwei Gründen ein vielversprechender Kandidat zur Vermittlung der 3-T₁AM Wirkung in PCCL3 zu sein. Zum einen können physiologische Funktionen von PCCL3 Zellen potenziell TSH-abhängig über cAMP gesteuert werden (Abb. 27 A), zum anderen wurde die 3-T₁AM-abhängige Modulation von intrazellulärem cAMP bereits mehrfach für andere Zelltypen beschrieben (119, 149). Mehrere Rezeptorkandidaten wurden in diesem Zusammenhang identifiziert – unter ihnen der Taar1 (145) und der Adra2a sowie β -adrenerge Rezeptoren (128, 150). Dass nach 3-T₁AM-Stimulation in PCCL3 Zellen keine veränderte intrazelluläre cAMP-Konzentration detektiert wurde, spricht allerdings gegen eine Beteiligung von cAMP in der Vermittlung der thyroidalen 3-T₁AM-Wirkungen (Abb. 27 B-D). Die Aktivierung unterschiedlicher 3-T₁AM-Rezeptoren führt zur Veränderung des cAMP-Signals in gegensätzliche Richtung und könnte bei zeitgleicher Aktivierung verschiedener Rezeptoren das Nettosignal nach cAMP-Akkumulation überdecken (Abb. 33). Die ausbleibende Modulation der cAMP-Konzentration nach Stimulation mit etablierten Liganden (Pea, Norepi, Isop) für 3-T₁AM-Rezeptorkandidaten schließt jedoch aus, dass die zeitgleiche Aktivierung von potentiellen 3-T₁AM-Rezeptoren stattgefunden hat (Abb. 28 und 33). Die in der Literatur in anderen Zellsystemen mit zum Teil überexprimierten Rezeptoren beschriebene cAMP-Signalvermittlung von 3-T₁AM via Taar1 sowie an α - und β -adrenergen Rezeptoren scheint in PCCL3 somit keine Rolle zu spielen (145, 149, 150). Fehlende Gi-Signalgebung nach Norepi-Stimulation in diesem experimentellen System lässt sich zum Teil durch fehlende Expression des Adra2a erklären (Abb. 28 E). In Übereinstimmung damit legen Literaturdaten nahe, dass auch im verwandten FRTL-5 Modell (Rattenthreozyten) kein Adra2a exprimiert ist (148). Zwar waren

DISKUSSION

Adra2b und *c*, an denen Norepi ebenso als Agonist ein Gi-Signal bewirkt, auf mRNA-Ebene detektierbar, jedoch in geringen Mengen. Hier ist fraglich, ob die Transkripte zur Expression des funktionalen Proteins führen. Außerdem ist über diese Subtypen des $\alpha 2$ -adrenergen Rezeptors hinsichtlich der 3-T₁AM-Wirkung bisher nichts bekannt. Dass trotz detektierbarer Transkripte von *Adrb1*, *2* und *3* in PCCL3 Zellen kein Isop-stimuliertes Gs-Signal gemessen wurde, könnte auf fehlende Proteinexpression oder fehlende Kopplung der Rezeptoren zur Adenylatzyklase in PCCL3 zurückzuführen sein. So wurde beschrieben, dass die cAMP-Konzentration in FRTL-5 Zellen durch Isop-Stimulation aufgrund fehlender Kopplung des exprimierten β -adrenergen Rezeptors zur Adenylatzyklase ebenfalls nicht verändert wurde (245). Zusammengenommen sprechen die cAMP-Daten dafür, dass 3-T₁AM seine Effekte unabhängig von einer Modulation der TSH-abhängigen cAMP-Bildung vermittelt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es einen Wirkmechanismus auf einen der cAMP-Bildung nachgeschalteten Prozesse ausübt.

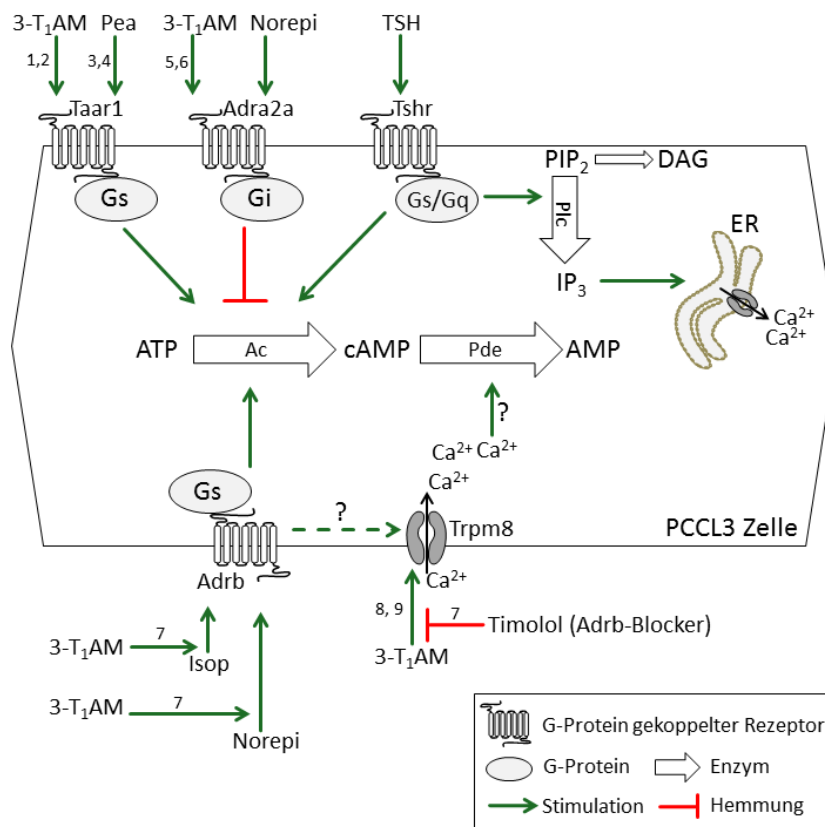


Abbildung 33: Schematische Darstellung der theoretisch möglichen 3-T₁AM- und TSH-abhängigen Modulation der sekundären Botenstoffe cAMP und Ca²⁺ in Thyreozyten.

Dargestellt sind Signalwege, die für 3-T₁AM in verschiedenen Zellmodellen dokumentiert sind und wie diese theoretisch in Thyreozyten ablaufen und mit dem Tshr-Signal interferieren könnten. Vereinfachte Darstellung, die die subzelluläre Lokalisation zum Teil nicht berücksichtigt. Quellen: 1: (119); 2: (145); 3: (147); 4: (146); 5: (128); 6: (149); 7: (150); 8: (153); 9: (154).

In einer Publikation, die diese Theorie unterstützt, wurde gezeigt, dass Catecholamine die TSH-stimulierte Freisetzung von SDH aus der Maus-SD über einen α -adrenergen Rezeptor ohne Modifikation der cAMP-Synthese hemmen (246).

Es wäre daher hilfreich in zukünftigen Experimenten die Proteinexpression der GPCRs selbst zu überprüfen. Dies ist insofern schwierig, als dass keine spezifischen, validen Antikörper erhältlich sind. Eine alleinige Überprüfung der mRNA-Abundanz per qPCR-Analyse ist nicht ohne Vorbehalte aussagekräftig, da diese Rezeptoren prinzipiell niedrig exprimiert sind und mit ihrer Genstruktur aus nur einem Exon ohne Introns die Gefahr der Amplifikation genomischer DNA mit sich bringen.

4.5.3 Mögliche sekundäre Aktivierung der Ampk in PCCL3 Zellen nach 3-T₁AM-Stimulation

Die Ampk ist ein Zielprotein der SDH-Signaltransduktion (101, 102) und auch wie kürzlich beschrieben ein 3-T₁AM-Zielprotein *in vitro* in murinen C2C12 Muskelzellen (130). Weiterhin wurde in Studien der Forschergruppe um Carvalho *et al.* überzeugend demonstriert, dass die Modulation der Ampk-Aktivität in die Regulation der thyroidalen Nis-Expression und -Funktion involviert ist (189, 238). So reduziert die TSH-Mangel-bedingte Ampk-Aktivierung die Nis-Expression in PCCL3 Zellen (189). Gegen eine direkte Vermittlung der 3-T₁AM-Effekte durch Regulation der Ampk in PCCL3 spricht, dass kein schneller und auch nach längerer Inkubation kein konsistenter 3-T₁AM-abhängiger Effekt auf den Ampk-Phosphorylierungsstatus detektiert werden konnte (Abb. 29 A). Dass nach 4 h 3-T₁AM-Inkubation ein Trend zur pAMPK-Erhöhung beobachtet wurde (Abb. 29 B), könnte jedoch bedeuten, dass diese indirekt/sekundär durch 3-T₁AM aktiviert wird. Die 3-T₁AM-abhängig verminderte Glucoseverwertung, die innerhalb einer Stunde nach Stimulation beobachtet wurde, könnte die ATP/AMP Ratio in der Zelle vermindert und somit kompensatorisch zu einer Ampk-Aktivierung geführt haben (247), um die Energiebilanz der Zelle sicherzustellen. Diese Theorie unterstützend wurde eine Erhöhung der Glucoseaufnahme in PCCL3 durch Ampk-Aktivierung bereits 2012 von Andrade *et al.* beschrieben (238).

