

**Aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin in der Medizinischen Poliklinik  
der Universität Würzburg**

**Leiter: Professor Dr. J. Köhrle**

**Gibt es eine parakrine Regulation der 5'Deiodasen in der thyrotrophen Zelllinie  
T $\alpha$ T1?**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Katrin Utech**

**aus Ilbesheim**

**Würzburg, Oktober 2004**

**Referentenblatt**

**Referent: Professor Dr. rer. nat. J. Köhrle**

**Koreferent: Professor Dr. med. B. Allolio**

**Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**Die Promovendin ist Ärztin**

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
cpm	counts per minute
5'-DI	5'-Deiodase Typ 1
5'-DII	5'-Deiodase Typ 2
DMSM	2'-Desoxynukleotid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
GH	Growth Hormone/Wachstumshormon
h	Stunde
J	Joule
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LH	Luteotropes Hormon
LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro
m	milli
min	Minute
NS	Nervensystem
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
POMC	Proopiomelanokortin
PRL	Prolaktin
PTU	6-N-Propyl-2-thiouracil
rT3	reverse T3 (3,3',5'-Triiodothyronin)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T3	3,5,3'-Triiodothyronin
T4	Thyroxin
TBG	Thyroxin bindendes Globulin
TCA	Trichloressigsäure
Tg	Thyreoglobulin
TPO	Thyroperoxidase
TRH	Thyrotropin Releasing Hormon
TSH	Thyrotropin, Thyreoidea stimulierendes Hormon
u.a.	und andere
u.s.w.	und so weiter
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

# **Inhaltsverzeichnis**

## **1. Einleitung und Fragestellung**

### **1.1 Allgemeine Einführung**

- 1.1.1 Hypothalamus-Hypophysen-System
- 1.1.2 Embryonalentwicklung der Hypophyse
- 1.1.3 TSH feedback und T3-Rezeptoren
- 1.1.4 Deiodaseisoenzyme
- 1.1.5 Proinflammatorische Zytokine
- 1.1.6 Zytokinregulationen in Schilddrüse und ESS (euthyroid sick syndrome)
- 1.1.7 Endokrine, parakrine und autokrine Regulationen im Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-System

### **1.2 Fragestellung und Zielsetzung**

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien, Materialien und Lösungen**

- 2.1.1 Chemikalien
- 2.1.2 Materialien
- 2.1.3 Lösungen und Puffer

### **2.2 Zellkultur**

- 2.2.1 Zelllinien
- 2.2.2 Nährmedien
- 2.2.3 Kultivieren der Zelllinien

### **2.3 Methoden**

- 2.3.1 Systematik einer Kokultur
- 2.3.2 Stimulationsversuche
- 2.3.3 Isolierung von RNA
- 2.3.4 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)
- 2.3.5 Gelelektrophorese
- 2.3.6 Präparation von Zellhomogenaten zum Nachweis der Deiodaseisoenzyme
- 2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Zellhomogenaten
- 2.3.8 Aktivitätsbestimmung der Deiodaseenzyme

## 2.3.9 Statistik

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Expression und Regulation der 5'-Deiodasen (D1 und D2) in T $\alpha$ T1-Zellen

- 3.1.1 Nachweis der Deiodaseaktivität von T $\alpha$ T1-Zellen
- 3.1.2 Aktivität der 5'-Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen in Abhängigkeit von Selen
- 3.1.3 Effekte von cAMP auf die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1-Zellen
- 3.1.4 Effekte von LPS auf die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1-Zellen
- 3.1.5 Regulation der 5'-Deiodasen im Zweikammer-Kokultursystem von T $\alpha$ T1-Zellen und TtT/GF-Zellen
- 3.1.6 Effekte von LPS auf die Deiodaseaktivität im T $\alpha$ T1-TtT/GF-Kokultursystem
- 3.1.7 Effekte von LPS auf die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1-Zellen, die mit vorkonditionierten Medien von TtT/GF-Zellen behandelt wurden
- 3.1.8 Effekte proinflammatorischer Zytokine auf die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1-Zellen
  - 3.1.8.1 Effekte von IL-1 $\beta$  auf die Deiodaseaktivität im T $\alpha$ T1-TtT/GF-Kokultursystem
  - 3.1.8.2 Effekte von TNF $\alpha$  auf die Deiodaseaktivität im T $\alpha$ T1-TtT/GF-Kokultursystem
  - 3.1.8.3 Effekte von IL-6 auf die Deiodaseaktivität im T $\alpha$ T1-TtT/GF-Kokultursystem

## 3.2 Effekte von T $\alpha$ T1-Zellen auf TtT/GF-Zellen

- 3.2.1 Nachweis der IL-6-Bildung in TtT/GF-Zellen im T $\alpha$ T1-TtT/GF-Kokultursystem
- 3.2.2 Nachweis der IL-6-Bildung in TtT/GF-Zellen, die mit konditionierten Medien von T $\alpha$ T1-Zellen behandelt wurden

# 4. Diskussion

## 4.1 Expression der 5'-Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen

## 4.2 Parakrine Regulation der Aktivität von 5'-Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen

## 4.3 Effekte von T $\alpha$ T1-Zellen auf TtT/GF-Zellen und bidirektionale Effekte

## **5. Zusammenfassung**

## **6. Literaturangaben**

# 1. Einleitung und Problemstellung

## 1.1 Allgemeine Einführung

### 1.1.1 Hypothalamus-Hypophysen-System

Das Hypothalamus-Hypophysen-System ist ein zentraler Regler endokriner Vorgänge im Organismus. Es bildet die oberste Instanz in der hormonellen Regulation von Körperfunktionen. Über Steuerhormone werden die Bildung und Freisetzung anderer Hormone peripherer endokriner Drüsen reguliert, die wiederum als negativer Rückkopplungseffekt zu einer Hemmung der hypothalamisch-hypophysären Hormonsynthese und Ausschüttung führen.

Der **Hypothalamus** gehört dem Zwischenhirn an. Neben endokrinologischen Aufgaben nimmt er als Teil des limbischen Systems Einfluß auf das Verhalten und kontrolliert alle vegetativen Funktionen. Die hormonbildenden hypothalamischen Zellen sind Nervenzellen, die zum einen Steuerhormone (Releasing- und Inhibiting-Hormone) zur Regulation der Bildung und Freisetzung von Hormonen der Adenohypophyse synthetisieren, zum anderen Effektorhormone bilden, die in der Neurohypophyse freigesetzt werden und ohne zwischengeschaltete endokrine Drüsen direkte Wirkungen an Zielzellen entfalten.

Die **Hypophyse** ist eine endokrine Drüse und steht anatomisch und funktionell in engem Zusammenhang mit dem Hypothalamus. Sie gliedert sich in zwei entwicklungsgeschichtlich unterschiedliche Anteile, den Lobus anterior (Hypophysenvorderlappen, Adenohypophyse), der sich aus einer Ausstülpung des Ektoderms der Mundhöhle, der sogenannten Rathke-Tasche entwickelt, und den Lobus posterior (Hypophysenhinterlappen, Neurohypophyse), der aus dem Zwischenhirn entsteht. Er steht über das Infundibulum (Hypophysenstil) in dauerhafter Verbindung mit dem Hypothalamus.

Das Infundibulum ist Ort der Freisetzung der hypothalamischen Steuerhormone. Sie werden in die Pfortadergefäße der Hypophyse abgegeben und gelangen mit dem Blut zur Adenohypophyse, wo sie ihre Wirkung entfalten (Popa *et al.*, 1930).

Das Parenchym des **Lobus posterior** wird von Pituizyten, einer nur im Hypophysenhinterlappen vertretenen Gliazellart, und marklosen Nervenfasern gebildet. Es handelt sich um Axone, deren Perikarya im Hypothalamus, im Bereich des Nucleus supra-opticus und paraventricularis liegen. Diese sind Bildungsorte der hypothalamischen Effektorhormone Oxytocin und Adiuretin (ADH, Vasopressin).

Oxytocin steuert die Muskelkontraktionen der glatten Muskulatur des Uterus bei Kohabitation und Geburt. Außerdem bewirkt es eine Kontraktion der myoepithelialen Elemente in den Ausführungsgängen der Mamma. Auslösende sekretorische Reize sind die Erweiterung von Vagina und Cervix sowie das Stillen. Adiuretin reguliert v.a. den osmotischen Druck und die intravasale Blutmenge. Durch Wirkung auf die distalen Tubuli und Sammelrohre der Niere bewirkt es eine vermehrte Wasserrückresorption. Steigt der osmotische Druck im Blut an, werden Osmorezeptoren angeregt, was die Adiuretin-Freisetzung steigert. Die in den hypothalamischen Nuclei synthetisierten Hormone werden im Golgi-Apparat des jeweiligen Perikaryon in Granula verpackt und gelangen im axoplasmalen Fluss über den Tractus hypothalamohypophysialis zur Neurohypophyse. In den Nervenfasern erfolgt die Speicherung und Freisetzung der hypothalamischen Effektorhormone aus den neurosekretorischen Granula durch exozytotische Entleerung in die Umgebung und damit ins Blut.

Der Hauptteil des Parenchyms des **Lobus anterior** beherbergt endokrin aktive Zellen, deren Hormone andere endokrine Zellen und endokrine Organsysteme beeinflussen. Gesteuert werden die Zellaktivitäten zum einen durch Releasing- und Inhibiting-Hormone des Hypothalamus, zum anderen über negative Rückkopplung durch die peripheren Hormone, deren Freisetzung sie zuvor induziert haben. Einen Überblick über die verschiedenen Hormone des Hypophysenvorderlappens und ihre Releasinghormone mit negativem Rückkopplungseffekt bietet Tabelle 1 (siehe Seite 3). Die bislang bekannten Drüsenzellen in der Adenohypophyse lassen sich funktionell in fünf verschiedene Typen einteilen. **Somatotrope Zellen** sind Bildungsort des Proteohormons Somatotropin (Growth Hormone GH, Wachstumshormon STH), eines Polypeptids mit sehr hoher Artenspezifität. Es wird als nicht-glandotropes Hormon bezeichnet, weil es nicht auf eine spezielle endokrine Drüse wirkt, sondern auf zahlreiche Gewebe im Organismus direkten Einfluss hat. Wirkung zeigt es im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel und es stimuliert das Wachstum langer Röhrenknochen durch Förderung der enchondralen Ossifikation. Der größte Teil der Wirkung erfolgt über Peptide (Somatomedine), die unter dem Einfluss des GH in Niere und Leber synthetisiert werden. Die **mammotropen oder laktotropen Zellen** sezernieren Prolaktin (PRL, laktotropes Hormon, LTH), wiederum ein Proteohormon, das strukturell dem GH ähnlich ist. Die Wirkung des Prolaktins besteht in der Förderung der Entwicklung und späteren Milchsekretion der Mammae in der Schwangerschaft. Gemeinsam mit anderen Hormonen hält es nach der Geburt die Milchbildung in der



<b>Hypophysen-Hormon</b>	<b>Wirkungsort des Hypophysen-Hormons</b>	<b>Negative Rückkopplung</b>	<b>Hypothalamus-Releasing-Hormon</b>	<b>Hypothalamus-Inhibiting-Hormon</b>
<b><i>Growth Hormone (GH)</i></b>	Zahlreiche Gewebe und Zellverbände	GH, Insulin-like-growth-Faktor (IGF-I)	Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH), Growth Hormone Releasing Peptide (GHRP, genauer Ligand bisher unklar, Ghrelin?)	Somatostatin (SRIH)
<b><i>Prolaktin (PRL)</i></b>	Brustdrüse (Leber, Niere u.a.)	PRL	Thyreotropin-Releasinghormon (TRH)	Prolaktin-Inhibiting-hormon (PIH, Dopamin)
<b><i>Follitropin (FSH)</i></b>  <b><i>Lutropin (LH)</i></b>	Gonaden	Estrogen, Progesteron, Androgene	Gonadotropin-Releasinghormon (Gn-RH)	(Dopamin wirkt hemmend auf der Ebene des Hypothalamus)
<b><i>Thyrotropin (TSH)</i></b>	Schilddrüse	Thyroxin, Triiodthyronin	TRH	Dopamin
<b><i>Kortikotropin (ACTH)</i></b>	Nebenniere	Glukokortikoide	Kortikotropin-Releasinghormon (CRH)	Unbekannt

**Tabelle 1: Hormone der Adenohypophyse mit Wirkort, negativer Rückkopplungskontrolle und hypothalamischen Steuerhormonen.**