4.5.4 3-T₁AM-abhängige Erhöhung der cytosolischen freien Ca²⁺-Konzentration in PCCL3

Calcium als wichtiger Regulator der Zellfunktion spielt auch als Regulator des Iodidmetabolismus in Thyreozyten eine Rolle (190, 248, 249). Die Inkubation mit 3-T₁AM führte in mehreren Zelltypen des Auges zu einem TRPM8-vermittelten Anstieg der

DISKUSSION

intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration (153, 154). Calcium *imaging* Daten sprechen dafür, dass eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration auch in PCCL3 zum 3-T₁AM-Signalnetzwerk gehört (Abb. 30). Die BCTC-Sensitivität des Ca^{2+} -Signals legt eine Beteiligung des Trpv1 oder des Trpm8 nahe, da BCTC als Inhibitor an beiden Kanälen wirkt (250, 251). Über die Expression von TRP-Kanälen in Thyreozyten ist wenig bekannt. Lediglich die Expression des Trpc2 und dessen Involvierung in die Physiologie von FRTL5 Zellen wurde bisher beschrieben (190). In PCCL3 Zellen wurden neben *Trpc2*-Transkripten auch geringe Mengen an *Trpm8*-sowie *Trpv1*-mRNA detektiert (Abb. 30). Der Nachweis beider Proteine muss jedoch in weiterführenden Studien noch erfolgen. Moderates Kühlen der Zellen in einem Bereich, der Trpm8 aktiviert, führte ebenso zu einem Anstieg des Ca^{2+} -Signals in PCCL3 (Daten von Stefan Mergler) und unterstützt damit die Annahme einer funktionellen Trpm8-Expression in diesen Zellen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die 3-T₁AM-abhängige TRPM8-Aktivierung in humanen Konjunktivaepithelzellen und Corneaepithelzellen die Aktivierung des TRPV1 supprimiert (153, 154). Zusammengenommen lassen diese Daten spekulieren, dass das 3-T₁AM-induzierte Calcium-Signal in PCCL3 eher durch Trpm8 als durch Trpv1 vermittelt wird. Der formale Nachweis muss in zukünftigen Experimenten unter Verwendung spezifischer Blocker wie AMTB (N-(3-Aminopropyl)-2-[(3-Methylphenyl)methoxy]-N-(2-Thienylmethyl)-Benzamid-Hydrochlorid) allerdings noch erbracht werden (154)

Über die SDH-Homöostase in Trpm8-defizienten Mäusen sind bisher keine Daten publiziert (252, 253). Einzig nach 7-monatiger Behandlung von Mäusen mit dem Trpm8-Agonisten Menthol sind unveränderte SDH-Konzentrationen dokumentiert (254). Da Menthol auch andere Strukturen als Trpm8 aktiviert, können hier allerdings keine direkten Schlüsse über die physiologische Relevanz von Trpm8-Aktivierung in der SDH-Homöostase gezogen werden.

Eine direkte Modifikation der cAMP-Synthese durch 3-T₁AM in PCCL3 Zellen wurde ausgeschlossen, jedoch könnte das hier beschriebene Ca^{2+} -Signal die cAMP-Konzentration über den Abbau des sekundären Botenstoffs verändern. Eine Gruppe von Phosphodiesterasen (Pde), die in der Zelle cAMP zu AMP hydrolysieren, wurde als Calciumsensitiv beschrieben (255, 256). Würde eine Ca^{2+} -vermittelte Aktivierung von Pde durch 3-T₁AM stattfinden, könnte dies die TSH-abhängig erhöhte cAMP-Konzentration senken und so die Signalgebung unterbrechen oder vermindern (Abb. 32). Dieser Mechanismus könnte durch den in der Doktorarbeit verwendeten cAMP-Assay nicht aufgedeckt werden, da hier

ein akkumuliertes cAMP-Signal unter IBMX-abhängiger Pde-Inhibition gemessen wurde. Eine *online*-Messung, bei der die cAMP-Konzentration in Echtzeit verfolgt wird, könnte hier in zukünftigen Versuchen Aufschluss geben.

Ein weiteres Ziel der Ca²⁺-Signaltransduktion ist die Aktivierung der Proteinkinase C (Pkc). Pkc-Aktivität kann den Iodidmetabolismus in Thyreozyten hemmen (257, 258). So vermindert die Inkubation primärer humaner SD-Follikelzellen mit dem Pkc-Aktivatoren PMA/TPA deren Iodidaufnahmerate. Dieser Effekt ist durch die Pkc-Inhibitoren LY379196 und Bis 1 hemmbar (258). Generell besteht eine komplexe Überlappung von Calcium und cAMP-Signalgebung in Thyreozyten (257, 259), was die Modulation des Calciumsignals als vielversprechenden Mechanismus erscheinen lässt, der der 3-T₁AM-Wirkung in Thyreozyten zugrunde liegen könnte (Abb. 32).

Da 3-T₁AM in PCCL3 Zellen aufgenommen wird und in anderen Zellsystemen intrazelluläre Zielstrukturen/Bindestellen identifiziert wurden (156, 157), muss in weiterführenden Studien beachtet werden, dass neben membranständigen auch intrazelluläre Kanäle und Rezeptoren durch 3-T₁AM aktiviert werden könnten.

4.6 Funktionelle *in vitro* SD-Follikel aus murinen ESC als experimentelles System

Im intakten Organismus, in dem Thyreozyten als Follikel organisiert sind, untersteht die SDH-Synthese komplexer Regulation. In der Zellkultur können Thyreozytenzelllinien wie PCCL3 im isolierten System herausgelöst aus der HPT-Achse untersucht werden. Hier wachsen die Zellen jedoch in Form von *Monolayern* und sind daher nicht befähigt SDH zu synthetisieren. Antonica *et al.* publizierten 2012 eine Methode, mit der aus murinen embryonalen Stammzellen mittels temporärer Überexpression der SD-spezifischen Transkriptionsfaktorkombination von Nkx2-1 und Pax8 funktionelle SD-Follikel *in vitro* generiert werden können (172). Mit diesem Modell könnte die direkte Wirkung von 3-T₁AM auf die SDH-Biosynthese ohne Interferenz der HPT-Achsenregulation analysiert werden. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das Modell am IEE etabliert und zunächst auf SDH-Synthesekapazität untersucht. Die stärkere Detektion von T₄ in Überständen differenzierter Zellen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen in Kombination mit der Induktion von SDH-Synthesegenen sowie Follikelbildung mit Nis- und Tg-Expression (Abb. 31) deutet auf vorhandene SDH-Biosyntheseaktivität der Zellen hin. Trotz der 48 h FCS-Depletion am Ende des 23 d Protokolls war auch in den Überständen undifferenzierter Zellen T₄ nachweisbar. Daher

könnte auch verminderte Aufnahme von verbliebenem, dem FCS-entstammenden T_4 aus dem Medium der Grund für vermehrte T_4 -Detektion im Überstand differenzierter Follikel sein. Deshalb soll zukünftig die T_4 -Konzentration in Zelllysaten gemessen und die Responsivität der T_4 -Synthese auf Thyreostatika untersucht werden. Aufgrund der komplexen Matrix (Thyreoglobulin, Matrigel) muss die Methode der Extraktion für die LC-MS/MS am IEE zunächst noch validiert werden. Das Stammzell-Modell ist zur Untersuchung von thyroidalen 3- T_1 AM-Wirkungen offensichtlich geeignet, da nach wiederholter 3- T_1 AM-Behandlung die Regulation von Genen beobachtet wurde, die zum Teil auch im Tierversuch nach wiederholter 3- T_1 AM-Behandlung verändert waren (Abb. 31 E).

4.7 Physiologische Relevanz und Ausblick

SD-Erkrankungen inklusive Knoten und Hypothyreose zählen zu den häufigsten Krankheitsbildern und T_4 ist eines der am häufigsten verschriebenen Präparate in Deutschland und den USA (4, 260, 261). Die Erforschung von Mechanismen und Markern der Entstehung von SD-Dysfunktion ist demnach aktuell und hochrelevant. 3- T_1 AM ist endogen nachweisbar und kann durch Metabolismus des klassischen SDH T_4 entstehen (93, 108). Basierend auf bisher publizierten Daten könnte 3- T_1 AM im Organismus die Manifestation von SDH-Wirkungen modulieren und dadurch regulieren. Dabei sind partiell antagonistische Wirkungen denkbar, aber ebenso besteht die Möglichkeit, dass 3- T_1 AM einen Teil der SDH-Wirkungen selbst vermittelt (5). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnen Daten fügen diesem komplexen Bild die weitere Option hinzu, dass 3- T_1 AM zur Regulation der SDH-Biosynthese beiträgt. Über die Assoziation von 3- T_1 AM zu anderen SD-Parametern in Menschen existieren je nach Gesundheitszustand der Probanden unterschiedliche Befunde. So wurden Korrelationen der zirkulierenden 3- T_1 AM-Konzentration mit T_4 und T_3 (132, 262) in zwei Studien gefunden, in einer anderen Studie wurde trotz erhöhter 3- T_1 AM-Konzentration in T_4 -behandelten Patienten jedoch keine direkte Korrelation festgestellt (121). Zusammengenommen hat 3- T_1 AM das Potenzial eines wichtigen Faktors in der SDH-Homöostase. Diese Erkenntnisse könnten besonders in der Krankheitssituation an Bedeutung gewinnen (262). Die zirkulierende 3- T_1 AM-Konzentration in thyroidektomierten Patienten unter T_4 -Behandlung ist signifikant höher als in gesunden euthyreoten Menschen (121). Dies könnte vor dem Hintergrund der beschriebenen Wirkungen des 3- T_1 AM eine Verbindung zu den 10-15% der Patienten herstellen, die sich trotz adäquatem TSH unter T_4 -

Supplementierung nicht wohlfühlen (66). Die Prävalenz dieser Patienten zusammen mit der zunehmenden Erkenntnis über die Wirkungen von SDH-Metaboliten wie 3-T₁AM legt nahe, dass weitere Faktoren über T₄ und TSH hinaus gemessen und eventuell adjustiert werden müssen, um den SDH-Status von Patienten detaillierter zu erfassen und zu verbessern.