Brustdrüse aufrecht. Weiter zeigt es zerebrale Wirkungen, stimuliert mütterliches Verhalten und weist eine Reihe weiterer Effekte z.B. im Immunsystem auf. Das Hormon der **kortikotropen Zellen** ist Kortikotropin (adrenokortikotropes Hormon, ACTH), ein Polypeptidhormon, das aus einem Vorläuferprotein, dem Proopiomelanocortin (POMC) synthetisiert wird, von dem sich neben  $\beta$ -Endorphinen auch melanozyten-stimulierende Hormone (MSHs) ableiten. ACTH stimuliert die Bildung von Kortikosteroiden (Mineralokortikoide, Glukokortikoide und Androgene) in der Nebennierenrinde. Sogenannte bihormonale Zellen, die Follitropin (Follikelstimulierendes Hormon, FSH) und Lutropin (Luteinisierendes Hormon, LH, bzw. beim Mann interstitialzellenstimulierendes Hormon, ICSH) synthetisieren sind die **gonadotropen Zellen**. Die Hormone gehören zur Familie der  $\alpha\beta$ -Glycoproteine, die in jeder Tierart identische  $\alpha$ -Untereinheiten und spezifische  $\beta$ -Untereinheiten besitzen (Pierce & Parsons, 1981). Weitere Mitglieder dieser Familie sind Thyrotropin (TSH) und das human chorionic gonadotropin (hCG) der Plazenta. FSH stimuliert die Follikelreifung im Ovar der Frau und die Gametogenese im männlichen Hoden. LH ist im weiblichen Zyklus für Reifung und Sprung des Graaf-Follikels verantwortlich und trägt zur Entwicklung des Corpus luteum bei. Beim Mann stimuliert es die Leydig-Zwischenzellen im Hoden. **Thyrotrope Zellen** bilden das Glykoprotein Thyrotropin (TSH), das die Schilddrüse zur Synthese und Freisetzung von Schilddrüsenhormonen stimuliert. Die Schilddrüse wird durch Bindung von TSH an spezifische, G-Protein gekoppelte Rezeptoren stimuliert, wodurch Adenylatzyklase aktiviert wird. Es kommt zum intrazellulären cAMP-Anstieg und zur Aktivierung von Proteinkinase A mit nachfolgender Aktivierung von Phosphorylasen (Vassart *et al.*, 1992). Zahlreiche Studien postulieren aber auch die Aktivierung anderer intrazellulärer second messenger Systeme, wie z.B. die intrazelluläre Steigerung der Kalziumkonzentration oder die Aktivierung von Proteinkinase C (Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerin) mit nachfolgender Aktivierung von Phosphorylasen (Condorelli *et al.*, 1992; Takano *et al.*, 1993), wodurch es zur Phosphorylierung von die Schilddrüsenzellen beeinflussenden Proteinen bzw. zur intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung kommt. Diese sind für die Synthese und Freisetzung von Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) verantwortlich und regulieren Schilddrüsenfunktionen. Die Beschreibung verschiedener TSH-Rezeptor assoziierter Wirkungskaskaden lässt vermuten, dass eine von Spezies zu Spezies differente TSH-R-Struktur vorliegt, die sich im Laufe der Evolution artenspezifisch modifiziert hat. Diese Theorie wird durch neueste

Sequenzierungsversuche des TSH-R gestützt (Kaczur *et al.*, 2003). Außer den fünf beschriebenen sekretorisch aktiven Drüsenzellen kommt in der Adenohypophyse eine weitere Zellart vor. Es handelt sich um **Follikulostellar-Zellen (FS-Zellen)**, die sternförmig verzweigte Fortsätze haben womit sie endokrine Drüsenzellen umgreifen. Sie bilden so ein dreidimensionales anatomisches Netzwerk, in dem die endokrinen Zellen verwoben sind. Bereits 1953 wurden sie als eigenständige Zellart der Adenohypophyse identifiziert (Rinehart & Farquhar, 1953). Immunhistochemisch zeigen sich FS-Zellen als heterogene Population. Ihre embryologische Entwicklung ist bislang nicht eindeutig. Es wurde zum einen eine Expression von gliazellspezifischen Proteinen, dem S100-Protein (Nakajima *et al.*, 1980) und dem glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Velasco *et al.*, 1982) nachgewiesen, welches zunächst zur Annahme führte, es handle sich um Zellen neuroektodermalen Ursprungs. Zum anderen weisen sie aber charakteristische Züge dendritischer Zellen auf (Allaerts, 1995; Allaerts *et al.*, 1990), was vermuten lässt, dass sie Stammzellen des Knochenmarks entspringen. Im Gegensatz zu den hormonbildenden Zellen sind in Follikulostellarzellen keine Sekretgranula nachweisbar. Es handelt sich um eine nichthormonbildende Zellpopulation, über deren Funktion im Netzwerk der Adenohypophysenzellen bislang nur wenig bekannt ist. Nachgewiesen sind Zell-Zell-Kommunikationen zwischen den einzelnen Populationen über die FS-Zellen hormonbildende Zellen in ihrem Wachstum und ihrer sekretorischen Aktivität beeinflussen. Bekannt ist z.B. die Fähigkeit von FS-Zellen, die Freisetzung von STH, PRL und LH aus den jeweiligen Zellen der Adenohypophyse zu modulieren (Baes *et al.*, 1987). Die Zell-Zell-Kommunikation findet über Gap Junctions, aktiviert durch Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentration (Fauquier *et al.*, 2001), und parakrine Regulationen statt (Morand *et al.*, 1996). Man weiß heute, daß FS-Zellen phagozytieren können (Perryman *et al.*, 1980), Wachstumsfaktoren sezernieren, wie basic fibroblast growth factor (bFGF) (Ferrara *et al.*, 1987), vascular endothelial growth factor (VEGF) (Gospodarowicz *et al.*, 1987) insulin-like growth factor-I (INF-I) (Bach *et al.*, 1992) und TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- beta) (Renner *et al.*, 2002) und Zytokine (z.B Interleukin-6 (IL-6), leukemia inhibitory factor (LIF)) (Vankelecom *et al.*, 1989; Vankelecom *et al.*, 1993) bilden. Dies lässt eine parakrine Kontrollfunktion der FS-Zellen in der Adenohypophyse vermuten.

### 1.1.2 Embryonalentwicklung der Hypophyse

In der Ontogenese der Hypophyse ist die  $\alpha$ -Untereinheit der Glycoprotein hormone der erste hypophysenspezifische Marker, der am Tag 11 der Embryonalentwicklung bei der Maus im somatischen Ektoderm nachweisbar ist (Simmons *et al.*, 1990). Mit der Expression der jeweiligen hormonspezifischen  $\beta$ -Untereinheiten folgt der nächste Schritt in der Differenzierung der Hypophyse. So entstehen am Tag 13 kortikotrope, am Tag 14 thyrotrope, am Tag 15 mammatrope und am Tag 16 und 17 gonadotrope Zellen (Japon *et al.*, 1994). Zur Differenzierung der Zelltypen sind Stimuli des Hypothalamus sowie eine Kaskade von Homeobox-Transkriptionsfaktoren notwendig. Die Ontogenese der thyrotopen Zellpopulation ist abhängig von Pit-1 (pituitary-specific transcription factor 1), einem Mitglied der Familie der POU-Transkriptionsfaktoren (speziell an POU-DNA-Domänen bindende Faktoren), die spezifisch in der Hypophyse nachgewiesen wurden. Ihm wird eine entscheidende Rolle in der Genexpression der  $\beta$ -Untereinheiten von TSH und von GH und PRL zugeschrieben (Vidal *et al.*, 1998). Es wurde aber auch eine TSH-bildende Zellgruppe nachgewiesen, die sich unabhängig von Pit-1 entwickelt (Lin *et al.*, 1994). Zunächst wurde angenommen, es handle sich bei diesen Zellen um eine ausschließlich in der embryonalen Hypophyse vorkommende thyrotrope Population, die bei Geburt wieder verschwindet (Lin *et al.*, 1994). Allerdings wurden Pit-1-unabhängige thyrotrope Zellen in der Pars tuberalis adulter Hypophysen bei Hamster (Bergmann *et al.*, 1989), Ratte (Sakai *et al.*, 1992) und Schaf (Bockman *et al.*, 1997) nachgewiesen. Untersuchungen über die in der Pars tuberalis lokalisierten thyrotopen Zellen in der Rattenhypophyse ergaben, dass es sich hier um einen eigenen Typ von TSH-bildenden Zellen handelt, denen die mRNAs des Transkriptionsfaktors Pit-1 und des Schilddrüsenhormonrezeptors TR $\beta$ 2 fehlen (Sakai *et al.*, 1999). Weiter zeigt diese Zellgruppe keine klassische Inhibition der TSH-Sekretion durch aktives Schilddrüsenhormon (Bockers *et al.*, 1990), wie sie im Rahmen des negativen Rückkopplungseffektes bei Pit-1-abhängigen Zellen in der Pars distalis des Hypophysenvorderlappens bekannt ist. Dort nimmt das aktive Schilddrüsenhormon einen inhibitorischen Einfluß auf die TSH-Bildung und Freisetzung.

### 1.1.3 TSH feedback und T3- Rezeptoren

TSH nimmt eine zentrale Rolle im Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-System ein. Es gewährleistet eine kontrollierte Stimulation der Schilddrüse zur Abgabe von Hormonen. Das Glycoprotein hormone wird in den thyrotopen Zellen der

Adenohypophyse gebildet und setzt sich aus zwei Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  zusammen, die durch verschiedene Gene codiert werden, welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (Shupnik *et al.*, 1989). Das Gen der  $\alpha$ -Untereinheit wird von allen hormonbildenden Zellen der Gruppe der Glycoprotein hormone (LH, FSH, hCG und TSH) exprimiert und zeigt keine eigene systemische Hormonwirkung. Allerdings wurde eine intrahypophysäre stimulierende Wirkung der  $\alpha$ -Untereinheit auf laktotrope und gonadotrope Zellen beobachtet (Schwartz, 2000). Die Expression des Gens, welches die  $\beta$ -Untereinheit von TSH kodiert, ist spezifisch in thyrotropen Zellen nachweisbar. Dennoch zeigt sich die familiäre Zugehörigkeit von beispielsweise hCG und TSH darin, dass es homologe Anteile beider  $\beta$ -Untereinheiten der Hormone gibt. Man sieht sogar einen schilddrüsenstimulierenden Effekt von hCG im ersten Trimester der Schwangerschaft (Glinoe D, 1999). Die T<sub>3</sub>-vermittelte negative Feedbackregulation ist ein wichtiger Faktor der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse und wird durch die Bindung von T<sub>3</sub> an Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR), die Genprodukte der c-erb-A Protoonkogene sind (Weinberger *et al.*, 1986) und der Familie der Steroidhormonrezeptoren zugeordnet werden (Evans, 1988) gewährleistet. Man unterscheidet zwei Schilddrüsenhormonrezeptoren TR  $\alpha$  und  $\beta$  (Wu *et al.*, 2000; Brent, 2000), die von verschiedenen Genen, lokalisiert auf Chromosom 17 und 3 codiert werden. Durch alternatives splicing entstehen mindestens vier Isoformen des Rezeptors, TR- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, - $\beta$ 1 und - $\beta$ 2. Sie weisen eine unterschiedliche Gewebsverteilung auf. TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 und TR $\beta$ 1 zeigen eine breite Gewebsverteilung, während man zunächst davon ausging, der TR $\beta$ 2 sei ein hypophysenspezifischer Rezeptor (Hodin *et al.*, 1989). Man konnte ihn allerdings später noch in anderen Geweben nachweisen (Schwartz *et al.*, 1994). Warum es individuelle TR-Isoformen gibt, die auch noch eine unterschiedliche Gewebeexpression zeigen, ist bis anhin nicht im Detail geklärt. Die meisten Informationen hierzu stammen von Studien mit „knockout“ Mäusen, d.h., dass bei solchen Tieren Gene, die für die Bildung der spezifischen Rezeptoren verantwortlich sind, ausgeschaltet werden, so dass diese nicht exprimiert werden können. Es wird jeweils beobachtet, welche Veränderungen bei den Tieren auftreten, um Rückschlüsse auf die Funktion der Rezeptoren ziehen zu können. Die TR $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 2 knockout-Maus zeigt ein verlangsamtes Wachstum, eine verminderte Knochenmineralisation, einen unterentwickelten Dünndarm und eine verkürzte Lebensdauer (ca. fünf Wochen). Dagegen haben TR $\alpha$ 1 knockout-Mäuse nur eine niedrige Körpertemperatur und eine

verminderte Herzfrequenz bei normaler Überlebensrate. Beide Mausarten weisen eine erniedrigte TSH und T4 Konzentration auf. TR $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 knockout-Mäuse sind taub und haben eine Schilddrüsenhyperplasie mit hohen T4 und normalen TSH Konzentrationen im Serum. Ihre Lebensdauer ist nicht beeinträchtigt. TR $\alpha$  und  $\beta$  knockout-Mäuse zeigen eine Schilddrüsenhyperplasie mit einer hohen Konzentration von T4 im Serum bei normalen Konzentrationen von T3 und TSH. Sie zeigen sich im Wachstum retardiert, haben eine niedrige Knochenmineralisation und sterben verfrüht (Überlebensrate von ca. neun Monaten). Zusammenfassend lassen die Daten folgende Rückschlüsse ziehen: Die Anwesenheit von TR $\beta$  nimmt einen wichtigen Einfluss auf die T3-abhängige Entwicklung des Innenohres und die T3- vermittelte TSH-Suppression. Stattdessen scheinen die T3- vermittelten Prozesse im Energie- und Stoffwechselmetabolismus eher TR $\alpha$ - abhängig zu sein (Forrest *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1997; Gothe *et al.*, 1999).

Bei TRs handelt es sich um ligandenmodulierte nukleäre oder mitochondriale Rezeptoren, die in aktivierter Form als Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen mitsteuern. Sie beeinflussen den Transkriptionsvorgang der Zielzelle durch Bindung an spezifische DNA-Elemente, sogenannte TREs (thyroid hormone response elements), die sich aus zwei hexameren half-sites zusammensetzen. Beide half-sites können verschieden orientiert und durch verschieden viele Nukleotide voneinander entfernt sein (spacing) (Desvergne, 1994). Die Bindung des Rezeptors an TREs erfolgt als Monomer oder Dimer. Zur Bildung eines Dimers können die TRs untereinander homodimerisieren oder auch mit anderen Rezeptoren oder Proteinen heterodimerisieren. Neben einer Vielzahl von anderen Hormonrezeptoren ist der häufigste Heterodimerisierungspartner von Schilddrüsenhormonrezeptoren der universelle Rezeptor der 9-cis-Retinsäure, RXR. Die Genaktivierung oder Genrepression in der Zielzelle wird außerdem von der Interaktion von TRs mit anderen Proteinen, sogenannten Kofaktoren beeinflusst (Horwitz *et al.*, 1996). Diese Regulationsproteine fördern oder behindern die T3-Antwort durch Interaktion von TR mit der Transkriptionsmaschinerie. Beispiele für Koaktivatoren sind SRC (steroid receptor coactivator) und CREB (cAMP response element-binding protein), für Korepressoren NCOR (nuclear corepressor) und SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors). Im Allgemeinen binden Korepressoren in Abwesenheit von T3 an einen TR und unterdrücken die Genexpression. Bindet T3 an den TR wird der Korepressor verdrängt und die Bindung eines Koaktivators gefördert, sodass es zu einer

Genaktivierung kommt. Diesbezüglich durchgeführte Studien zeigten, dass die Koaktivatoren und Korepressoren eine entscheidende Rolle in der Hormonaktion spielen müssen. Schaltet man die verantwortlichen Gene der Kofaktoren aus (Daten von knockout SRC und CREB), führt dies im fetalen oder neonatalen Leben zum Tode (Koenig, 1998).

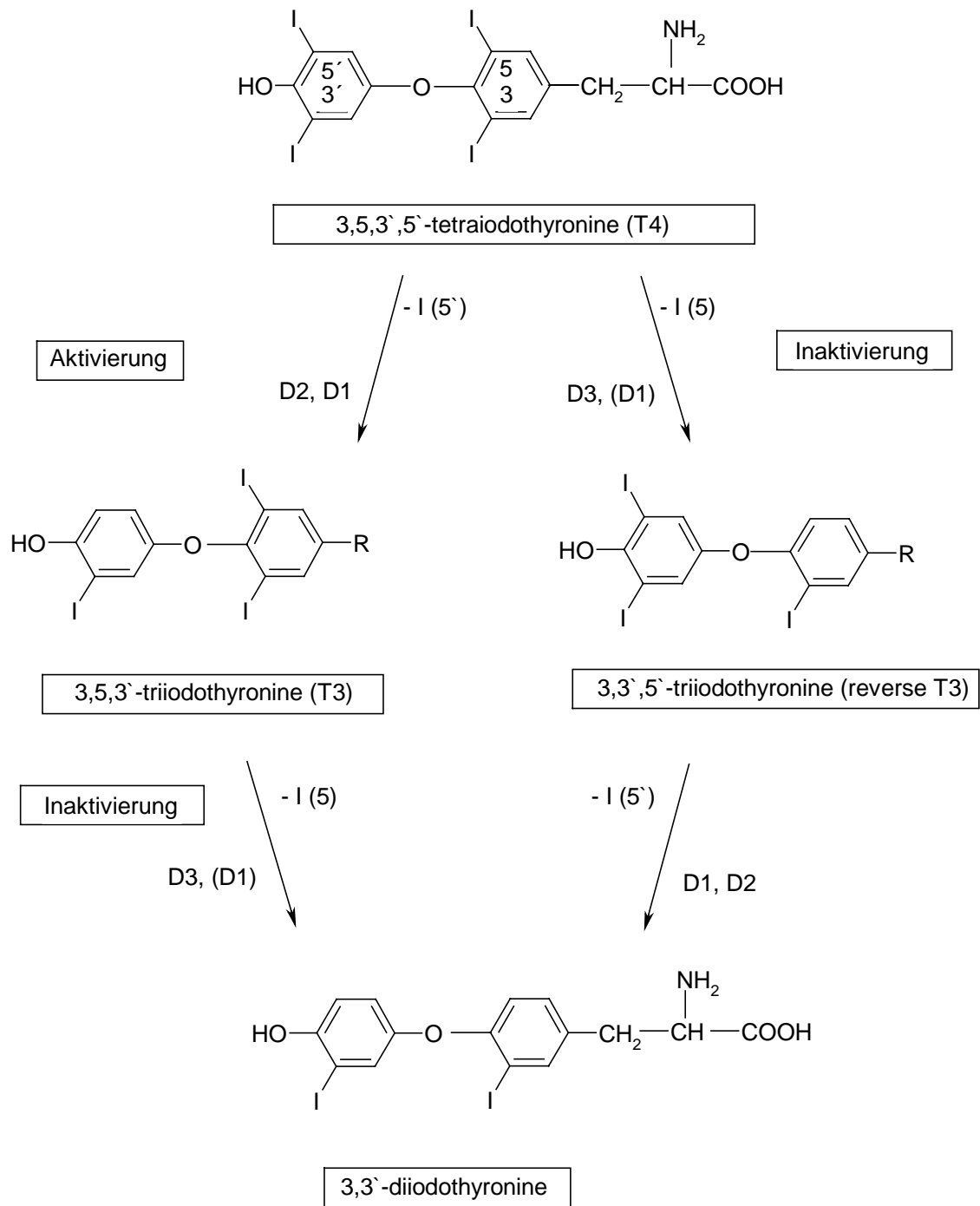
In der Hypophyse bewirkt T<sub>3</sub>, vermittelt über die negativen „thyroid hormone response elements“ (TRE) eine Reduktion der Gentranskription sowohl der  $\alpha$ - als auch der  $\beta$ -Untereinheit von TSH (Shupnik *et al.*, 1985). Dabei supprimiert T<sub>3</sub> die Expression der  $\beta$ -Untereinheit in stärkerem Maße als die der  $\alpha$ -Untereinheit (Chin *et al.*, 1985). Zudem wird die Halbwertszeit der mRNA der TSH $\beta$ -Untereinheit verkürzt (Krane *et al.*, 1991). Der negative Rückkopplungseffekt von T<sub>3</sub> auf das TSH $\beta$ -Gen zeigt eine ligandenabhängige Verstärkung (Sasaki *et al.*, 1999). Weiter lassen die verschiedenen Expressionen der Isoformen der Schilddrüsenhormonrezeptoren auf deren Rolle in der Vermittlung der T<sub>3</sub>-Antwort schließen. Untersuchungen in JEG-3-Zellen (humane Plazentazelllinie) zeigten, dass der negative Rückkopplungseffekt durch T<sub>3</sub> bei Bindung an den TR $\beta$ 1 zweifach potenter ist als bei Bindung an den TR $\alpha$ 1. Dagegen antagonisiert TR $\alpha$ 2 bei Koexpression von TR $\alpha$ 1 und  $\beta$ 1 die T<sub>3</sub>-abhängige negative Rückkopplung (McCabe *et al.*, 1998).

#### 1.1.4 Deiodaseisoenzyme

Die Schilddrüse bildet die beiden Hormone **L-Thyroxin** (T<sub>4</sub>) und **3, 5, 3'-Triiodthyronin** (T<sub>3</sub>), wobei T<sub>4</sub> das Hauptsekretionsprodukt darstellt, T<sub>3</sub> aber das thyromimetisch aktive Hormon ist. Alleine T<sub>3</sub> bindet in der Zielzelle an die spezifischen TRs. Der wichtigste Schritt im Metabolismus von T<sub>4</sub> ist also seine Monodeiodierung im äußeren Ring, wodurch die aktive Form T<sub>3</sub> entsteht. Diese sequentielle, enzymgesteuerte Deiodierung erfolgt in 70-90% der täglichen T<sub>3</sub>-Produktion in extrathyreoidalen Geweben. Diese besitzen ein vorgeschaltetes Enzymsystem, welches gewährleistet, dass, unabhängig vom kontinuierlichen Hormonangebot im Serum, das durch die permanente Hormonsekretion der Schilddrüse aufrechterhalten wird, eine gezielte selektive Hormonwirkung an der Zielzelle erfolgen kann (Konzept der „pre-receptor“ Kontrolle der Hormonwirkung). Die extraglanduläre reduktive Deiodierung von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub> wird durch **Deiodaseisoenzyme** katalysiert (Köhrle 1999, Leonard & Köhrle 2000). Derzeit sind drei Deiodaseisoenzyme (Mandel *et al.*, 1992, Davey *et al.*, 1995, Salvatore *et al.*, 1995) in Geweben bei Säugetieren

identifiziert worden. Die 5'-Deiodasen Typ I und II (im Folgenden als D1 und D2 beschrieben) katalysieren die Aktivierung von T4 zu T3. Die reduktive Deiodierung erfolgt am phenolischen, äußeren Ring der Schilddrüsenhormone oder am inneren Tyrosylring. Die D1 ist zusätzlich an der Inaktivierung von T3 und T4 beteiligt. Die 5-Deiodase (Typ III Deiodase, 5-D) hält man für ein reines Inaktivierungsenzym, da man bisher nur ihre katalysierende Wirkung in der reduktiven Deiodierung am Tyrosylring der Schilddrüsenhormone nachgewiesen hat. Schematisch werden die einzelnen Monodeiodierungsschritte in Abbildung 1 (siehe Seite 11) dargestellt. Alle drei Enzyme benötigen physiologische Kofaktoren, die bisher *in vivo* noch nicht bekannt sind. Man weiß, dass *in vitro* reduzierte Dithiole (z.B. DTT, Dithiothreitol) diese Funktion übernehmen. Deiodaseisoenzyme gehören der Familie der Selenoproteine an (Köhrle, 1999). Sie beinhalten Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum. Es wird durch das spezielle Stop-Codon UGA codiert. Wann diese drei terminalen Basen als Stop-Codon oder Codon für den Einbau eines Selenocysteins in eine Aminosäure wirken, hängt von der mRNA-Struktur ab. Der Einbau eines Selenocysteins erfordert eine stem-loop-Sekundärstruktur der mRNA (Heider *et al.*, 1992), die im 3'-untranslatierten Bereich hinter der für Selenocystein codierenden UGA-Sequenz liegt und als „selenocystein insertion sequence“ (SECIS) bezeichnet wird. Sie ist in allen für Selenoproteine codierenden mRNAs, nachweisbar (Low *et al.*, 1996). Alle drei Deiodaseisoenzyme unterscheiden sich in Struktur, Lokalisation im Gewebe, Wirkung, Reaktionsmechanismen und Regulation. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften und Funktionen der Enzyme, die auf unterschiedlichen Genen kodiert sind, gibt Tabelle 2 (siehe Seite 13).





**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Deiodierungsschritte der Schilddrüsenhormone durch die Deiodaseisoenzyme. R= Alaninrest**

Die **Typ I 5'-Deiodase** ist ein membrangebundenes Enzym, das aus zwei homodimeren 27 kDa Untereinheiten mit im Zentrum liegendem Selenocystein besteht. Das codierende humane Gen besteht aus vier Exons und ist auf Chromosom 1p32-33 lokalisiert (Jakobs *et al.*, 1997). Höchste D1-Konzentrationen sind beim Menschen in Leber, Niere und Schilddrüse (bei hyperthyreotem Stoffwechselzustand ist erhöhte Aktivität, bei hypothyreotem Stoffwechselzustand verminderte Aktivität nachweisbar) zu messen. Daneben sind niedrigere Konzentrationen in vielen anderen Geweben und Zellverbänden nachweisbar. Die D1 ist für die Bildung von T3 aus T4 verantwortlich und deiodiert auch 3,3',5'-Triiodothyronine (reverses T3, rT3) zu 3,3'-Diiodothyronine (3,3'-T2). Sie katalysiert als einzige Deiodase die Deiodierung sowohl am phenolischen Ring der Iodothyronine als auch am Tyrosylring (Fekkes *et al.*, 1982). Als Substrat bevorzugt das Enzym rT3 vor T4. Die D1 hat eine hohe Michaeliskonstante (Km) von ca.  $10^{-6}$ M und erreicht bei normaler bis erhöhter T4-Konzentration keine Sättigung. Eine Hemmung kann u.a. durch das Thyrostatikum 2-n-Propyl-6-thiouracil (PTU) erfolgen. Es bildet mit dem Selenocysteinrest im aktiven Zentrum des oxidierten Enzyms ein inaktives Intermediat.