Bevor die in dieser Doktorarbeit gewonnen Erkenntnisse über die Wirkung von Thyronaminen in Nagern letztendlich dazu beitragen, das Verständnis der Rolle dieser SDH-Metaboliten in der Regulation der humanen SDH-Homöostase zu verbessern, müssen deren Wirkungen und Wirkmechanismen jedoch vollständig geklärt werden. Dazu sind weitere Studien nötig. So zum Beispiel könnte die längere Exposition von Mäusen mit 3-T₁AM durchgeführt werden um zu überprüfen, ob sich die thyroideale Genregulation zu einem späteren Zeitpunkt tatsächlich in den Serum-SDH-Konzentrationen manifestiert. In einem solchen Versuch könnten idealerweise Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden, um die Suppression der HPT-Achse zeitlich zu verfolgen und den Zeitpunkt einer potenziellen Kompensation abzuspannen. Eine parallele Iodid-Bestimmung im Urin kann Aufschluss geben wie hoch die Iodidbelastung der Tiere ist (263). Zur Vermeidung von Toxizität müsste die Dosis für eine längerfristige Tierstudie jedoch angepasst werden. Weiterhin könnten Studien mit markiertem 3-T₁AM Aufschluss darüber geben, wie die Substanz bei wiederholter Behandlung im Organismus verteilt und metabolisiert wird um abzuschätzen, wie Bindung an Proteine im Serum, Aufnahme in Organe, eventuelle Akkumulation und Eliminierung die zirkulierende Menge des SDH-Metaboliten beeinflussen (193). Die beschriebenen Versuche sind jedoch mit einer hohen Anzahl an Versuchstieren verbunden. Zur Vermeidung von übermäßig vielen Tierversuchen können alternative Modelle *in vitro* verwendet werden. Mehrere Forschergruppen haben beschrieben, wie *in vitro* funktionelle SD-Follikel aus murinen embryonalen bzw. humanen induzierten Stammzellen generiert werden können (172, 264). Mit einem solchen Modell könnte die direkte Wirkung von 3-T₁AM auf die SD-Funktion *in vitro* ohne Interferenz der HPT-Achse analysiert werden. Die direkte Vermessung der produzierten SDH (z.B. mittels LC-MS/MS) gäbe direkten Aufschluss über die funktionelle Relevanz. Das von Antonica F. *et al.* publizierte Modell wurde im Rahmen der Doktorarbeit am IEE etabliert und kann in Zukunft für die beschriebenen Analysen verwendet werden. Zur Klärung des Mechanismus der thyroidalen 3-T₁AM-Wirkungen könnte den hier gewonnen Erkenntnissen über eine mögliche Beteiligung des *Trpm8* nachgegangen werden. *Trpm8*-null Mäuse existieren und

DISKUSSION

könnten mit 3-T₁AM behandelt werden. Zuvor sollten *in vitro* Studien mit Trpm8-Agonisten und -Inhibitoren durchgeführt werden, um dessen Rolle im Thyreozyten zu belegen. Zusätzlich sollte die intrazelluläre Signaltransduktion der 3-T₁AM-Metaboliten – besonders des T₀AM – überprüft werden, um das Verständnis des Wirkmechanismus von 3-T₁AM zu erweitern.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Wassner AJ, Brown RS 2015 Congenital hypothyroidism: recent advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **22**:407-412.
2. Mullur R, Liu YY, Brent GA 2014 Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev* **94**:355-382.
3. Williams GR 2013 Thyroid hormone actions in cartilage and bone. *Eur Thyroid J* **2**:3-13.
4. Führer D, Brix K, Biebermann H 2015 Understanding the Healthy Thyroid State in 2015. *Eur Thyroid J* **4**:1-8.
5. Hoefig CS, Zucchi R, Kohrle J 2016 Thyronamines and Derivatives: Physiological Relevance, Pharmacological Actions, and Future Research Directions. *Thyroid* **26**:1656-1673.
6. Dumont J, Opitz r, Christophe D, Vassart G, Roger PP, Maenhaut C 2000 Ontogeny, Anatomy, Metabolism and Physiology of the Thyroid. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, (eds) *Endotext*. Vol., South Dartmouth (MA).
7. Vassart G 1972 Specific synthesis of thyroglobulin on membrane bound thyroid ribosomes. *FEBS Lett* **22**:53-56.
8. Franc JL, Hovsepian S, Fayet G, Bouchilloux S 1986 Inhibition of N-linked oligosaccharide processing does not prevent the secretion of thyroglobulin. A study with swainsonine and deoxynojirimycin. *Eur J Biochem* **157**:225-232.
9. Chambard M, Mauchamp J, Chabaud O 1987 Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: modulation by thyrotropin. *J Cell Physiol* **133**:37-45.
10. Foster GV 1968 Calcitonin. A review of experimental and clinical investigations. *Postgrad Med J* **44**:411-422.
11. Dai G, Levy O, Carrasco N 1996 Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* **379**:458-460.
12. Bagchi N, Fawcett DM 1973 Role of sodium ion in active transport of iodide by cultured thyroid cells. *Biochim Biophys Acta* **318**:235-251.
13. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED 2000 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* **141**:839-845.
14. Sheffield VC, Kraiem Z, Beck JC, Nishimura D, Stone EM, Salameh M, Sadeh O, Glaser B 1996 Pendred syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by an intrinsic defect in thyroid iodine organification. *Nat Genet* **12**:424-426.
15. Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED 1997 Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* **17**:411-422.
16. Calebiro D, Porazzi P, Bonomi M, Lisi S, Grindati A, De Nittis D, Fugazzola L, Marino M, Botta G, Persani L 2011 Absence of primary hypothyroidism and goiter in *Slc26a4* (-/-) mice fed on a low iodine diet. *J Endocrinol Invest* **34**:593-598.
17. Twyffels L, Strickaert A, Virreira M, Massart C, Van Sande J, Wauquier C, Beauwens R, Dumont JE, Galiotta LJ, Boom A, Kruys V 2014 Anoctamin-1/TMEM16A is the major apical iodide channel of the thyrocyte. *Am J Physiol Cell Physiol* **307**:C1102-1112.
18. Viitanen TM, Sukumaran P, Lof C, Tornquist K 2013 Functional coupling of TRPC2 cation channels and the calcium-activated anion channels in rat thyroid cells: implications for iodide homeostasis. *J Cell Physiol* **228**:814-823.
19. Iosco C, Cosentino C, Sirna L, Romano R, Cursano S, Mongia A, Pompeo G, di Bernardo J, Ceccarelli C, Tallini G, Rhoden KJ 2014 Anoctamin 1 is apically expressed on thyroid follicular cells and contributes to ATP- and calcium-activated iodide efflux. *Cell Physiol Biochem* **34**:966-980.

20. Taurog A 1996 Hormone synthesis: thyroid hormone metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, (eds) *The thyroid—a fundamental and clinical text*. Vol. Lippincott-Raven, Philadelphia, 47-81.
21. De Deken X, Wang D, Dumont JE, Miot F 2002 Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res* **273**:187-196.
22. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A 1999 Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J Biol Chem* **274**:37265-37269.
23. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ristalpers C 2002 Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* **347**:95-102.
24. Sugawara M 1985 Coupling of iodotyrosine catalyzed by human thyroid peroxidase in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **60**:1069-1075.
25. Ruf J, Carayon P 2006 Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **445**:269-277.
26. Brix K, Lemansky P, Herzog V 1996 Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* **137**:1963-1974.
27. Friedrichs B, Tepel C, Reinheckel T, Deussing J, von Figura K, Herzog V, Peters C, Saftig P, Brix K 2003 Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest* **111**:1733-1745.
28. Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S 2010 Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest* **120**:3377-3388.
29. Pilo A, Iervasi G, Vitek F, Ferdeghini M, Cazzuola F, Bianchi R 1990 Thyroidal and peripheral production of 3,5,3'-triiodothyronine in humans by multicompartmental analysis. *Am J Physiol* **258**:E715-726.
30. Larsen PR 1975 Thyroidal triiodothyronine and thyroxine in Graves' disease: correlation with presurgical treatment, thyroid status, and iodine content. *J Clin Endocrinol Metab* **41**:1098-1104.
31. Kohrle J 1999 Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* **151**:103-119.
32. Pierce JG, Liao T, Howard SM, Shome B, Cornell JS 1971 Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone. *Recent Prog Horm Res* **27**:165-212.
33. Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE 1987 Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* **52**:273-278.
34. Van Sande J, Raspe E, Perret J, Lejeune C, Maenhaut C, Vassart G, Dumont JE 1990 Thyrotropin activates both the cyclic AMP and the PIP₂ cascades in CHO cells expressing the human cDNA of TSH receptor. *Mol Cell Endocrinol* **74**:R1-6.
35. Yan K, Gao LN, Cui YL, Zhang Y, Zhou X 2016 The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Mol Med Rep* **13**:3715-3723.
36. Litosch I 2016 Decoding Galphaq signaling. *Life Sci* **152**:99-106.
37. Lechan RM, Jackson IM 1982 Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* **111**:55-65.
38. Simmons DM, Swanson LW 2009 Comparison of the spatial distribution of seven types of neuroendocrine neurons in the rat paraventricular nucleus: toward a global 3D model. *J Comp Neurol* **516**:423-441.
39. Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, Kordon C 1979 Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* **104**:801-806.
40. Rabeler R, Mittag J, Geffers L, Ruther U, Leitges M, Parlow AF, Visser TJ, Bauer K 2004 Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism. *Mol Endocrinol* **18**:1450-1460.

41. Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE 1995 The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* **9**:540-550.
42. Sugrue ML, Vella KR, Morales C, Lopez ME, Hollenberg AN 2010 The thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone at the level of transcription in vivo. *Endocrinology* **151**:793-801.
43. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE 2001 Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest* **107**:1017-1023.
44. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM 1987 Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* **238**:78-80.
45. Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA 2006 Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* **147**:2705-2716.
46. Yamada M, Monden T, Satoh T, Iizuka M, Murakami M, Iriuchijima T, Mori M 1992 Differential regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA levels by thyroid hormone in vivo and in vitro (GH3 cells). *Biochem Biophys Res Commun* **184**:367-372.
47. Heuer H, Schafer MK, Bauer K 1998 The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: the third element of the thyrotropin-releasing hormone-signaling system. *Thyroid* **8**:915-920.
48. Heuer H, Ehrchen J, Bauer K, Schafer MK 1998 Region-specific expression of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur J Neurosci* **10**:1465-1478.
49. Marsili A, Sanchez E, Singru P, Harney JW, Zavacki AM, Lechan RM, Larsen PR 2011 Thyroxine-induced expression of pyroglutamyl peptidase II and inhibition of TSH release precedes suppression of TRH mRNA and requires type 2 deiodinase. *J Endocrinol* **211**:73-78.
50. Hinkle PM, Gehret AU, Jones BW 2012 Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Front Neurosci* **6**:180.
51. Narayanan CS, Fujimoto J, Geras-Raaka E, Gershengorn MC 1992 Regulation by thyrotropin-releasing hormone (TRH) of TRH receptor mRNA degradation in rat pituitary GH3 cells. *J Biol Chem* **267**:17296-17303.
52. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM 1997 Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **138**:2569-2576.
53. Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL 1991 Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* **129**:2714-2718.
54. Zoeller RT, Kabeer N, Albers HE 1990 Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology* **127**:2955-2962.
55. Rondeel JM, de Greef WJ, Hop WC, Rowland DL, Visser TJ 1991 Effect of cold exposure on the hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines. *Neuroendocrinology* **54**:477-481.
56. Weintraub BD, Gesundheit N, Taylor T, Gyves PW 1989 Effect of TRH on TSH glycosylation and biological action. *Ann N Y Acad Sci* **553**:205-213.
57. Shupnik MA, Greenspan SL, Ridgway EC 1986 Transcriptional regulation of thyrotropin subunit genes by thyrotropin-releasing hormone and dopamine in pituitary cell culture. *J Biol Chem* **261**:12675-12679.
58. Taylor T, Weintraub BD 1985 Thyrotropin (TSH)-releasing hormone regulation of TSH subunit biosynthesis and glycosylation in normal and hypothyroid rat pituitaries. *Endocrinology* **116**:1968-1976.

59. Chiamolera MI, Sidhaye AR, Matsumoto S, He Q, Hashimoto K, Ortega-Carvalho TM, Wondisford FE 2012 Fundamentally distinct roles of thyroid hormone receptor isoforms in a thyrotroph cell line are due to differential DNA binding. *Mol Endocrinol* **26**:926-939.
60. Shibusawa N, Hollenberg AN, Wondisford FE 2003 Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J Biol Chem* **278**:732-738.
61. Samuels MH, Veldhuis J, Ridgway EC 1995 Copulsatile release of thyrotropin and prolactin in normal and hypothyroid subjects. *Thyroid* **5**:369-372.
62. Weeke J 1973 Circadian variation of the serum thyrotropin level in normal subjects. *Scand J Clin Lab Invest* **31**:337-342.
63. Behrends J, Prank K, Dogu E, Brabant G 1998 Central nervous system control of thyrotropin secretion during sleep and wakefulness. *Horm Res* **49**:173-177.
64. Schussler GC 2000 The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* **10**:141-149.
65. Barth JH, Spencer JD, Goodall SR, Luvai A 2016 Reference intervals for thyroid hormones on Advia Centaur derived from three reference populations and a review of the literature. *Ann Clin Biochem* **53**:385-389.
66. Massolt ET, van der Windt M, Korevaar TI, Kam BL, Burger JW, Franssen GJ, Lehmpful I, Kohrle J, Visser WE, Peeters RP 2016 Thyroid hormone and its metabolites in relation to quality of life in patients treated for differentiated thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* **85**:781-788.
67. Lee RH, Spencer CA, Mestman JH, Miller EA, Petrovic I, Braverman LE, Goodwin TM 2009 Free T4 immunoassays are flawed during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **200**:260 e261-266.
68. Park SY, Park SE, Jung SW, Jin HS, Park IB, Ahn SV, Lee S 2017 Free Triiodothyronine/Free Thyroxine Ratio rather than Thyrotropin is more associated with Metabolic Parameters in Healthy Euthyroid Adult Subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*.
69. Samuels MH, Kolobova I, Smeraglio A, Niederhausen M, Janowsky JS, Schuff KG 2016 Effect of Thyroid Function Variations Within the Laboratory Reference Range on Health Status, Mood, and Cognition in Levothyroxine-Treated Subjects. *Thyroid* **26**:1173-1184.
70. Zimmermann MB, Boelaert K 2015 Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol* **3**:286-295.
71. Wolff J, Chaikoff IL 1948 Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem* **174**:555-564.
72. Wolff J, Chaikoff IL, et al. 1949 The temporary nature of the inhibitory action of excess iodine on organic iodine synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology* **45**:504-513, illust.
73. Stanley MM 1949 The direct estimation of the rate of thyroid hormone formation in man; the effect of the iodide ion on thyroid iodine utilization. *J Clin Endocrinol Metab* **9**:941-954.
74. Philippou G, Koutras DA, Piperinos G, Souvatzoglou A, Mouloupoulos SD 1992 The effect of iodide on serum thyroid hormone levels in normal persons, in hyperthyroid patients, and in hypothyroid patients on thyroxine replacement. *Clin Endocrinol (Oxf)* **36**:573-578.
75. Jubiz W, Carlile S, Lagerquist LD 1977 Serum thyrotropin and thyroid hormone levels in humans receiving chronic potassium iodide. *J Clin Endocrinol Metab* **44**:379-382.
76. Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE 1999 Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* **140**:3404-3410.
77. Braverman LE, Ingbar SH 1963 Changes in Thyroidal Function during Adaptation to Large Doses of Iodide. *J Clin Invest* **42**:1216-1231.
78. Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA 2005 Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep* **25**:191-208.
79. Park EA, Song S, Vinson C, Roesler WJ 1999 Role of CCAAT enhancer-binding protein beta in the thyroid hormone and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem* **274**:211-217.

80. Klieverik LP, Sauerwein HP, Ackermans MT, Boelen A, Kalsbeek A, Fliers E 2008 Effects of thyrotoxicosis and selective hepatic autonomic denervation on hepatic glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**:E513-520.
81. Sinha RA, Singh BK, Yen PM 2014 Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **25**:538-545.
82. Lopez D, Abisambra Socarras JF, Bedi M, Ness GC 2007 Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* **1771**:1216-1225.
83. Taylor AH, Nakamura T, Wong NC 1997 Towards gene therapy to enhance apolipoprotein AI expression. *Proc West Pharmacol Soc* **40**:127-130.
84. al-Adsani H, Hoffer LJ, Silva JE 1997 Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab* **82**:1118-1125.
85. Clement K, Viguerie N, Diehn M, Alizadeh A, Barbe P, Thalamas C, Storey JD, Brown PO, Barsh GS, Langin D 2002 In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res* **12**:281-291.
86. Everts ME 1996 Effects of thyroid hormones on contractility and cation transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **156**:325-333.
87. Desai-Yajnik V, Zeng J, Omori K, Sherman J, Morimoto T 1995 The effect of thyroid hormone treatment on the gene expression and enzyme activity of rat liver sodium-potassium dependent adenosine triphosphatase. *Endocrinology* **136**:629-639.
88. Jabbar A, Pingitore A, Pearce SH, Zaman A, Iervasi G, Razvi S 2017 Thyroid hormones and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* **14**:39-55.
89. Bernal J 2000 Thyroid Hormones in Brain Development and Function. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, (eds) *Endotext*. Vol., South Dartmouth (MA).
90. Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B 1986 The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324**:635-640.
91. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM 1986 The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* **324**:641-646.
92. Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X 2006 Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* **246**:121-127.
93. Wu Y, Koenig RJ 2000 Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* **11**:207-211.
94. Lazar MA 1993 Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* **14**:184-193.
95. Moran C, Chatterjee K 2015 Resistance to thyroid hormone due to defective thyroid receptor alpha. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **29**:647-657.
96. Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H 2005 Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* **19**:102-112.
97. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S 2006 Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal* **4**:e020.
98. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ 2005 Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* **146**:2864-2871.
99. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ 2009 L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**:C980-991.

100. Ishisaki A, Tokuda H, Yoshida M, Hirade K, Kunieda K, Hatakeyama D, Shibata T, Kozawa O 2004 Activation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol* **214**:189-195.
101. Irrcher I, Walkinshaw DR, Sheehan TE, Hood DA 2008 Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol* (1985) **104**:178-185.
102. Videla LA, Fernandez V, Cornejo P, Vargas R, Morales P, Ceballo J, Fischer A, Escudero N, Escobar O 2014 T(3)-induced liver AMP-activated protein kinase signaling: redox dependency and upregulation of downstream targets. *World J Gastroenterol* **20**:17416-17425.
103. Visser WE, Friesema EC, Visser TJ 2011 Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* **25**:1-14.
104. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ 2003 Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* **278**:40128-40135.
105. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S 2004 A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* **74**:168-175.
106. Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkasmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ 2004 Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* **364**:1435-1437.
107. Wirth EK, Roth S, Blechschmidt C, Holter SM, Becker L, Racz I, Zimmer A, Klopstock T, Gailus-Durner V, Fuchs H, Wurst W, Naumann T, Bräuer A, Hrabě de Angelis M, Köhrle J, Grüters A, Schweizer U 2009 Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J Neurosci* **29**:9439-9449.
108. Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, Raivich G, Bauer K, Heuer H 2007 Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest* **117**:627-635.
109. Ferrara AM, Onigata K, Ercan O, Woodhead H, Weiss RE, Refetoff S 2012 Homozygous thyroid hormone receptor beta-gene mutations in resistance to thyroid hormone: three new cases and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:1328-1336.
110. Köhrle J 1996 Thyroid hormone deiodinases--a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta medica Austriaca* **23**:17-30.
111. Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR 2005 Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* **115**:2524-2533.
112. Dentice M, Salvatore D 2011 Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol* **209**:273-282.
113. Visser TJ, van Buuren JC, Rutgers M, Eelkman Rooda SJ, de Herder WW 1990 The role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **1**:211-218.
114. Leonard JL, Kohrle J 1996 Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, (eds) Werner and Ingbar's *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Vol 7. Lippincott-Raven, Philadelphia, 125-161.
115. Visser TJ 1996 Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med Austriaca* **23**:10-16.
116. Wu SY, Green WL, Huang WS, Hays MT, Chopra IJ 2005 Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* **15**:943-958.
117. Jonas W, Lietzow J, Wohlgemuth F, Hoefig CS, Wiedmer P, Schweizer U, Köhrle J, Schürmann A 2015 3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-t2) exerts thyromimetic effects on hypothalamus-pituitary-thyroid axis, body composition, and energy metabolism in male diet-induced obese mice. *Endocrinology* **156**:389-399.
118. Padron AS, Neto RA, Pantaleao TU, de Souza dos Santos MC, Araujo RL, de Andrade BM, da Silva Leandro M, de Castro JP, Ferreira AC, de Carvalho DP 2014 Administration of 3,5-