Die **Typ II 5'- Deiodase** ist auch membrangebunden und zeigt eine multimerere Enzymstruktur mit einer oder mehreren substratbindenden Untereinheiten von je 29 kDa (Safran & Leonard, 1991) und besitzt ein cAMP induzierendes Aktivierungsprotein (CAP) (Safran *et al.*, 1996). Nach Identifizierung als eigenständiges Enzym (Visser *et al.*, 1983) nahm man an, es handle sich um kein Selenoprotein, weil keine selenabhängigen Reaktionen beobachtet und keine Hemmbarkeit durch PTU nachgewiesen werden konnte (Safran *et al.*, 1991). Durch Klonierung und cDNA-Analysen der Deiodaseisoenzyme verschiedener Spezies wurde ein TGA-Codon und ein SECIS- Element im 3'-untranslatierten Bereich nachgewiesen, das für ein funktionsfähiges Enzym mit charakteristischer D2-Aktivität kodierte (St Germain *et al.*, 1997, Davey *et al.*, 1999; Gereben *et al.*, 1999). Folglich scheint es sich bei der D2 doch um ein Selenoprotein zu handeln. Das codierende Gen der D2 liegt auf Chromosom 14q24.3 und setzt sich aus zwei Exons zusammen. Die Typ II Deiodase ist hoch exprimiert in Hypophyse, ZNS, braunem Fettgewebe und Plazenta von Ratten und Menschen. Zusätzlich wurde sie nachgewiesen im humanen Herz-, Skelettmuskel- und Schilddrüsengewebe (im Gegensatz zur D1 ist ihre Aktivität im hypothyreoten Stoffwechselzustand erhöht, im hyperthyreoten

<b>Eigenschaften</b>	<b>Typ I Deiodase</b>	<b>Typ II Deiodase</b>	<b>Typ III Deiodase</b>
<b>Wirkpektrum</b>	T3-Bildung aus T4, Inaktivierung von T3 und T4, erniedrigt rT3-Spiegel	T3-Bildung aus T4	Inaktivierung von T3 und T4
<b>Wirkprinzip</b>	Reduktive Deiodierung am phenolischen Ring und Tyrosylring der SD-Hormone	Reduktive Deiodierung am Phenolring	Reduktive Deiodierung am Tyrosylring
<b>Lokalisation</b>	Leber, Nieren, Schilddrüse, Hypophyse, nicht im ZNS	ZNS, Hypophyse, Braunes Fettgewebe, Plazenta, Schilddrüse, Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur	ZNS, Haut, Plazenta, Embryonalgewebe
<b>Substratpräferenz</b>	rT3>>T4>T3	T4>rT3	T3>T4
<b>Hemmbarkeit durch PTU</b>	gegeben	Nicht gegeben	Nicht gegeben
<b>T3- Antwort</b>	Anstieg	Abnahme	Anstieg

**Tabelle 2: Übersicht der humanen Deiodaseisoenzyme.**

**T3:** 3,5,3'-Triiodthyronin; **T4:** Thyroxin; **rT3:** reverses T3; **SD:** Schilddrüse; **ZNS:** Zentrales Nervensystem.

erniedrigt) (Croteau *et al.*, 1996; Salvatore & Bartha *et al.*, 1996; Salvatore & Tu *et al.*, 1996). Ihr Km-Wert für T4 liegt im nanomolaren Bereich. Im Gegensatz zur D1 katalysiert die D2 nur die Deiodierung am Phenolring von T4 und rT3, stellt also ein ausschließlich aktivierendes Enzym dar. Es zeigt eine Substratpräferenz gegenüber T4. Durch PTU kann nur bei sehr hohen Konzentrationen eine Inhibition der Aktivität erfolgen (Salvatore & Bartha *et al.*, 1996).

Die **Typ III 5-Deiodase** ist ein membrangebundenes Selenoprotein mit einem Molekulargewicht von 31,500. Bisher wurde eine 32 kDa substratbindende Untereinheit nachgewiesen (Salvatore *et al.*, 1995). Exprimiert wird die 5-D beim adulten Menschen

in ZNS, Haut und Plazenta. Speziell erfolgte der Nachweis von 5-D in Purkinje-Zellen vom Hühner-Kleinhirn (Verhoelst *et al.*, 2002). Während der Embryonalentwicklung ist sie in vielen Geweben nachweisbar und scheint dort eine entscheidende Rolle zu spielen. Wie bei den anderen Isoformen auch reguliert der Schilddrüsenhormonstatus die Aktivität der 5-D (wie bei der D1 ist sie in hyperthyreoter Stoffwechsellage erhöht, in hypothyreoter erniedrigt). Die Rolle der Typ III 5-D besteht in der Inaktivierung von T3 und T4. Die T4-Deiodierung am Tyrosylring scheint die wichtigste Quelle des zirkulierenden rT3-Pools in Serum und Liquor zu sein (Leonard *et al.*, 2000). Sie erfolgt an der 5-Position des Tyrosylrings der Iodothyronine. Steigt das Angebot an rT3, so entsteht im Enzymstoffwechsel der Typ I Deiodase eine Konkurrenz gegenüber der Bildung von aktivem T3 aus T4, weil rT3 das bevorzugte Substrat der D1 darstellt. Weiter bewirkt eine erhöhte rT3-Konzentration (gleichermaßen wie eine erhöhte T4-Konzentration) eine verminderte Aktivität der D2, da es zu einer intrazellulären Translokation der p29 D2- Untereinheit und Polymerisation im Aktin-Zytoskelett kommt (Leonard *et al.*, 1997).

### 1.1.5 Proinflammatorische Zytokine

Zytokine werden von verschiedensten Zellpopulationen (Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, etc.) gebildet. Sie stellen eine heterogene Gruppe intrazellulärer Mediatorstoffe dar, die in alle möglichen Körperprozesse eingreifen können. Sie wirken **autokrin** (d.h. auf die gleichen Zellen, von denen sie sezerniert wurden), **parakrin** (d.h. auf unmittelbar benachbarte Zellen) oder **endokrin** (d.h. auf weiter entfernt liegende Zellen) (Whitcher *et al.*, 1990). Es handelt sich um Polypeptide mit einem niedrigen Molekulargewicht (zwischen 15 und 25 kDa). Zu ihnen gehören als besonders wichtige Untergruppe die Lymphokine, die von sensibilisierten T-Lymphozyten im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion sezerniert werden. Sie spielen bei Entzündungen, Gewebsverletzungen und Infektionen eine Rolle und stellen hier Immunmodulatoren dar, die eine Reihe von Reaktionen durch Einwirkung auf Migration, Proliferation und Differenzierung der an der Immunantwort beteiligten Zellen bewirken. Weiter übernehmen Zytokine Aufgaben in der Differenzierung und Proliferation im hämatopoetischen System, in der Aktivierung der humoralen Abwehr von Fremdstoffen und Erregern im Blut und sie beeinflussen Zellfunktionen im Sinne einer immunologischen und antiinflammatorischen Reaktion. Allgemein ist bekannt, dass die Wirkungsentfaltung der Zytokine durch Bindung an spezifische Rezeptoren der

Zielzellen erfolgt. Es handelt sich um hochaffine Oberflächenrezeptoren mit gemeinsamer homologer Struktur bei mehreren Untergruppen. Weiter sind lösliche Rezeptoren bekannt, z.B. der lösliche Il-6-Rezeptor (sIl-6R). Die Aktivierung der meisten Zytokinrezeptoren scheint eine ligandeninduzierte multimere Komplexbildung zu induzieren. Die bindenden Faktoren können untereinander Homodimere bilden (z.B. bei TNF-Rezeptoren) oder mit anderen Membranmolekülen heterodimerisieren (z.B. bei IL-6-Rezeptoren (IL-6R, gp 80), sie bilden Heterodimere mit dem Glycoprotein (gp)130.

### **1.1.6 Zytokinregulationen in der Schilddrüse und ESS (euthyroid sick syndrome)**

Zytokinbindende Rezeptoren wurden auch in Thyrozyten nachgewiesen (Pang *et al.*, 1989; Svenson *et al.*, 1991). Zudem weiss man, dass Thyrozyten selbst Zytokine bilden, die vermutlich rückkoppelnd Einfluss auf die Thyrozytenaktivität nehmen (Grubeck-Loebenstein *et al.*, 1989; Del Prete *et al.*, 1990). Welche Rolle Zytokine in der Pathophysiologie von Schilddrüsenerkrankungen spielen ist nur z.T. bekannt. Z.B. stellen Interleukin-6 (IL-6) und wahrscheinlich noch andere Zytokine einen signifikanten Marker für destruierende Prozesse im Schilddrüsengewebe dar (Bartalena *et al.*, 1994). Außerdem spielen sie eine Rolle in der Pathogenese der Exophthalmusbildung beim Morbus Basedow (Heufelder, 1995). Patienten mit aktivem Basedow-assoziierten Exophthalmus zeigen eine vermehrte Expression der mRNA von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 im periorbitalen Fett- und Bindegewebe im Gegensatz zu Patienten mit inaktiver Basedow-Ophthalmopathie und exprimieren vermehrt TSH-Rezeptoren (Wakelkamp *et al.*, 2003).

Einen Einfluss von Zytokinen vermutet man auch beim euthyroid sick syndrome (ESS) oder Nieder-T3(T4)-Syndrom. Es stellt einen pathophysiologischen Zustand des Organismus dar, den erniedrigte Serum-T3-Spiegel begleitet von erhöhten Serum-rT3-Konzentrationen kennzeichnen (Docter *et al.*, 1993). Der TSH-Spiegel ist in der Regel im normalen bis normal-erniedrigten Bereich. Seine Ursachen sind bisher allerdings weder in der Hypophyse noch in der Schilddrüse gefunden worden. Ein Auftreten des Syndroms wird beobachtet bei schweren Allgemeinerkrankungen (z.B. Sepsis, Wundinfektion, chronisch-degenerative Erkrankungen, etc.), Hungerzuständen, Traumata und operativen Eingriffen. Dabei stellt sich das Krankheitsbild umso deutlicher dar, je stärker die hormonelle Veränderung im Organismus ist. Der Mechanismus der Entstehung dieses Zustandes ist bisher ungeklärt. Ein für die veränderten Schilddrüsenhormonspiegel verantwortliches Charakteristikum ist die

reduzierte T3-Produktion in der Leber. Hier liegt eine Hemmung der hepatischen Typ I Deiodase vor. Daraus resultieren zum einen der verminderte Serum-T3-Spiegel, zum anderen die erhöhte Serum-rT3-Konzentration als Ergebnis eines verminderten Enzymabbaus von rT3 zu Diiodthyronin. Ob die pathologische Veränderung der Hormonkonzentrationen im ESS eine Anpassung des Organismus zur Senkung des Energiebedarfs ist oder nur eine Fehlsteuerung infolge der schweren Systemerkrankung ist unklar. Des Weiteren hat man bisher keine Erklärung dafür, dass trotz der niedrigen T4-Spiegel im Serum keine vermehrte TSH-Sekretion durch die Hypophyse erfolgt. In der Frage nach der Pathogenese dieses Syndroms weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass Zytokine eine entscheidende Rolle spielen (Bartalena *et al.*, 1998; Papanicolaou, 2000). In welchem Ausmaß welches einzelne Zytokin wie und wo Einfluss nimmt, ist bisher noch unklar.

### **1.1.7 Endokrine, parakrine und autokrine Regulationen im Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-System**

Die Zellen der Adenohypophyse sind einerseits Ursprungszellen nicht nur für die speziellen Hormone, die sie bilden, sondern auch für endo-, para- und autokrin wirkende Faktoren. Andererseits sind sie Zielzellen für Hormone, Zytokine, Neuropeptide, Wachstumsfaktoren und weitere Substanzen, die ihr Wachstum und ihre Aktivität beeinflussen können (Schwartz, 2000). Gonadotrope Zellen sind zum Beispiel **Ursprungszellen** für mitogene Faktoren und Differenzierungsfaktoren, die wahrscheinlich eine Rolle in der Entwicklung laktotroper Zellen spielen. Zudem bilden sie Apoptosefaktoren (z.B. Insulin-like growth factor-I, IGF-I), wie Experimente mit tilapia-Fischen zeigten (Melamed *et al.*, 1999). Laktotrope Zellen beeinflussen sich gegenseitig über die Veränderung der Konzentration des intrazellulären Kalziums (Abraham *et al.*, 1998). Thyrotrope Zellen bilden eine Vielzahl von Faktoren, wie z.B. Galanin, das die Synthese von Prolaktin in laktotropen Zellen und Wachstumshormon in gonadotropen Zellen steigert. Sie bilden auch Zytokine. Es wurde IL-1 $\beta$  in thyrotropen Zellen von Ratten- und Mausadenohypophysen nachgewiesen, dessen Expression sich bei LPS-Gabe (bakterielles Lipopolysaccharid, das einen Infektzustand des Organismus nachahmen soll) erhöht (Koenig *et al.*, 1990; Takao *et al.*, 1993). Das Wachstumshormon der somatotropen Zellen beeinflusst auch das Wachstum aller intrahypophysären Zellen. Weiter exprimieren sie IL-6 (Green *et al.*, 1996) und in somatotropen Zellen der Maus konnten die IL-1-Rezeptor-Isoformen IL-1RI und IL-

IRII nachgewiesen werden (French *et al.*, 1996), die nach LPS-Stimulation in ihrer Anzahl abnehmen (Takao *et al.*, 1993). Zahlreiche Arbeiten zeigen potente parakrine Faktoren von kortikotropen Zellen. In denen von Rattenadenohypophysen wurde der Rezeptor IL-6R und die mRNA des Glycoproteins gp130 nachgewiesen, deren Expression sich ebenfalls unter LPS verstärkte (Gautron *et al.*, 2003).