- diiodothyronine (3,5-T₂) causes central hypothyroidism and stimulates thyroid-sensitive tissues. *J Endocrinol* **221**:415-427.
119. Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, Frascarelli S, Crossley DA, Bunzow JR, Ronca-Testoni S, Lin ET, Hatton D, Zucchi R, Grandy DK 2004 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med* **10**:638-642.
 120. Braulke LJ, Klingenspor M, DeBarber A, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Heldmaier G 2008 3-Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation. *J Comp Physiol B* **178**:167-177.
 121. Hoefig CS, Köhrle J, Brabant G, Dixit K, Yap B, Strasburger CJ, Wu Z 2011 Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:1864-1872.
 122. Saba A, Chiellini G, Frascarelli S, Marchini M, Ghelardoni S, Raffaelli A, Tonacchera M, Vitti P, Scanlan TS, Zucchi R 2010 Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology* **151**:5063-5073.
 123. Roy G, Placzek E, Scanlan TS 2012 ApoB-100-containing lipoproteins are major carriers of 3-iodothyronamine in circulation. *J Biol Chem* **287**:1790-1800.
 124. Doyle KP, Suchland KL, Ciesielski TM, Lessov NS, Grandy DK, Scanlan TS, Stenzel-Poore MP 2007 Novel thyroxine derivatives, thyronamine and 3-iodothyronamine, induce transient hypothermia and marked neuroprotection against stroke injury. *Stroke* **38**:2569-2576.
 125. Klieverik LP, Foppen E, Ackermans MT, Serlie MJ, Sauerwein HP, Scanlan TS, Grandy DK, Fliers E, Kalsbeek A 2009 Central effects of thyronamines on glucose metabolism in rats. *J Endocrinol* **201**:377-386.
 126. Haviland JA, Reiland H, Butz DE, Tonelli M, Porter WP, Zucchi R, Scanlan TS, Chiellini G, Assadi-Porter FM 2013 NMR-based metabolomics and breath studies show lipid and protein catabolism during low dose chronic T(1)AM treatment. *Obesity (Silver Spring)* **21**:2538-2544.
 127. Mariotti V, Melissari E, Iofrida C, Righi M, Di Russo M, Donzelli R, Saba A, Frascarelli S, Chiellini G, Zucchi R, Pellegrini S 2014 Modulation of gene expression by 3-iodothyronamine: genetic evidence for a lipolytic pattern. *PLoS One* **9**:e106923.
 128. Regard JB, Kataoka H, Cano DA, Camerer E, Yin L, Zheng YW, Scanlan TS, Hebrok M, Coughlin SR 2007 Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *J Clin Invest* **117**:4034-4043.
 129. Manni ME, De Siena G, Saba A, Marchini M, Dicembrini I, Bigagli E, Cinci L, Lodovici M, Chiellini G, Zucchi R, Raimondi L 2012 3-Iodothyronamine: a modulator of the hypothalamus-pancreas-thyroid axes in mice. *Br J Pharmacol* **166**:650-658.
 130. Ju H, Shin H, Son C, Park K, Choi I 2015 3-Iodothyronamine-mediated metabolic suppression increases the phosphorylation of AMPK and induces fuel choice toward lipid mobilization. *Horm Metab Res* **47**:605-610.
 131. Manni ME, De Siena G, Saba A, Marchini M, Landucci E, Gerace E, Zazzeri M, Musilli C, Pellegrini-Giampietro D, Matucci R, Zucchi R, Raimondi L 2013 Pharmacological effects of 3-iodothyronamine (T1AM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold. *Br J Pharmacol* **168**:354-362.
 132. Galli E, Marchini M, Saba A, Berti S, Tonacchera M, Vitti P, Scanlan TS, Iervasi G, Zucchi R 2012 Detection of 3-iodothyronamine in human patients: a preliminary study. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:E69-74.
 133. James TD, Moffett SX, Scanlan TS, Martin JV 2013 Effects of acute microinjections of the thyroid hormone derivative 3-iodothyronamine to the preoptic region of adult male rats on sleep, thermoregulation and motor activity. *Horm Behav* **64**:81-88.
 134. Laurino A, De Siena G, Saba A, Chiellini G, Landucci E, Zucchi R, Raimondi L 2015 In the brain of mice, 3-iodothyronamine (T1AM) is converted into 3-iodothyroacetic acid (TA1) and it is included within the signaling network connecting thyroid hormone metabolites with histamine. *Eur J Pharmacol* **761**:130-134.

135. Pons R, Ford B, Chiriboga CA, Clayton PT, Hinton V, Hyland K, Sharma R, De Vivo DC 2004 Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis. *Neurology* **62**:1058-1065.
136. Hoefig CS, Renko K, Piehl S, Scanlan TS, Bertoldi M, Opladen T, Hoffmann GF, Klein J, Blankenstein O, Schweizer U, Köhrle J 2012 Does the aromatic L-amino acid decarboxylase contribute to thyronamine biosynthesis? *Mol Cell Endocrinol* **349**:195-201.
137. Hoefig CS, Wuensch T, Rijntjes E, Lehmpful I, Daniel H, Schweizer U, Mittag J, Köhrle J 2015 Biosynthesis of 3-Iodothyronamine From T4 in Murine Intestinal Tissue. *Endocrinology* **156**:4356-4364.
138. Piehl S, Heberer T, Balizs G, Scanlan TS, Smits R, Koksich B, Köhrle J 2008 Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* **149**:3037-3045.
139. Hackenmueller SA, Marchini M, Saba A, Zucchi R, Scanlan TS 2012 Biosynthesis of 3-iodothyronamine (T1AM) is dependent on the sodium-iodide symporter and thyroperoxidase but does not involve extrathyroidal metabolism of T4. *Endocrinology* **153**:5659-5667.
140. Agretti P, De Marco G, Russo L, Saba A, Raffaelli A, Marchini M, Chiellini G, Grasso L, Pinchera A, Vitti P, Scanlan TS, Zucchi R, Tonacchera M 2011 3-Iodothyronamine metabolism and functional effects in FRTL5 thyroid cells. *J Mol Endocrinol* **47**:23-32.
141. Ghelardoni S, Chiellini G, Frascarelli S, Saba A, Zucchi R 2014 Uptake and metabolic effects of 3-iodothyronamine in hepatocytes. *J Endocrinol* **221**:101-110.
142. Ianculescu AG, Giacomini KM, Scanlan TS 2009 Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport. *Endocrinology* **150**:1991-1999.
143. Ianculescu AG, Friesema EC, Visser TJ, Giacomini KM, Scanlan TS 2010 Transport of thyroid hormones is selectively inhibited by 3-iodothyronamine. *Molecular bioSystems* **6**:1403-1410.
144. Kinne A, Kleinau G, Hoefig CS, Grüters A, Köhrle J, Krause G, Schweizer U 2010 Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J Biol Chem* **285**:28054-28063.
145. Coster M, Biebermann H, Schoneberg T, Staubert C 2015 Evolutionary Conservation of 3-Iodothyronamine as an Agonist at the Trace Amine-Associated Receptor 1. *Eur Thyroid J* **4**:9-20.
146. Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhani PP, Bonini JA, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek TA, Gerald C 2001 Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:8966-8971.
147. Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI, Darland T, Suchland KL, Pasumamula S, Kennedy JL, Olson SB, Magenis RE, Amara SG, Grandy DK 2001 Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol* **60**:1181-1188.
148. Wainscott DB, Little SP, Yin T, Tu Y, Rocco VP, He JX, Nelson DL 2007 Pharmacologic characterization of the cloned human trace amine-associated receptor1 (TAAR1) and evidence for species differences with the rat TAAR1. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:475-485.
149. Dinter J, Muhlhaus J, Jacobi SF, Wienchol CL, Coster M, Meister J, Hoefig CS, Müller A, Köhrle J, Grüters A, Krude H, Mittag J, Schoneberg T, Kleinau G, Biebermann H 2015 3-iodothyronamine differentially modulates alpha-2A-adrenergic receptor-mediated signaling. *J Mol Endocrinol* **54**:205-216.
150. Dinter J, Khajavi N, Muhlhaus J, Wienchol CL, Coster M, Hermsdorf T, Staubert C, Köhrle J, Schoneberg T, Kleinau G, Mergler S, Biebermann H 2015 The Multitarget Ligand 3-Iodothyronamine Modulates beta-Adrenergic Receptor 2 Signaling. *Eur Thyroid J* **4**:21-29.
151. Dinter J, Muhlhaus J, Wienchol CL, Yi CX, Nurnberg D, Morin S, Grüters A, Köhrle J, Schoneberg T, Tschop M, Krude H, Kleinau G, Biebermann H 2015 Inverse agonistic action of 3-iodothyronamine at the human trace amine-associated receptor 5. *PLoS One* **10**:e0117774.

152. Muhlhaus J, Dinter J, Nurnberg D, Rehders M, Depke M, Golchert J, Homuth G, Yi CX, Morin S, Köhrle J, Brix K, Tschop M, Kleinau G, Biebermann H 2014 Analysis of human TAAR8 and murine Taar8b mediated signaling pathways and expression profile. *Int J Mol Sci* **15**:20638-20655.
153. Khajavi N, Reinach PS, Slavi N, Skrzypski M, Lucius A, Strauss O, Köhrle J, Mergler S 2015 Thyronamine induces TRPM8 channel activation in human conjunctival epithelial cells. *Cell Signal* **27**:315-325.
154. Lucius A, Khajavi N, Reinach PS, Köhrle J, Dhandapani P, Huimann P, Ljubojevic N, Grotzinger C, Mergler S 2015 3-Iodothyronamine increases transient receptor potential melastatin channel 8 (TRPM8) activity in immortalized human corneal epithelial cells. *Cell Signal* **28**:136-147.
155. Laurino A, Matucci R, Vistoli G, Raimondi L 2016 3-iodothyronamine (T1AM), a novel antagonist of muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* **793**:35-42.
156. Cumero S, Fogolari F, Domenis R, Zucchi R, Mavelli I, Contessi S 2012 Mitochondrial F(0) F(1) -ATP synthase is a molecular target of 3-iodothyronamine, an endogenous metabolite of thyroid hormone. *Br J Pharmacol* **166**:2331-2347.
157. Venditti P, Napolitano G, Di Stefano L, Chiellini G, Zucchi R, Scanlan TS, Di Meo S 2011 Effects of the thyroid hormone derivatives 3-iodothyronamine and thyronamine on rat liver oxidative capacity. *Mol Cell Endocrinol* **341**:55-62.
158. Panas HN, Lynch LJ, Vallender EJ, Xie Z, Chen GL, Lynn SK, Scanlan TS, Miller GM 2010 Normal thermoregulatory responses to 3-iodothyronamine, trace amines and amphetamine-like psychostimulants in trace amine associated receptor 1 knockout mice. *J Neurosci Res* **88**:1962-1969.
159. Snead AN, Santos MS, Seal RP, Miyakawa M, Edwards RH, Scanlan TS 2007 Thyronamines inhibit plasma membrane and vesicular monoamine transport. *ACS Chem Biol* **2**:390-398.
160. Pietsch CA, Scanlan TS, Anderson RJ 2007 Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases. *Endocrinology* **148**:1921-1927.
161. Piehl S, Heberer T, Balizs G, Scanlan TS, Köhrle J 2008 Development of a validated liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the distinction of thyronine and thyronamine constitutional isomers and for the identification of new deiodinase substrates. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**:3286-3296.
162. Jouan P, Michel R, Roche J 1956 [Presence of 3, 3', 5-triiodothyroacetic acid and 3, 3'-diiodothyronine in rat muscle after L-3, 3', 5-triiodothyronine administration]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **38**:941-950.
163. Trotter WR 1956 Effect of triiodothyroacetic acid on blood-cholesterol levels. *Lancet* **270**:885-889.
164. Wood WJ, Geraci T, Nilsen A, DeBarber AE, Scanlan TS 2009 Iodothyronamines are oxidatively deaminated to iodothyroacetic acids in vivo. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **10**:361-365.
165. Hackenmueller SA, Scanlan TS 2012 Identification and quantification of 3-iodothyronamine metabolites in mouse serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **1256**:89-97.
166. Musilli C, De Siena G, Manni ME, Logli A, Landucci E, Zucchi R, Saba A, Donzelli R, Passani MB, Provensi G, Raimondi L 2014 Histamine mediates behavioural and metabolic effects of 3-iodothyroacetic acid, an endogenous end product of thyroid hormone metabolism. *Br J Pharmacol* **171**:3476-3484.
167. Hoefig CS, Jacobi SF, Warner A, Harder L, Schanze N, Vennstrom B, Mittag J 2015 3-Iodothyroacetic acid lacks thermoregulatory and cardiovascular effects in vivo. *Br J Pharmacol* **172**:3426-3433.
168. Papillon S-I 2002 Schilddrüsen-Ultraschall-Screening.
169. Wiersinga WM, Duntas L, Fadeyev V, Nygaard B, Vanderpump MP 2012 2012 ETA Guidelines: The Use of L-T4 + L-T3 in the Treatment of Hypothyroidism. *Eur Thyroid J* **1**:55-71.

170. Szumska J, Qatato M, Rehders M, Fuhrer D, Biebermann H, Grandy DK, Kohrle J, Brix K 2015 Trace Amine-Associated Receptor 1 Localization at the Apical Plasma Membrane Domain of Fisher Rat Thyroid Epithelial Cells Is Confined to Cilia. *Eur Thyroid J* **4**:30-41.
171. Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Grieco M, Portella G, Santoro M, Vecchio G 1985 Epithelial transformation by newly isolated murine retroviruses. From oncogenes to tumor antigens Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam:17-23.
172. Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao XH, Dumitrescu AM, Refetoff S, Peremans K, Manto M, Kyba M, Costagliola S 2012 Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* **491**:66-71.
173. Rathmann D, Rijntjes E, Lietzow J, Köhrle J 2015 Quantitative Analysis of Thyroid Hormone Metabolites in Cell Culture Samples Using LC-MS/MS. *Eur Thyroid J* **4**:51-58.
174. Nicholls DG, Darley-Usmar VM, Wu M, Jensen PB, Rogers GW, Ferrick DA 2010 Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *J Vis Exp*.
175. Wang R, Novick SJ, Mangum JB, Queen K, Ferrick DA, Rogers GW, Stimmel JB 2015 The acute extracellular flux (XF) assay to assess compound effects on mitochondrial function. *J Biomol Screen* **20**:422-429.
176. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J 2007 qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**:R19.
177. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
178. Waltz F, Pillette L, Ambroise Y 2010 A nonradioactive iodide uptake assay for sodium iodide symporter function. *Anal Biochem* **396**:91-95.
179. Sandell EB, Kolthoff IM 1937 Micro determination of iodine by a catalytic method. *Microchimica Acta* **1**:9-25.
180. Renko K, Hoefig CS, Hiller F, Schomburg L, Köhrle J 2012 Identification of iopanoic acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay. *Endocrinology* **153**:2506-2513.
181. Weber J, Rehders M, Saftig P, Verrey F, Schweizer U, Wirth EK, Heuer H, Brix K 2015 Functional analysis of the angio-follicular unit of the mouse thyroid gland. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **123**.
182. Wang JF, Milosveski V, Schramek C, Fong GH, Becks GP, Hill DJ 1998 Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J Endocrinol* **157**:5-12.
183. Ramsden JD, Buchanan MA, Egginton S, Watkinson JC, Mautner V, Eggo MC 2005 Complete inhibition of goiter in mice requires combined gene therapy modification of angiopoietin, vascular endothelial growth factor, and fibroblast growth factor signaling. *Endocrinology* **146**:2895-2902.
184. Yamada E, Yamazaki K, Takano K, Obara T, Sato K 2006 Iodide inhibits vascular endothelial growth factor-A expression in cultured human thyroid follicles: a microarray search for effects of thyrotropin and iodide on angiogenesis factors. *Thyroid* **16**:545-554.
185. Dohan O, Carrasco N 2003 Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol* **213**:59-70.
186. Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J, Köhrle J 1997 Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* **240**:832-838.
187. Cochaux P, Van Sande J, Dumont JE 1982 Inhibition of the cyclic AMP-adenylate cyclase system and of secretion by high concentrations of adenosine in the dog thyroid. *Biochem Pharmacol* **31**:3763-3767.

- 188.** Libert F, Schiffmann SN, Lefort A, Parmentier M, Gerard C, Dumont JE, Vanderhaeghen JJ, Vassart G 1991 The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J* **10**:1677-1682.
- 189.** Andrade BM, Araujo RL, Perry RL, Souza EC, Cazarin JM, Carvalho DP, Ceddia RB 2011 A novel role for AMP-kinase in the regulation of the Na⁺/I⁻-symporter and iodide uptake in the rat thyroid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**:C1291-1297.
- 190.** Tornquist K, Sukumaran P, Kemppainen K, Lof C, Viitanen T 2014 Canonical transient receptor potential channel 2 (TRPC2): old name-new games. Importance in regulating of rat thyroid cell physiology. *Pflugers Arch* **466**:2025-2034.
- 191.** Di Girolamo M, D'Arcangelo D, Bizzarri C, Corda D 1991 Muscarinic regulation of phospholipase A2 and iodide fluxes in FRTL-5 thyroid cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* **125**:192-200.
- 192.** Piehl S, Hoefig CS, Scanlan TS, Köhrle J 2011 Thyronamines--past, present, and future. *Endocr Rev* **32**:64-80.
- 193.** Chiellini G, Erba P, Carnicelli V, Manfredi C, Frascarelli S, Ghelardoni S, Mariani G, Zucchi R 2012 Distribution of exogenous [¹²⁵I]-3-iodothyronamine in mouse in vivo: relationship with trace amine-associated receptors. *J Endocrinol* **213**:223-230.
- 194.** Kosugi S, Inoue S, Matsuda A, Jhiang SM 1998 Novel, missense and loss-of-function mutations in the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect in three Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:3373-3376.
- 195.** Van Hauwe P, Everett LA, Coucke P, Scott DA, Kraft ML, Ris-Stalpers C, Bolder C, Otten B, de Vijlder JJ, Dietrich NL, Ramesh A, Srisailapathy SC, Parving A, Cremers CW, Willems PJ, Smith RJ, Green ED, Van Camp G 1998 Two frequent missense mutations in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* **7**:1099-1104.
- 196.** Rivolta CM, Moya CM, Gutnisky VJ, Varela V, Miralles-Garcia JM, Gonzalez-Sarmiento R, Targovnik HM 2005 A new case of congenital goiter with hypothyroidism caused by a homozygous p.R277X mutation in the exon 7 of the thyroglobulin gene: a mutational hot spot could explain the recurrence of this mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:3766-3770.
- 197.** Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, Rasmussen LB, Perrild H, Andersen S, Pedersen IB, Carle A 2010 Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **24**:13-27.
- 198.** Arvan P, Kim PS, Kuliawat R, Prabakaran D, Muresan Z, Yoo SE, Abu Hossain S 1997 Intracellular protein transport to the thyrocyte plasma membrane: potential implications for thyroid physiology. *Thyroid* **7**:89-105.
- 199.** Silveira JC, Kopp PA 2015 Pendrin and anoctamin as mediators of apical iodide efflux in thyroid cells. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **22**:374-380.
- 200.** Kopp P, Pesce L, Solis SJ 2008 Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. *Trends Endocrinol Metab* **19**:260-268.
- 201.** Vella KR, Ramadoss P, Lam FS, Harris JC, Ye FD, Same PD, O'Neill NF, Maratos-Flier E, Hollenberg AN 2011 NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways. *Cell Metab* **14**:780-790.
- 202.** Astapova I, Vella KR, Ramadoss P, Holtz KA, Rodwin BA, Liao XH, Weiss RE, Rosenberg MA, Rosenzweig A, Hollenberg AN 2011 The nuclear receptor corepressor (NCoR) controls thyroid hormone sensitivity and the set point of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Mol Endocrinol* **25**:212-224.
- 203.** Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Perez-Martinez L, Zoeller T, Charli JL 1998 Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* **18**:231-247.
- 204.** Burmeister LA, Pachucki J, St Germain DL 1997 Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* **138**:5231-5237.