Als **Zielzellen** für humorale Faktoren werden die hormonbildenden Zellen der Adenohypophyse unter anderem über den hormonellen Feedbackregelkreis reguliert. Der Hypothalamus steuert mit Neuropeptiden und Neurotransmittern über das hypothalamisch-hypophysäre portale Venengeflecht die Bildung und Sekretion von Hormonen der Adenohypophyse. Der Nachweis von Zytokin-mRNA im Gewebe des Hypothalamus lässt vermuten, dass Zytokine eine Rolle in der Regulation der Bildung und Freisetzung hypothalamischer Steuerhormone spielen (Spangelo *et al.*, 1995). Die Neurone des Nucleus paraventricularis enden in der Eminentia mediana, wo ihre Hormone direkt in den primären Kapillarplexus sezerniert werden. Sie passieren dann die langen Portalvenen des Hypophysenstils und gelangen schlussendlich in den sekundären Venenplexus der Adenohypophyse, von wo sie direkt an die Zielzelle gelangen. Neben dieser hormonellen Regulation nehmen auch lokale und periphere Faktoren Einfluss auf die Zellen. Die gonadotrophe Zielzelle wird z.B. von lokalen Faktoren wie Activin und Follistatin in Syntheseleistung und Wachstum der Zellen beeinflusst. Eine komplexe, parakrine Regulation von gonadotropen Zellen wird durch Oxytocin vermutet.  $\alpha$ -MSH, ein Spaltprodukt von POMC (Proopiomelanocortin), beeinflusst die sekretorische Aktivität von laktotropen Zellen. Wie oben beschrieben, bilden die Ursprungszellen auch Zytokine, die an der Zielzelle, im Sinne einer para-, auto- und endokrinen Regulation, ihre Wirkung entfalten können. Quelle der endogenen Zytokinbildung in der Adenohypophyse sind aber auch die Follikulostellarzellen, die zwischen den endokrin aktiven Zellen angeordnet sind. Es handelt sich um nicht parenchymale Zellen mit charakteristischen Eigenschaften von dendritischen Zellen, aber auch Zellen des myeloischen Systems und des Gliazellsystems. Sie sollen eine entscheidende Rolle in der Organisation der parakrinen Kommunikation spielen (Jones *et al.*, 1990; Allerts *et al.*, 1990). Sie bilden z.B. die Zytokine IL-6 (Vankelecom *et al.*, 1989; Vankelecom *et al.*, 1993), IGF-1 (Bach *et al.*, 1992) und IL-11 (Castro *et al.*, 2000) womit sie die Funktionen anderer Hypophysenzellen modulieren können. Dass Zytokine eine wichtige Rolle spielen in der Regulation von hormonellen Funktionen, lässt Rückschlüsse ziehen, dass Endokrinum und Immunsystem in der Adenohypophyse

bidirektional miteinander interagieren. So beeinflussen Zytokine endokrin aktive Zellen, die wiederum selbst die Zytokinfreisetzung aus mononukleären Zellen modulieren können (Imura *et al.*, 1994, Besedovsky, 1996).

Zytokine der proinflammatorischen Familie, wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , beeinflussen direkt die Funktionen von Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse. So hemmen IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 die TRH-induzierte Freisetzung von TSH aus thyrotropen Zellen der Hypophyse (van Haasteren *et al.*, 1994; Wassen *et al.*, 1996). In der Schilddrüse hemmt IL-6 die TSH-induzierte Freisetzung von T3 (Tominaga *et al.*, 1991), IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bewirken dort eine verminderte Iodidaufnahme mit folgender Hemmung der Schilddrüsenfunktion (Sato *et al.*, 1990; Nolte *et al.*, 1994).

## 1.2 Fragestellung und Zielsetzung

In thyrotropen Zellen der Adenohypophyse werden Typ I und Typ II 5'-Deiodasen gebildet, die im Rahmen des negativen Rückkopplungseffektes der Schilddrüsenhormone auf die TSH-Bildung und Freisetzung Einfluss nehmen. Dabei stammen im euthyreoten Zustand 50% des aktiven, an die Rezeptoren gebundenen T3 aus der lokalen Deiodierung in der thyotropen Zielzelle. In der Adenohypophyse werden zudem lokale Faktoren wie Zytokine sezerniert, die Zellwachstum und Hormonbildung modulieren. Es ist bekannt, dass auch die 5'-Deiodaseaktivitäten durch proinflammatorische Zytokine reguliert werden. Nachgewiesen sind Zytokineffekte auf die D1 in Schilddrüse und Leber (Ozawa *et al.*, 1988; Pang *et al.*, 1989; Hashimoto *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 1997), sowie auf die D1 und D2 im Modell der reaggregierten Zellen männlicher Rattenadenohypophysen und auf Kokulturen von somatomammotrophen GH3-Zellen und follikulostellaren TtT/GF-Zellen (Baur *et al.*, 2000). Inwieweit die 5'-Deiodasen der thyrotropen Zellen im Rahmen des negativen Rückkopplungseffektes durch para- bzw. autokrine Mechanismen beeinflusst werden, ist unklar. Es ist zu vermuten, dass solche auch bei der Steuerung des komplexen TSH-Feedbackregelkreis eine Rolle spielen. Die Stimulation oder Inhibition beider 5'-Deiodaseisoenzyme in der Adenohypophyse durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren könnte eine entscheidende Rolle im ESS spielen.

Auf dem Boden dieser Erkenntnisse formulierten wir die Arbeitshypothese einer para- bzw. autokrinen, zytokinabhängigen Deiodasemodulation im Modell von thyrotropen und follikulostellaren Zellen der Maushypophyse, bzw. einer Zytokinexpression in Follikulostellarzellen im Sinne eines bilateralen Zell-Zell-Kommunikationssystems. Als



---

Zellmodell wurden Kulturen von  $T\alpha T1$ -Zellen mit Charakteristika von thyrotrophen Zellen (Fähigkeit zur Bildung von TSH, Deiodaseexpression, Zytokinbildung) und Kulturen von TtT/GF-Zellen mit Charakteristika von Follikulostellarzellen (nicht Hormon bildende Zellen, Zytokinbildung) gewählt, welche sich als entsprechendes Zellmodell eignen sollten. Ziel der Arbeit war die Analyse von Expression und Regulation der Deiodaseisoenzyme Typ I und Typ II in der thyrotropen Zelllinie  $T\alpha T1$  in verschiedenen Versuchsreihen. Durch Kombination von direkten Stimulationsversuchen der  $T\alpha T1$ -Zellen in Kultur und Versuchen mit Kokulturen von  $T\alpha T1$ -Zellen und Follikulostellarzellen der Reihe TtT/GF sollten die Deiodaseregulationen durch parakrine Mechanismen untersucht werden. Zudem wurden TtT/GF- Zellen auf ihre Expression und Regulation von IL-6 in Abhängigkeit von  $T\alpha T1$ -Zellen in verschiedenen Versuchsreihen überprüft. Die Untersuchungen sollten Hinweise auf die Frage liefern, ob eine parakrin gesteuerte Kommunikationsebene zwischen thyrotropen  $T\alpha T1$ -Zellen und follikulostellaren TtT/GF-Zellen besteht, die beteiligt sein könnte an der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung eines gestörten TSH feedback in pathologischen Zuständen (z.B. ESS).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Materialien und Lösungen

Alle verwendeten Materialien waren von höchster verfügbarer Qualitätsstufe.

#### 2.1.1 Chemikalien:

Name	Firma
Agarose	Gibco BRL
Aqua Spüllösung	Delta- Pharma
Bio Rad	Bio Rad Laboratories GmbH
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	Sigma
DMEM	Gibco BRL
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
dNTP's	Amersham
Essigsäure	Roth
Ethanol, absolut	J.T. Barker
Ethidiumbromid	Sigma
Gunaidinium- Thiocyanat	Sigma
HBSS	Gibco BRL
HCl	Merck
Isopropanol	Merck
„Matri Gel“ Matrix	BD Biosciences
2- Mercaptoethanol	Sigma
NA- Laurylsarcosin	Sigma
Oligo d (T) primer	Gibco BRL
Phenol	Roth
PTU (2-n-Propyl-6-thiouracil)	ICN
Penicillin/Streptomycin	seromed
Ribonuclease Inhibitor	Amersham
3,3',5'-[ <sup>125</sup> I]-rT3	NEN Life Science Products
Superscript (Reverse Transkriptase)	Gibco BRL
Taq Polymerase	Amersham
Versene	Gibco BRL

**2.1.2 Materialien:**

Die verwendeten Glas- und Kunststoffartikel wurden bezogen von Eppendorf, Falcon, Greiner und Sarstedt.

**2.1.3 Lösungen und Puffer:**

BSA/PTU	BSA	10 %
	PTU	10 mM
Ethidiumbromid	Stammlösung 500µg/ml in Wasser Als Zusatz zu Agarosegelen 0,4 µg/ml	
GTC- Stammlösung	Guanidiniisothiocyanat	4 M
	Na-Laurylsarcosin	0,5 %
	Na-Citrat	25 mM
	β- Mercaptoethanol	0,1 M
Homogenisationspuffer pH 7,4	Saccharose	250 mM
	HEPES	20 mM
	EDTA	1 mM
	DTT (vor jeder Verwendung frisch dazu)	1 mM
Loading- Puffer 6x	Bromphenolblau	0,05 %
	Xylen- Cyanol	0,05 %
	Glycerin	30 %
PBS pH 7,4	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,47 mM
TAE- Puffer pH 8,0	Tris-Acetat	0,04 M
	EDTA	1 mM

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien

#### T $\alpha$ T1:

Es handelt sich um eine thyrotrope Zelllinie des *Pars distalis* der Adenohypophyse, die aus Hypophysentumoren transgener Mäuse etabliert wurde (Yusta *et al.*, 1998). Die Expression des Transkriptionsfaktors Pit-1 und dessen durch alternatives splicen gebildete Isoformen

Pit-1T und Pit-1 $\beta$  zeigen den hohen Differenzierungsgrad der Zellen. Sie exprimieren beide Isoformen der Schilddrüsenhormonrezeptor- $\beta$ -Gruppe, TR  $\beta$ 1 und TR  $\beta$ 2. Weiter wurde ein mit den Schilddrüsenhormonrezeptoren heterodimerisierender Partner, RXR  $\gamma$  nachgewiesen. Bei Behandlung mit T3 zeigen die Zellen eine dosis- und zeitabhängige Verminderung der Expression der mRNA der TSH  $\beta$  Untereinheit (Yusta *et al.*, 1998). Diese charakteristischen Merkmale der Zelllinie machen sie zu einem geeigneten thyrotropen Zellmodell.

#### TtT/GF:

Die Zelllinie wurde aus dem thyrotropen Hypophysentumor einer Maus (TtT b), der durch Radiothyreoektomie erzeugt wurde, etabliert (Inoue *et al.*, 1992). Es handelt sich um nicht hormonbildende Hypophysenzellen der Adenohypophyse. Sie zeigen das typische sternförmig-verzweigte Wachstum von Follikulostellarzellen und besitzen weitere, den Follikulostellarzellen ähnliche Charakteristika, weshalb sie als Modell für diesen Zelltyp verwendet werden. Sie besitzen phagozytotische Aktivität, zeigen Follikel im Lumen, exprimieren gliazellspezifisches S100-Protein und GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Inoue *et al.*, 1992), bilden „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) (Gloddek *et al.*, 1999), „transforming growth factor-beta“ (TGF- $\beta$ ) und deren Rezeptoren TGF- $\beta$  Typ1 und 2 (Renner *et al.*, 2002) und exprimieren IL-6 (Matsumoto *et al.*, 1993), dessen Synthese durch LPS stimuliert werden kann (Lohrer *et al.*, 2000). Weiter besitzen sie Rezeptoren für die Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  (Kobayashi *et al.*, 1997) und IL-11 (Perez Castro *et al.*, 2000). Zudem exprimieren sie Adenosinrezeptoren A(1) und A(2) über die Adenosin und Adenosinrezeptor-Agonisten die intrazelluläre cAMP Konzentration beeinflussen können (Rees *et al.*, 2002).

### 2.2.2 Nährmedien

Zur Zellkultivierung wurden verschiedene Nährmedien benötigt, die alle auf einen pH-Wert zwischen 7,2-7,4 eingestellt wurden. Als pH Indikator wurde Phenolrot

verwendet. Vor der Verwendung in der Zellkultur wurden die Nährmedien steril filtriert.

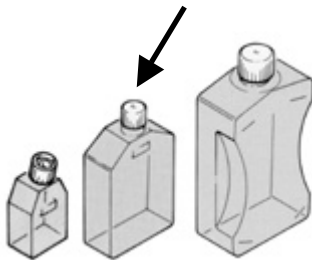
<b>Kulturmedium für die Zellreihe TtT/GF (je 1l):</b>	DMEM	
	pH 7.2-7.4	
	NaHCO <sub>3</sub>	3,7 g
	Penicillin	35 mg/l
	Streptomycin	50 mg/l
	FCS	10 %

<b>Kulturmedium für die Zellreihe TαT1 (je 1l):</b>	DMEM	
	pH 7.2-7.4	
	NaHCO <sub>3</sub>	3,7 g
	Penicillin	35 mg/l
	Streptomycin	50 mg/l
	FCS	10 %
	Fungizon	1:100
Natriumselenit	25 nM	

<b>Wachstumsmedium:</b>	DMEM/HAM F12 1:1	13,4 g/l
	pH 7.2-7.4	
	Insulin- Zn	5 mg/l
	Katalase (250mg/12,5 ml)	50 µl/l
	Penicillin	35 mg/l
	Streptomycin	50 mg/l
	BSA	0,1 %
	Transferrin	40 mg/l
	HEPES	15 mM
	TES	15 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	1 g/l
	Ethanol abs.	600 µl
	Ethanolamin	20 µM
	Natriumselenit	25 nM

### 2.2.3 Kultivieren der Zelllinien

Die adhärennten Zellen der Linien T $\alpha$ T1 und TtT/GF wurden in den entsprechend oben aufgeführten Medien bei 37 °C in einem Brutschrank (Heraeus) mit feuchter Atmosphäre (5 % CO<sub>2</sub>- Anteil) kultiviert. Es wurden Zellkulturflaschen der Größe 25 cm<sup>2</sup> (Falcon) verwendet, die jeweils 6 ml Volumen erfassten (Abbildung 2.1.). Die T $\alpha$ T1-Zellen benötigten zur Kultivierung mit Matri-Gel (BD Biosciences Basement Membrane Matrix 10 MLS 1:30 in serumfreiem Medium) beschichtete Flaschen. Diese wurden durch Überschichten eines Kulturflaschenbodens für 1 h bei Raumtemperatur mit 1 ml Matri-Gel vorbereitet, das Gel entfernt und die Flasche 2x mit sterilem PBS bzw. HBSS (Gibco BRL) gewaschen. Ein Mediumwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt, vereinzelt wurden die Zellen jeweils einmal pro Woche im Verhältnis 1:4. Hierzu wurde das Medium aus der Flasche abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Versene für 2 min bei Raumtemperatur überschichtet. Nach dem Absaugen von Versene folgte eine Inkubationszeit von 10 bis 45 min bei 37 °C bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen an die Kulturflasche vom Boden ablösten. Ein vollständiges Ablösen wurde durch Abspülen der Zellen vom Flaschenboden mit 4 ml frischem Medium erreicht, die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in eine Pipette vereinzelt und schließlich auf neue, mit frischem Medium vorbereitete Flaschen verteilt.