205. Obregon MJ, Mallol J, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G 1981 Presence of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in tissues from thyroidectomized rats. *Endocrinology* **109**:908-913.
206. Obregon MJ, Roelfsema F, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F, Querido A 1979 Exchange of triiodothyronine derived from thyroxine with circulating triiodothyronine as studied in the rat. *Clin Endocrinol (Oxf)* **10**:305-315.
207. Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR 1998 Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology* **139**:1156-1163.
208. Jakobs TC, Schmutzler C, Meissner J, Köhrle J 1997 The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene--mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element. *Eur J Biochem* **247**:288-297.
209. Li X, Clemens DL, Cole JR, Anderson RJ 2001 Characterization of human liver thermostable phenol sulfotransferase (SULT1A1) allozymes with 3,3',5-triiodothyronine as the substrate. *J Endocrinol* **171**:525-532.
210. Tong Z, Li H, Goljer I, McConnell O, Chandrasekaran A 2007 In vitro glucuronidation of thyroxine and triiodothyronine by liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* **35**:2203-2210.
211. Qatanani M, Zhang J, Moore DD 2005 Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* **146**:995-1002.
212. Maglich JM, Watson J, McMillen PJ, Goodwin B, Willson TM, Moore JT 2004 The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J Biol Chem* **279**:19832-19838.
213. Lawrence JE, Lamm SH, Pino S, Richman K, Braverman LE 2000 The effect of short-term low-dose perchlorate on various aspects of thyroid function. *Thyroid* **10**:659-663.
214. Hu Z, Zhuo X, Shi Y, Liu X, Yuan J, Li L, Sun Y 2014 Iodine deficiency up-regulates monocarboxylate transporter 8 expression of mouse thyroid gland. *Chin Med J (Engl)* **127**:4071-4076.
215. Larsen PR 1982 Thyroid-pituitary interaction: feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones. *N Engl J Med* **306**:23-32.
216. Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP 2001 Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* **22**:631-656.
217. Di Jeso B, Arvan P 2016 Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology. *Endocr Rev* **37**:2-36.
218. Herzog V 1984 Pathways of endocytosis in thyroid follicle cells. *Int Rev Cytol* **91**:107-139.
219. Calil-Silveira J, Serrano-Nascimento C, Kopp PA, Nunes MT 2016 Iodide excess regulates its own efflux: a possible involvement of pendrin. *Am J Physiol Cell Physiol* **310**:C576-582.
220. Calil-Silveira J, Serrano-Nascimento C, Nunes MT 2012 Iodide treatment acutely increases pendrin (SLC26A4) mRNA expression in the rat thyroid and the PCCl3 thyroid cell line by transcriptional mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* **350**:118-124.
221. Chen XY, Lin CH, Yang LH, Li WG, Zhang JW, Zheng WW, Wang X, Qian J, Huang JL, Lei YX 2016 The Effect on Sodium/Iodide Symporter and Pendrin in Thyroid Colloid Retention Developed by Excess Iodide Intake. *Biol Trace Elem Res* **172**:193-200.
222. Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G 1987 One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* **7**:3365-3370.
223. Schonberger J, Bauer J, Spruss T, Weber G, Chahoud I, Eilles C, Grimm D 2000 Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1. *J Mol Med (Berl)* **78**:102-110.

- 224.** Zielke A, Tezelman S, Jossart GH, Wong M, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH 1998 Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hurthle cell origin. *Thyroid* **8**:475-483.
- 225.** Derwahl M, Seto P, Rapoport B 1990 An abnormal splice donor site in one allele of the thyroid peroxidase gene in FRTL5 rat thyroid cells introduces a premature stop codon: association with the absence of functional enzymatic activity. *Mol Endocrinol* **4**:793-799.
- 226.** Leoni SG, Kimura ET, Santisteban P, De la Vieja A 2011 Regulation of thyroid oxidative state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess. *Mol Endocrinol* **25**:1924-1935.
- 227.** Serrano-Nascimento C, da Silva Teixeira S, Nicola JP, Nachbar RT, Masini-Repiso AM, Nunes MT 2014 The acute inhibitory effect of iodide excess on sodium/iodide symporter expression and activity involves the PI3K/Akt signaling pathway. *Endocrinology* **155**:1145-1156.
- 228.** Andres N, Lizcano JM, Rodriguez MJ, Romera M, Unzeta M, Mahy N 2001 Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Histochem Cytochem* **49**:209-217.
- 229.** Ishii H, Inada M, Tanaka K, Mashio Y, Naito K, Nishikawa M, Matsuzuka F, Kuma K, Imura H 1983 Induction of outer and inner ring monodeiodinases in human thyroid gland by thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab* **57**:500-505.
- 230.** Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondou A, Ogawa Y, Yonemoto T, Yoshimura M, Masaki H, Inada M 1992 Thyrotropin and triiodothyronine regulate iodothyronine 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* **131**:389-394.
- 231.** Lavado-Autric R, Calvo RM, de Mena RM, de Escobar GM, Obregon MJ 2013 Deiodinase activities in thyroids and tissues of iodine-deficient female rats. *Endocrinology* **154**:529-536.
- 232.** Wang K, Sun YN, Liu JY, Zhang L, Ye Y, Lin LX, Yan YQ, Chen ZP 2009 The impact of iodine excess on thyroid hormone biosynthesis and metabolism in rats. *Biol Trace Elem Res* **130**:72-85.
- 233.** St Germain DL 1988 Dual mechanisms of regulation of type I iodothyronine 5'-deiodinase in the rat kidney, liver, and thyroid gland. Implications for the treatment of hyperthyroidism with radiographic contrast agents. *J Clin Invest* **81**:1476-1484.
- 234.** Andrade BM, de Carvalho DP 2014 Perspectives of the AMP-activated kinase (AMPK) signalling pathway in thyroid cancer. *Biosci Rep* **34**.
- 235.** Dumont JE, Rocmans PA 1964 In Vivo Effects of Thyrotropin on the Metabolism of the Thyroid Gland. *J Physiol* **174**:26-45.
- 236.** Matsuzaki K, Segade F, Wong M, Clark OH, Perrier ND, Bowden DW 2005 Glucose transporters in the thyroid. *Thyroid* **15**:545-550.
- 237.** Samih N, Hovsepian S, Aouani A, Lombardo D, Fayet G 2000 Glut-1 translocation in FRTL-5 thyroid cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase and N-glycosylation. *Endocrinology* **141**:4146-4155.
- 238.** Andrade BM, Cazarin J, Zancan P, Carvalho DP 2012 AMP-activated protein kinase upregulates glucose uptake in thyroid PCCL3 cells independent of thyrotropin. *Thyroid* **22**:1063-1068.
- 239.** Vassart G, Desarnaud F, Duprez L, Eggerickx D, Labbe O, Libert F, Mollereau C, Parma J, Paschke R, Tonacchera M, et al. 1995 The G protein-coupled receptor family and one of its members, the TSH receptor. *Ann N Y Acad Sci* **766**:23-30.
- 240.** Field JB, Ealey PA, Marshall NJ, Cockcroft S 1987 Thyroid-stimulating hormone stimulates increases in inositol phosphates as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line. *Biochem J* **247**:519-524.
- 241.** Corda D, Marcocci C, Kohn LD, Axelrod J, Luini A 1985 Association of the changes in cytosolic Ca²⁺ and iodide efflux induced by thyrotropin and by the stimulation of alpha 1-adrenergic receptors in cultured rat thyroid cells. *J Biol Chem* **260**:9230-9236.

- 242.** Bidey SP, Chiovato L, Day A, Turmaine M, Gould RP, Ekins RP, Marshall NJ 1984 Evaluation of the rat thyroid cell strain FRTL-5 as an in-vitro bioassay system for thyrotrophin. *J Endocrinol* **101**:269-276.
- 243.** Ealey PA, Emmerson JM, Bidey SP, Marshall NJ 1985 Thyrotrophin stimulation of mitogenesis of the rat thyroid cell strain FRTL-5: a metaphase index assay for the detection of thyroid growth stimulators. *J Endocrinol* **106**:203-210.
- 244.** Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schutz G, Offermanns S 2007 Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest* **117**:2399-2407.
- 245.** Kosugi S, Mori T, Iwamori M, Nagai Y, Imura H 1989 Alpha 2- and beta-adrenergic receptors and adenosine A1 receptor of FRTL-5 rat thyroid cells in relation to fucosyl GM1 ganglioside. *Endocrinology* **124**:2707-2710.
- 246.** Maayan ML, Debons AF, Krinsky I, Volpert EM, From A, Dawry F, Siclari E 1977 Inhibition of thyrotropin- and dibutyryl cyclic AMP-induced secretion of thyroxine and triiodothyronine by catecholamines. *Endocrinology* **101**:284-291.
- 247.** Jeon SM 2016 Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp Mol Med* **48**:e245.
- 248.** Sukumaran P, Lof C, Kemppainen K, Kankaanpaa P, Pulli I, Nasman J, Viitanen T, Tornquist K 2012 Canonical transient receptor potential channel 2 (TRPC2) as a major regulator of calcium homeostasis in rat thyroid FRTL-5 cells: importance of protein kinase C delta (PKCdelta) and stromal interaction molecule 2 (STIM2). *J Biol Chem* **287**:44345-44360.
- 249.** Sukumaran P, Lof C, Pulli I, Kemppainen K, Viitanen T, Tornquist K 2013 Significance of the transient receptor potential canonical 2 (TRPC2) channel in the regulation of rat thyroid FRTL-5 cell proliferation, migration, adhesion and invasion. *Mol Cell Endocrinol* **374**:10-21.
- 250.** Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R 2004 Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* **141**:737-745.
- 251.** Liu T, Fang Z, Wang G, Shi M, Wang X, Jiang K, Yang Z, Cao R, Tao H, Wang X, Zhou J 2016 Anti-tumor activity of the TRPM8 inhibitor BCTC in prostate cancer DU145 cells. *Oncology letters* **11**:182-188.
- 252.** Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Jr., Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N 2007 Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* **54**:379-386.
- 253.** Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A 2007 TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* **54**:371-378.
- 254.** Ma S, Yu H, Zhao Z, Luo Z, Chen J, Ni Y, Jin R, Ma L, Wang P, Zhu Z, Li L, Zhong J, Liu D, Nilius B, Zhu Z 2012 Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol* **4**:88-96.
- 255.** Yamanaka MK, Kelly LE 1981 A calcium/calmodulin-dependent cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase from *Drosophila* heads. *Biochim Biophys Acta* **674**:277-286.
- 256.** Sharma RK, Das SB, Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Shrivastav A 2006 Regulation of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1): review. *Int J Mol Med* **18**:95-105.
- 257.** Eggo MC 2010 Molecular regulation of thyroid gland function. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **17**:396-401.
- 258.** Susarla R, Watkinson JC, Eggo MC 2007 Regulation of plasminogen activators in human thyroid follicular cells and their relationship to differentiated function. *J Cell Physiol* **212**:643-654.
- 259.** Werry TD, Wilkinson GF, Willars GB 2003 Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. *Biochem J* **374**:281-296.