**Abbildung 2.1.:** Zellkulturflaschen der Größe 25 cm<sup>2</sup> (mit dem Pfeil markiert)

## 2.3 Methoden

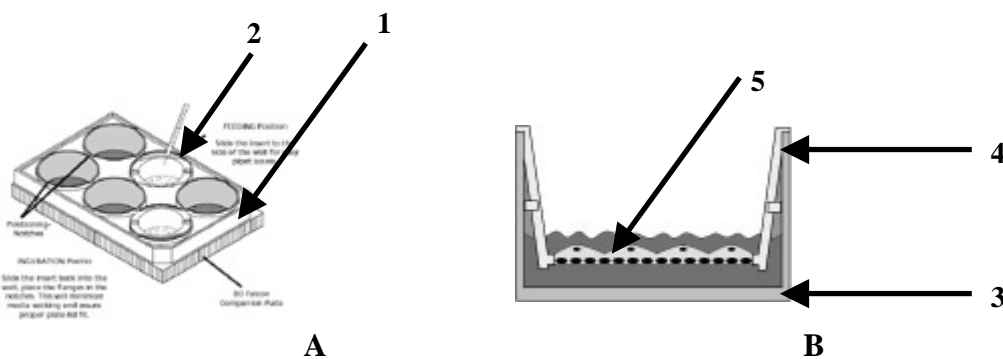
### 2.3.1 Systematik einer Kokultur

Für die Untersuchung parakriner Regulationen zwischen den beiden Zellkulturen T $\alpha$ T1 und TtT/GF wurde ein Zweikammer-Kokultursystem verwendet. Hierzu wurden 6-Lochplatten („six-well“-Platten, Falcon, Abbildung 2.2) zunächst mit Matri-Gel für 1 h überschichtet, 2x mit sterilem PBS bzw. HBSS gewaschen und T $\alpha$ T1- Zellen in 2 ml Kultur- oder Wachstumsmedium pro „well“ ausgesät. Spezielle Membraneinsätze

(Falcon, Porengröße 0,4  $\mu\text{m}$ ) wurden dann in die „wells“ eingesetzt und TtT/GF- Zellen in 2 ml Nährlösung ausgesät (Abbildung 2.3.). Der Versuchsaufbau ermöglichte eine Kommunikation beider Zelllinien über die Membranböden der Einsätze ohne direkten Kontakt der Zellen miteinander.



**Abbildung 2.2:** six-well-Platte



**Abbildung 2.3.:** **A:** Six-well-Platte (1) mit Membraneinsätzen (2). **B:** Längsschnitt eines „wells“ (3) mit einem Membraneinsatz (4), über dessen porenhaltigen Boden (5) ein Kontakt beider Flüssigkeiten möglich ist.

### 2.3.2 Stimmulationsversuche

Die Zellen der Linie T $\alpha$ T1 und TtT/GF wurden in der Kokultur und den dazugehörigen Kontrollen in verschiedenen Versuchsreihen mit Zytokinen und LPS stimuliert, die, wie im Folgenden aufgelistet, eingesetzt wurden. Die Stimmulationsversuche wurden stets ab einer Zelldichte von 70% Konfluenz begonnen. Das Nährmedium der Zellen wurde mit der jeweiligen Substanz versetzt und die Zellen über verschiedene Zeiträume, je nach Versuchsplanung, im entsprechenden Medium belassen.

<b>Rekombinantes Maus Interleukin-1<math>\beta</math></b> (Biosource)	<b>(IL-1<math>\beta</math>)</b>	0,1 ng/ml Endkonzentration
<b>Rekombinanter Maus Tumor Nekrose Faktor <math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</b> (Biosource)		0,1 ng/ml Endkonzentration
<b>Recombinantes Maus Interleukin-6</b> (Biosource)	<b>(IL-6)</b>	0,1 ng/ml Endkonzentration
<b>Lipopolysaccharid</b> (E. coli, Serotyp O26:B6, Sigma)	<b>(LPS)</b>	2 $\mu$ g/ml Endkonzentration

Zusätzlich wurden Stimulationen der Zelllinie T $\alpha$ T1 in den Zellkulturflaschen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen über verschiedene Zeiträume mit 100% konditioniertem Medium der Zellreihe TtT/GF (d.h. Medium, mit welchem die TtT/GF-Zellen über bestimmte Zeiträume hinweg kultiviert wurden), LPS und mit (Bu)<sub>2</sub>cAMP- und Butyrat-haltigen Medien inkubiert. Als Konzentrationen wurde eingesetzt:

<b>LPS</b>	2 $\mu$ g/ml Endkonzentration
<b>Konditioniertes Medium</b>	100 %
<b>Butyrat</b> (n-Buttersäure, Sigma)	1 mM
<b>(Bu)<sub>2</sub>cAMP</b> (2 Dibutyryladenosine3,5-Cyclo-Monophosphate), Sigma	1 mM

### 2.3.3 Isolierung von RNA

Die RNA der TtT/GF-Zellen wurde nach der Methode von Chomczynski *et al.*, 1987 isoliert. Zunächst wurde das Medium der Zellen vollständig abgesaugt und die adhären Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml GTC wurden die Zellen mit einem Zellkulturschaber (Greiner) geerntet und die DNA durch mehrfache Aspiration in eine 2 ml Spritze mit einer aufgesetzten Kanüle (0,9 mm) geschert. Dann wurde dem Homogenat 2,5 ml Phenol, 0,25 ml 2 M Na- Acetat pH 4.0 und 0,7 ml Chloroform zugefügt und gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 10 min zentrifugiert (Ultrazentrifuge Optima TM, 40000 rpm, Zimmertemperatur), dann der wässrige Überstand abgenommen und die RNA mit 3 ml Isopropanol gefällt (15 min, -20°C). Anschließend wurde die ausgefällte RNA abzentrifugiert (10 min, 40000 rpm, Raumtemperatur), getrocknet, in 0,3 ml GTC gelöst und erneut mit 0,3 ml Isopropanol gefällt (15 min, -20°C). Es folgte ein zehnminütiges Abzentrifugieren (Heraeus sepatech Biofuge 17RS, 10000 rpm, 4°C). Das getrocknete Pellet wurde



schließlich mit 70% EtOH gewaschen, abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm, 4°C), getrocknet und in RNasefreiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der vorhandenen RNA wurde photometrisch bei 260 nm (Photometer Pharmacia Biosystems) bestimmt und ihre Qualität durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1,5 %igem Agarosegel überprüft. Bis zur weiteren Verwendung lagerte die gelöste RNA bei -80°C.

### 2.3.4 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

#### cDNA -Synthese

Für weitere Versuche wurde die RNA mittels reverser Transkription in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden (um ein Endvolumen von 10 µl zu erreichen) 3- 10 µg RNA in 10 µl DEPC- Wasser aufgenommen (ad 10 µl gemischt) und 1 µl Oligo (dT)<sub>12-18</sub>-Primer (500 µg/ml) hinzugefügt. Die Mixtur wurde bei 70°C für 10 min inkubiert und anschließend 5 min auf Eis belassen. Dann wurden 4 µl 5X First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP's und 1 µl RNasin hinzugefügt und alles durch mehrfaches Auf- und Abziehen in die Pipettenspitze gemischt. Das Gemisch wurde 2 min bei 42°C inkubiert, mit 1 µl Superscript (200 U/µl) Reverse Transkriptase versetzt und weitere 50 min bei 42°C inkubiert bevor die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C (15min) abgestoppt wurde. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C.

#### Polymerasekettenreaktion

Zur Vervielfältigung der für Aktin und IL-6 kodierenden Nukleinsäuren aus der in der reversen Transkription gewonnenen cDNA wurden Oligonukleotidprimer, die von der Firma Roth GmbH (Karsruhe, Deutschland) bezogen wurden verwendet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Für ein Endvolumen von 50 µl wurden je 2µl cDNA mit 48 µl eines speziell hergestellten PCR-Master-Mix gemischt und die PCR in einem Thermocycler (MJ Research) mit 35 Zyklen gestartet.

#### Master Mix:

10x PCR Buffer	1 x
dNTP mix (10mM)	200 µM
Primer A	0,5 µM
Primer B	0,5 µM

Taq DNA Polymerase	1,25 units
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
cDNA	1 µg/Reaktion

<i>m Aktin 1</i>	5'>AGG GGC CGG ACT CAT CGT A <3'
<i>m Aktin 2</i>	5'>GCC ACT GCC GCA TCC TCT T<3'
<i>m IL-6 1</i>	5'>GTT GCC TTC TTG GGA CTG ATG<3'
<i>m IL-6 2</i>	5'>TGG AAA TTG GGG TAG GAA GGA<3'

**Tabelle 2: Oligonukleotidprimersequenzen**

Die PCR-Amplifikation erfolgt mit 45 sec Denaturierung bei 95 °C, 45 sec Annealing bei 58,3 °C (Aktin) bzw. 53,9 °C (IL-6), 60 sec Elongation bei 72 °C über 35 Zyklen und einer anschließenden Elongationsphase für 6 min bei 72 °C. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

### 2.3.5 Gelelektrophorese

Zur Analyse verschiedener Reaktionsergebnisse wurden Agarosegele verwendet. Hierzu wurde 1 % Agarose ( Gibco BRL- Life Technologies) mit 1x TAE gemischt, kurz aufgekocht und mit Ethidiumbromid (0,4 µg/ml) versetzt. Anschließend wurde die Flüssigkeit in eine mit Kamm bestückte Gussform gegeben und bis zum Erreichen des Gelzustandes abgekühlt. Dann wurde das Schiffchen in eine Kammer eingelegt und mit 1x TAE Laufpuffer bedeckt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Ladepuffer (6x konzentriert: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) vermischt, in die Geltaschen aufgetragen und bei 90 Volt für 60 min aufgetrennt.

### 2.3.6 Präparation von Zellhomogenaten zum Nachweis der Deiodaseisoenzyme

Zur Gewinnung von Zellhomogenaten der T $\alpha$ T1 Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gespült und in eiskaltem Homogenisationspuffer mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner) geerntet. Vor der Enzymmessung wurden die Zellen durch Ultraschall sonifiziert (10 mal ein 0,5 s-Puls bei 100 Watt, Labsonic U, Braun ) und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

### 2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Zellhomogenaten

Die Proteinkonzentrationen der gewonnenen Zellhomogenate wurden mittels Photometer mit Hilfe des Bio- Rad Proteinassays gemessen (modifiziert nach Bradford, 1976). Hierzu wurden je 20 µl des Zellhomogenates mit 1 ml Bio- Rad Lösung vermischt und für mindestens 5 min inkubiert. Zur Kontrolle diente eine Verdünnungsreihe eines bovinen IgG-Standards definierter Konzentration von 2, 5, 10 und 20 µl, die jeweils mit 1ml Bio- Rad vermischt wurden. Die photometrische Messung (Photometer Pharmacia Biosystems) erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm.

### 2.3.8 Aktivitätsbestimmung der Deiodaseisoenzyme

Die Aktivitätsbestimmung der Deiodaseenzyme erfolgte mit Hilfe des Deiodase-"assay" (Leonard *et al.*, 1980 ; Moreno *et al.*, 1994), einem Test, der die enzymatische Abspaltung von  $^{125}\text{I}^-$  aus radioaktiv markiertem Substrat untersucht. Als Substrat für die in den Zellhomogenaten nachzuweisenden Enzyme wurde radioaktiv markiertes 3,3',5'- $^{125}\text{I}$ - reverses T3 (spezifische Aktivität zwischen 34,9-46,3 MBq/µg) verwendet. Zunächst wurde vom Substrat freies Iodid, das durch spontane Deiodierung und Radiolyse bei Lagerung entstehen kann, entfernt. Dies erfolgte über eine Adsorptionschromatographie an Sephadex LH 20 (Pharmacia, Adsorption des freien  $^{125}\text{I}$ ). Hierzu wurde ein Säulchen (Sarstedt) vorbereitet, in das zunächst ein Filter (10 µm Porengröße, MoBiTec) gegeben und darauf 600 µl Sephadex LH 20 (in 0,1 N HCl) pipettiert wurden. Anschließend wurde das Säulchen mit 3 ml HCl (0,1 N) gewaschen. Nach Applikation des Tracers, dessen Menge so gewählt wurde, dass im fertigen Substratmix eine Aktivität von 55000 cpm/50 µl gemessen werden konnte, wurde sukzessiv erst mit 3 ml HCl (0,1 N), dann mit 3 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Abschließend wurde der Tracer mittels 1ml Ethanol: NH<sub>3</sub> (98:2) in ein Glasröhrchen eluiert. Der Vorgang wurde durch Zentrifugation (1000 rpm für 5min) beschleunigt. Dann wurde das Substrat im Wasserbad (37°) unter Stickstoffzufuhr vollständig eingedampft und gleich darauf der Substratmix zupipettiert:

NaOH	0,33 mM
KPO <sub>4</sub>	200 mM (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8)
rT3	je nach erforderlicher Endkonzentration
DTT	40mM
EDTA	2 mM

Von der fertigen Mixtur wurden 50 µl in 2ml 10 % Essigsäure 10 min im  $\gamma$ -Counter (Packard) gezählt und auf die gewünschte Aktivität von 55000 cpm/ 50 µl überprüft.