260. Vanderpump MP, Tunbridge WM 2002 Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid* **12**:839-847.
261. Dubbs SB, Spangler R 2014 Hypothyroidism: causes, killers, and life-saving treatments. *Emerg Med Clin North Am* **32**:303-317.
262. Langouche L, Lehmpul I, Perre SV, Kohrle J, Van den Berghe G 2016 Circulating 3-T1AM and 3,5-T2 in Critically Ill Patients: A Cross-Sectional Observational Study. *Thyroid* **26**:1674-1680.
263. Han H, Xin P, Zhao L, Xu J, Xia Y, Yang X, Sun X, Hao L 2012 Excess iodine and high-fat diet combination modulates lipid profile, thyroid hormone, and hepatic LDLr expression values in mice. *Biol Trace Elem Res* **147**:233-239.
264. Kurmann AA, Serra M, Hawkins F, Rankin SA, Mori M, Astapova I, Ullas S, Lin S, Bilodeau M, Rossant J, Jean JC, Ikononou L, Deterding RR, Shannon JM, Zorn AM, Hollenberg AN, Kotton DN 2015 Regeneration of Thyroid Function by Transplantation of Differentiated Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**:527-542.

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

3-Iodothyronamine decreases expression of genes involved in iodide metabolism in mouse thyroids and inhibits iodide uptake in PCCL3 thyrocytes.

Schanze N, Jacobi SF, Rijntjes E, Mergler S, Del Olmo M, Hoefig CS, Khajavi N, Lehmpfuhl I, Biebermann H, Mittag J, Köhrle J. *Thyroid*. 2017; 27(1):11-22. doi: 10.1089/thy.2016.0182.

3-Iodothyroacetic acid lacks thermoregulatory and cardiovascular effects in vivo.

Hoefig CS, Jacobi SF, Warner A, Harder L, **Schanze N**, Vennström B, Mittag J. *Br J Pharmacol*. 2015; 172(13):3426-33. doi: 10.1111/bph.13131.

Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE₂-dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis.

Henkel J, Frede K, **Schanze N**, Vogel H, Schürmann A, Spruss A, Bergheim I, Püschel GP. *Lab Invest*. 2012; 92(11):1597-606. doi: 10.1038/labinvest.2012.128.

Oncostatin M produced in Kupffer cells in response to PGE₂: possible contributor to hepatic insulin resistance and steatosis.

Henkel J, Gärtner D, Dorn C, Hellerbrand C, **Schanze N**, Elz SR, Püschel GP. *Lab Invest*. 2011; 91(7):1107-17. doi: 10.1038/labinvest.2011.47.

In vivo effects of repeated thyronamine (T₀AM) administration in male C57BL/6J mice.

Harder L, **Schanze N**, Sarsenbayeva A, Kugel F, Köhrle J, Schomburg L, Mittag J, Hoefig CS. *Endocrine Connections*, in Revision.

A validated LC-MS/MS method for cellular thyroid hormone metabolism: uptake and turnover of mono-iodinated thyroid hormone metabolites by PCCL3 thyrocytes.

Richards KH, **Schanze N**, Monk R, Rijntjes E, Rathmann D, Köhrle J. *PLOS ONE*, in Revision.

Vorträge

Studies on 3-Iodothyronamine biosynthesis and action in stem cell derived thyrocytes.

32. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), Ratzeburg, Dezember 2016, *Best Speaker Award*.

Thyronamine und Schilddrüsenfunktion.

11. JADE-Meeting, Berlin, Oktober 2016.

3-T₁AM signaling in the thyrocyte cell line PCCL3.

18th European Congress of Endocrinology, München, Mai 2016, *ESE Young Investigator Award.*

The thyroid hormone metabolite 3-T₁AM exerts direct effects on thyrocytes in vivo and in vitro.

17th Annual Meeting Young Active Research in Endocrinology (YARE), Berlin, Oktober 2015.

Effects of 3-Iodothyronamine on thyrocytes.

30. AESF, Bremen, Dezember 2014.

Effects of thyronamines, thyroacetic acids and their metabolites on thyrocytes.

29. AESF, Essen, Dezember 2013.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Josef Köhrle für seine hervorragende Betreuung über die gesamten 4 Jahre meiner Doktorarbeit, für die unermüdliche Geduld, mit der er kritisch Daten mit mir diskutiert hat, für die motivierenden Besprechungen, in denen ich von seinem immensen Wissen lernen konnte und jedes Mal aufs Neue dazu inspiriert wurde aus eigenem Antrieb zielstrebig zu sein und mich immer weiterzubilden; außerdem für das entgegengebrachte Vertrauen und den weitgehenden Freiraum, der mir während der Durchführung von Experimenten und der Realisierung von Plänen eingeräumt wurde. Die Möglichkeit mehrerer Laboraufenthalte und einiger Tagungsteilnahmen während meiner Promotionszeit sehe ich als große Bereicherung, die nicht nur zu meiner fachlichen, sondern auch persönlichen Entwicklung beigetragen hat.

Herrn Prof. Sigmar Stricker danke ich für sein Interesse und die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Allen Mitarbeitern des IEÉ sei für die tolle Arbeitsatmosphäre, ihre fortwährende Hilfsbereitschaft und auch für die schönen Stunden außerhalb der Arbeitszeit gedankt. Meinen aktuellen und ehemaligen Büromitbewohnern danke ich besonders für die gute Stimmung in unserem Mikrokosmos (Wer hat denn schon wieder Schokolade mitgebracht?!). Insbesondere Anja, mit der ich zeitweise allein auf weiter Flur war, möchte ich für die lustige Zeit sowie ihre tatkräftige und moralische Unterstützung danken. Auch die Zeit mit all meinen Mitdoktoranden (gleichermaßen Endos und PädEndos) wird mir immer in sehr guter Erinnerung bleiben. Vor allem Julika danke ich für unzählige Diskussionen fachlicher und privater Natur, für erfrischende Mensagänge, sonnige Kaffeepausen und tolle Konferenzen, die ohne sie nur halb so schön gewesen wären; am meisten aber dafür, dass ich mich immer auf sie verlassen konnte.

Im Speziellen für fachliche Beiträge möchte ich folgenden Personen danken: Dr. Eddy Rijntjes, Dr. Keith Richards und Dr. Daniel Rathmann – dem LC-MS/MS Team des Instituts – für die Vermessung vieler, vieler Proben und für konstruktive Diskussionen um Kontrollen und Standards,

Dr. Kostja Renko und Janine Martitz für die Einführung in die wunderbare Welt der Sandell-Kolthoff-Reaktion mit ihren schier unendlichen Anwendungsmöglichkeiten,

Dr. Eva Wirth für anregende Diskussionen und für den persönlichen Crashkurs ‚Finden und Präparieren der Mausschilddrüse‘ – ohne diese Technik hätte ich die *in vivo* Daten überhaupt nicht erheben können,

Kristin Fischer, Ray Monk, Anja Fischbach, Gaby Böhm und Vartiter Seher für die unkomplizierte, zuverlässige Zusammenarbeit und technische Assistenz,

Jerome Jatzlau für die Assistenz bei der Konfokalmikroskopie,

meiner MolMed-Praktikantin Marta, deren Ergebnisse teilweise in diese Doktorarbeit eingeflossen sind

und den Kooperationspartnern Dr. Carolin Höfig, Prof. Jens Mittag, Prof. Heike Biebermann, Dr. Stefan Mergler, Dr. Sabine Costagliola, Prof. Klaudia Brix, Dr. Georg Homuth sowie deren Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit, die Bereitschaft mich zeitweise in ihren Arbeitsgruppen aufzunehmen und die Möglichkeit dort Methoden zu erlernen und anzuwenden.

Für kritisches Lesen der Dissertation danke ich Carolin Höfig und Gina Dörpholz.

Mein Dank gilt außerdem der Gesamtheit des DFG Graduiertenkollegs 1208 für großartige Guest Lectures sowie die Möglichkeit an Graduate School Kursen und der einzigartigen Bregenz Summerschool teilzunehmen.

Für die bedingungslose Rückendeckung außerhalb der Wissenschaftswelt sei Simon, Gina, Karl und Holger gedankt.

Von Herzen bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner gesamten lieben, großen Familie! Besonders meinen Eltern Marion und Frank sowie meinen Großeltern Brigitte und Jürgen bin ich sehr dankbar für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung über all die Jahre. Euch widme ich diese Arbeit.