Zur Aktivitätsbestimmung im Zellhomogenat wurden je 40 µl (mit Gesamtproteinkonzentrationen von 40-110 µg) mit je 10 µl H<sub>2</sub>O bzw. PTU (2-n-Propyl- 6-thiouracil, 1 mM, Hemmung der Typ I 5'-Deiodase) zu einem Gesamtvolumen von 50 µl vorbereitet. Die Proben wurden dabei stets im Eisbad belassen. Für einen Leerwert wurden nur 10 µl H<sub>2</sub>O vorbereitet. Durch Zugabe von 50 µl Substratmix und sorgfältigem Mischen wurde die enzymatische Spaltung gestartet und die Proben jeweils 120 min bei 37° C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von je 50 µl BSA/PTU- Lösung (10% BSA/10 mM PTU) wurden die Proben ins Eisbad zurückgestellt. Dem Leerwert wurde erst nach Abstoppen der Reaktion 40 ml Homogenat zupipettiert. Die Proteine wurden mit je 400µl eiskalter TCA- Lösung (Trichloressigsäure, 10%) ausgefällt und abzentrifugiert (4000 rpm, 10min). Vom Überstand wurden 480 µl auf Säulen aufgetragen (Dowex 50 WX, Adsorption der radioaktiven Substratkomplexe) und zweimal mit 1 ml Essigsäure (10 %) gespült. Das Eluat mit dem freigesetzten <sup>125</sup>I wurde in Plastikröhrchen (Sarstedt, 4 ml) aufgefangen, mit einem Deckel verschlossen und 10 min im  $\gamma$ -Counter gezählt.

Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität der Deiodaseisoenzyme in der Einheit fmol/mg/min erfolgte nach der Formel:

$$\frac{2 \times \text{nmol rT3} \times 1000 \times 1000 (\text{cpm/frei} - \text{cpm/Leerwert})}{\text{cpm 100\%} \times \text{mg Protein} \times \text{min} \times 480/550}$$

Erläuterungen zur Berechnung:

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

- cpm/frei = gezählte Aktivität der jeweiligen Zellhomogenatprobe
- cpm/Leerwert = gezählte Aktivität des Leerwertes
- cpm 100% = gezählte Aktivität die bei 100% Umsatz theoretisch erreichbar wäre  
(direkte Messung des Substratmixes in H<sub>2</sub>O)

### 2.3.9 Statistik

Zum analytischen Vergleich von Mehrfachwerten wurden Mittelwerte gebildet und eine Varianzanalyse im Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Unterschiede mit  $p < 0.05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Versuchsanzahl lag bei der Aktivitätsmessung der 5`Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen alleine, nach Stimulation mit cAMP und LPS und auch in der Kokultur mit TtT/GF-Zellen bei drei (n=3). Ebenfalls wurden je drei Versuchsreihen zur Bestimmung der IL-6 Expression in TtT/GF-Zellen in der Kokultur mit T $\alpha$ T1-Zellen und nach Stimulation mit konditionierten Medien von T $\alpha$ T1 durchgeführt (n=3). Aktivitätsmessungen der 5`D in T $\alpha$ T1-Zellen nach Stimulation mit konditionierten Medien von TtT/GF und Zytokinen (IL-6, IL 1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) erfolgten in je zwei Versuchsreihen (n=2). Eine Einzelmessung wurde zur Prüfung der Selenabhängigkeit der 5`D-Expression in T $\alpha$ T1-Zellen und in der Kokultur mit TtT/GF-Zellen durchgeführt (n=1).

### 3. Ergebnisse

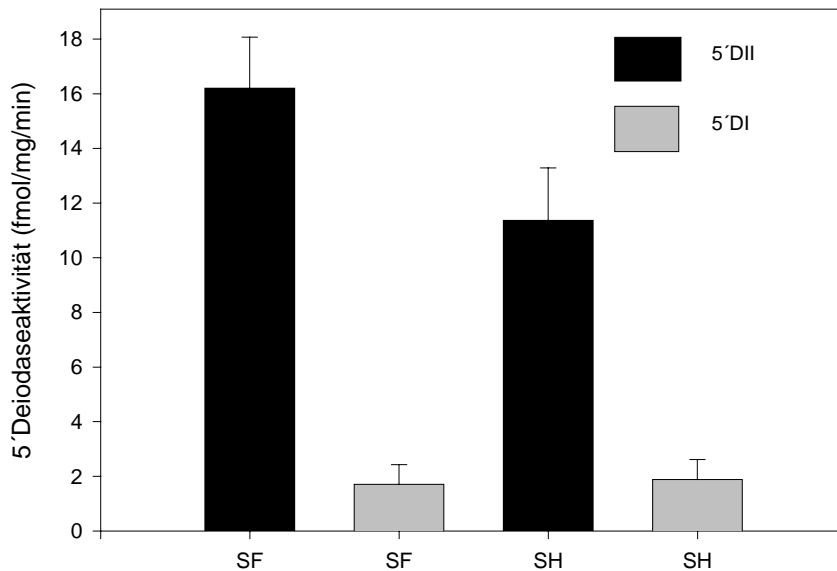
#### 3.1 Expression und Regulation der 5'-Deiodasen (D1 und D2) in T $\alpha$ T1-Zellen

T $\alpha$ T1-Zellen, die aus Hypophysentumoren transgener Mäuse etabliert wurden (Yusta *et al.*, 1998) sind kleine, polymorphe Zellen, die adhärent wachsen. Es handelt sich um thyrotrope Zellen der Adenohypophyse, die zur Zeit die einzige verfügbare klonale, voll-differenzierte Zelllinie dieser Art darstellen. Bisher ist bekannt, dass die Zellen die Rezeptoren TR  $\beta$ 1, TR  $\beta$ 2 und RXR  $\gamma$  exprimieren und bei Behandlung mit T3 eine dosis- und zeitabhängige Verminderung der Expression der mRNA der TSH  $\beta$  Untereinheit zeigen. In Kultur (DMEM-Medium) exprimieren sie nachweislich D1 und D2.

Im Folgenden wurden Abhängigkeiten der Aktivität der 5'-Deiodasen in den T $\alpha$ T1-Zellen von verschiedenen Stimulantien und Faktoren ermittelt. Tierexperimentelle Daten zeigen eine rasche Antwort der D1-Aktivität nach Stimulationen mit cAMP, LPS und Zytokinen. Je nach Tierspezies, Zytokintyp und Modell, konnte eine akut-Phasen-Reaktion der D1-Aktivität und der Expression deren mRNA gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde in zahlreichen anderen Versuchsmodellen, wie z.B. in der Plazentaentwicklung, eine Diskrepanz zwischen D2-Aktivität und deren mRNA-Expression festgestellt. Dies lässt darauf schließen, dass rasche Adaptationsvorgänge der D2-Aktivität auf posttranskriptioneller Ebene existieren. Daher wurden die Stimulationszeiten mit cAMP, LPS und Zytokinen in Anlehnung an bekannte Studienergebnisse entsprechend kurz gehalten.

##### 3.1.1 Nachweis der Deiodaseaktivität von T $\alpha$ T1-Zellen

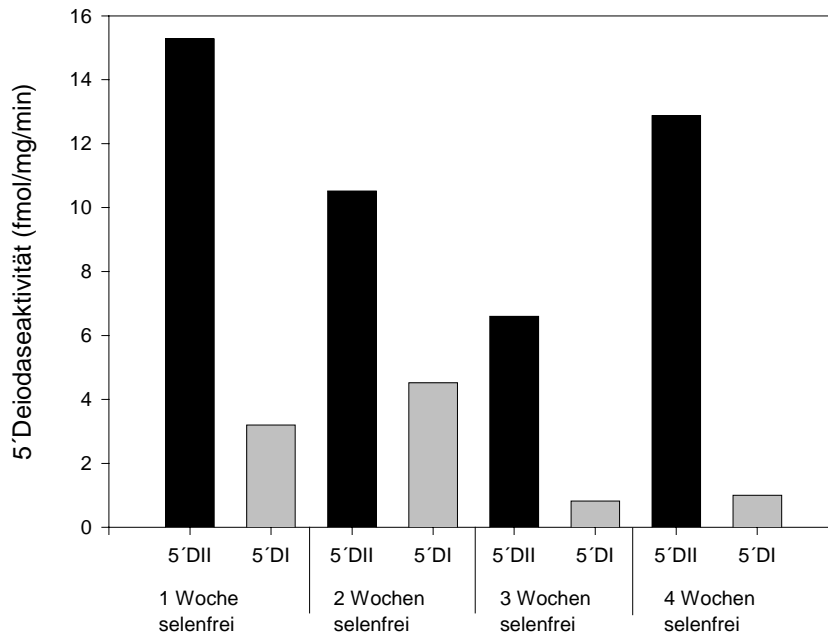
Zur Kontrolle der Bildung von 5'-Deiodasen in der Zelllinie T $\alpha$ T1 wurden unterschiedliche Kulturen mit in serumfreiem Medium und in serumhaltigem Medium (10% fetales Kälberserum) kultivierten Zellen über 24 Stunden hinweg angelegt. Ein Aktivitätsnachweis von D1 und D2 erfolgte in allen geernteten Zellproben. In serumfreien T $\alpha$ T1-Zellkulturen war die spezifische Aktivität der D2 höher als in serumhaltigen Kulturen (Abbildung 3.1). Die Aktivität der D1 war stets nur in niedrigen Bereichen messbar und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen serumfreien und serumhaltigen Kulturen (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Aktivität der D2 (schwarze Säulen) und der D1 (graue Säulen) in T $\alpha$ T1-Zellen** in mit serumfreiem (SF) DMEM-Medium und serumhaltigem (SH, mit 10% fetalem Kälberserum) DMEM-Medium über 24 h kultivierten Zellen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3).

### 3.1.2. Aktivität der 5'Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen in Abhängigkeit von Selen

Als Selenoproteine sind die Deiodaseisoenzyme in ihrer Expression vom Selenangebot der Umgebung abhängig. In der Literatur wird beschrieben, dass unter selenfreien Bedingungen die 5- und 5'Deiodasenexpression in manchen Geweben sinkt (Pallud *et al.*, 1997). Zur Abklärung, inwieweit die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1-Zellen vom Selenangebot im Nährmedium abhängig ist, wurden Kulturen mit selenfreien Nährmedien angelegt, über drei Wochen hinweg jeweils einmal pro Woche geerntet und die D1 und D2 im Deiodase-„assay“ bestimmt (Abbildung 3.2). Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Die Aktivitäten der Deiodasen zeigten sich von der Selenkonzentration im Nährmedium unabhängig. Die Enzymmessungen unterlagen lediglich den regulären Messschwankungen.



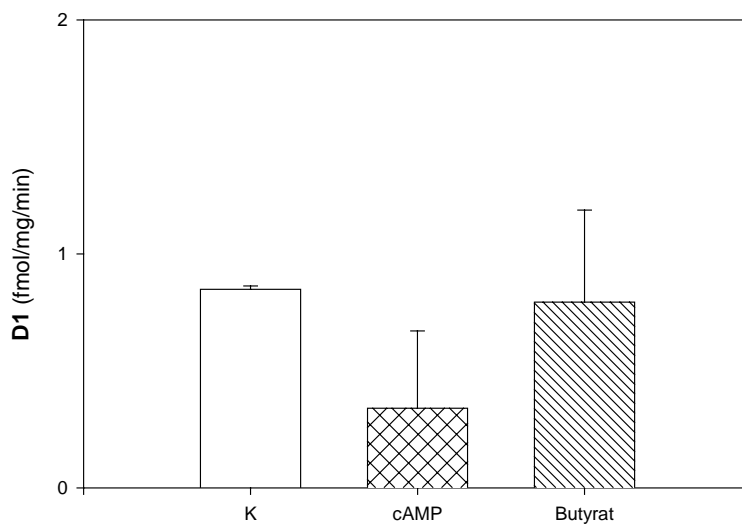
**Abbildung 3.2: Aktivität der D2 (schwarze Säulen) und D1 (graue Säulen) in T $\alpha$ T1-Zellen in Abwesenheit von Natriumselenit im DMEM-Nährmedium (n=1).**

### 3.1.3 Effekte von cAMP auf die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1-Zellen

Es ist bekannt, dass die Aktivität der Deiodaseisoenzyme durch cAMP beeinflusst werden kann. Z. B. reagieren Schilddrüsenzellkulturen von Patienten mit M. Basedow auf TSH- Stimulation mit einem Aktivitätsanstieg der 5- und 5`Deiodasen. Ein gleicher Effekt wird bei der Inkubation der Zellen mit (Bu)<sub>2</sub>cAMP erreicht (Ishii *et al.*, 1983). In Anwesenheit von selenhaltigem Nährmedium induziert die Applikation von 8-BromocAMP die gesteigerte Expression der mRNA der D2 in Astrogliazellen von Ratten (Pallud *et al.*, 1997). Studien mit der Rattenschilddrüsenzellreihe FRTL-5 zeigten einen TSH induzierten Anstieg der D1 mRNA, der auch mittels Stimulation der Zellen mit (Bu)<sub>2</sub>cAMP induziert werden konnte (Pekary AE *et al.*, 1994).

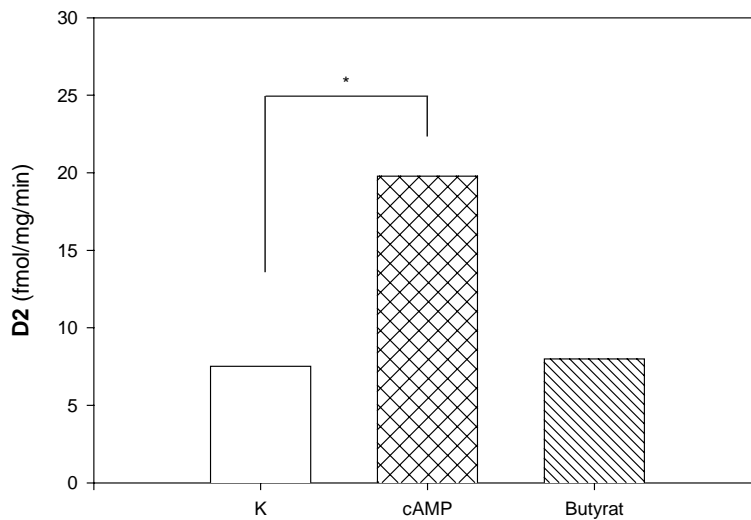


Ob die 5'-Deiodaseaktivitäten in der thyotropen Zelllinie T $\alpha$ T1 mittels cAMP (2-Dibutyryl-adenosine3,5-Cyclo-Monophosphate) beeinflusst werden können, wurde im Folgenden untersucht. In serumfreien Kulturen von T $\alpha$ T1-Zellen, die vier Tage vorkultiviert wurden, erfolgten Stimulationen mit cAMP (1 mM) über den Zeitraum von 6 Stunden. Als Kontrollen dienten butyratstimulierte (n-Buttersäure, 1 mM), sowie unbehandelte T $\alpha$ T1-Zellen. Die D1- Aktivität veränderte sich nicht signifikant unter dem Einfluss von cAMP und Butyrat (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Effekte von cAMP auf die D1 in T $\alpha$ T1- Zellen** über einen Zeitraum von 6 h. Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen vier Tage vorkultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Am Tag vier wurde dem Medium cAMP, Butyrat oder nichts (Kontrolle, K) zugefügt und die Zellen wurden nach 6 Stunden Stimulationszeit geerntet. Die Abbildung zeigt die Kontrolle (K, weiße Säule), (Bu)<sub>2</sub>cAMP- stimulierte Proben (cAMP, doppelschraffierte Säule) und die Butyratkontrolle (Butyrat, einzelschraffierte Säule). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3).

Dagegen führte eine Inkubation der T $\alpha$ T1-Zellen mit (Bu)<sub>2</sub>cAMP zu einer 3,4-fachen Stimulation der D2 im Vergleich zu beiden Kontrollen (Abbildung 3.4).

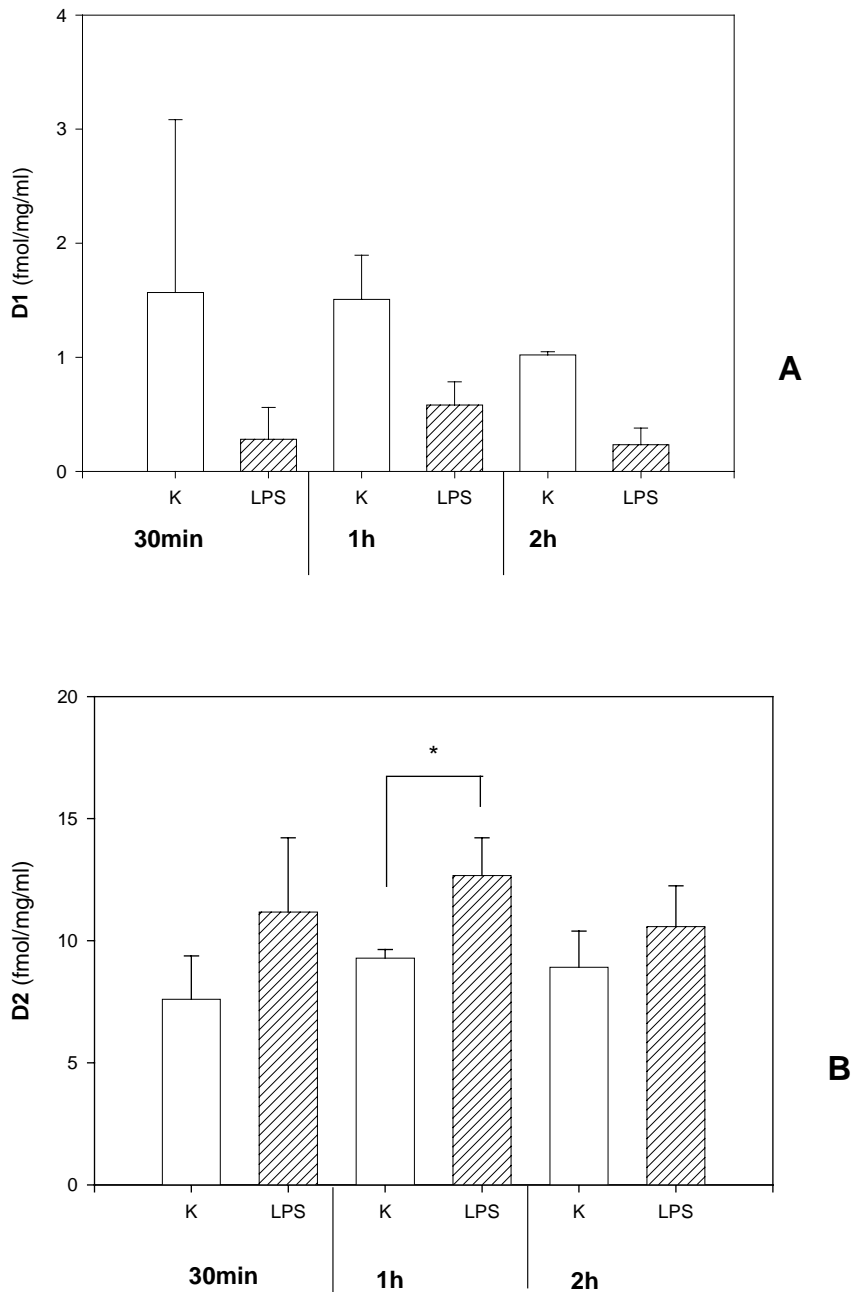


**Abbildung 3.4: Effekte von cAMP auf die D2 in T $\alpha$ T1- Zellen** über einen Zeitraum von 6 h. Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen vier Tage vorkultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Am Tag vier wurde dem Medium cAMP, Butyrat oder nichts (Kontrolle, K) zugefügt und die Zellen wurden nach 6 Stunden Stimulationszeit geerntet. Die Abbildung zeigt die Kontrolle (K, weisse Säule), (Bu)<sub>2</sub>cAMP- stimulierte Proben (cAMP, doppelt schraffierte Säule) und die Butyratkontrolle (Butyrat, einzelschraffierte Säule). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* angegeben: \*: p < 0,05.

### 3.1.4 Effekte von LPS auf die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1- Zellen

Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) werden im experimentellen Modell zur Induktion eines Infektzustandes verwendet. Sie stimulieren eine Zytokinbildung und Freisetzung, unter anderem auf Ebene der Adenohypophyse. Die proinflammatorischen Zytokine beeinflussen dort das Zellwachstum und die Hormonsynthese. Es konnte gezeigt werden, dass Zytokine auch Einfluss auf die hypophysären Deiodaseaktivitäten nehmen. Dabei ist das Ausmaß des eventuellen Zytokineinflusses auf die 5'-Deiodaseisoenzyme stark abhängig von Zelltyp, Spezies und Modell. Zur Untersuchung von LPS-Effekten auf die Aktivität der Typ I und Typ II 5'-Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen wurden diese in Zellkulturflaschen (Falcon, 25 cm<sup>2</sup>) bis zu einer hohen Zelldichte hin in serumhaltigem Medium (10% fetales Kälberserum) kultiviert. Dies dauerte durchschnittlich sieben Tage. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Dann wurde mit LPS (2  $\mu$ g/ml)

stimuliert und je nach gewünschter Stimulationsdauer nach 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden geerntet.



**Abbildung 3.5: Effekte von LPS (2 µg/ml) auf die D1 (A) und D2 (B) in TαT1-Zellen über die Zeiträume von 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden.** Die Zellen wurden unter serumhaltigen Bedingungen sieben Tage vorkultiviert, ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Die Abbildung zeigt unstimulierte Kontrollen (K, weiße Säulen) im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen (LPS, schraffierte Säulen). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=3).

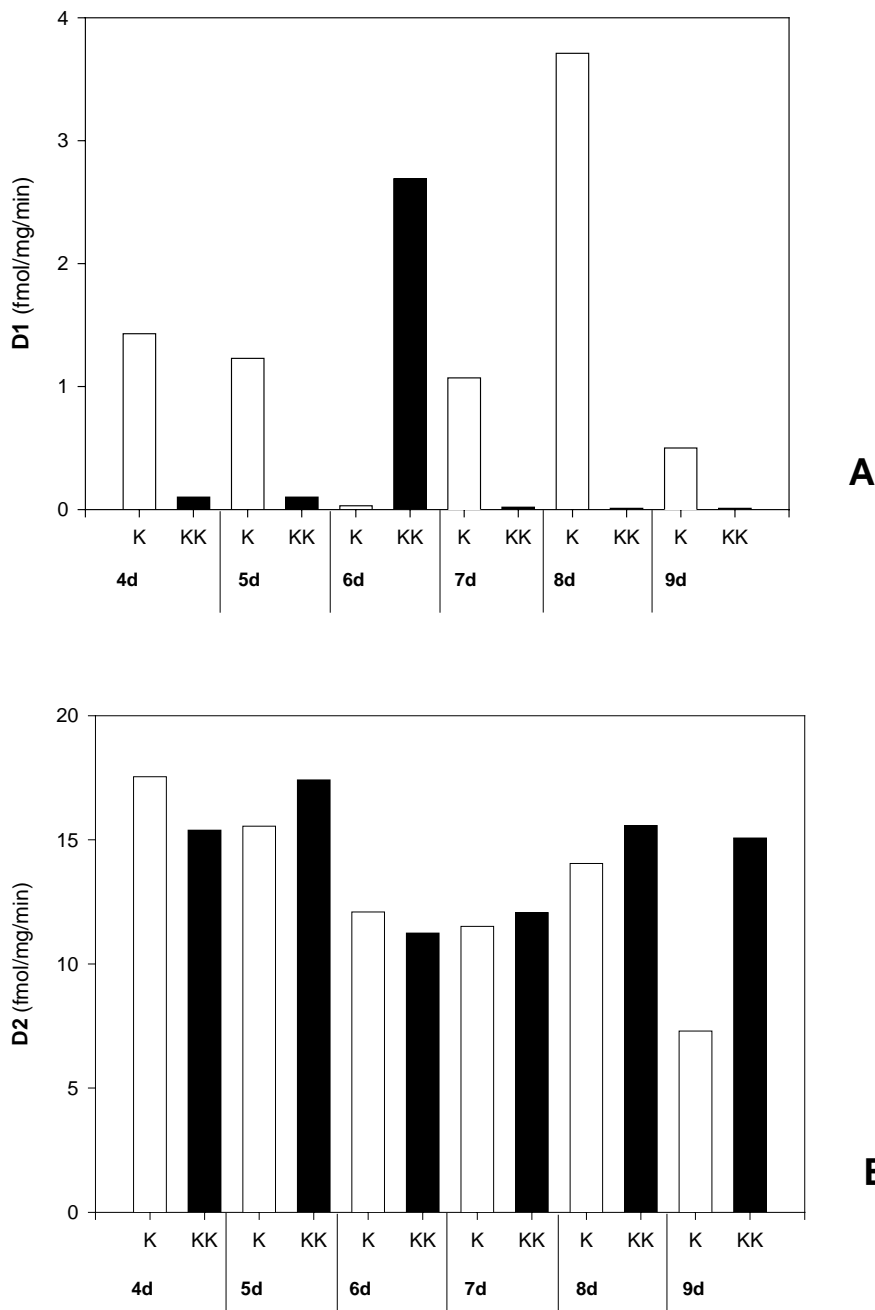
Als Kontrollen dienten unbehandelte  $T\alpha T1$ -Zellen. Die 30-minütige Inkubation mit LPS zeigte eine verminderte D1-Aktivität der  $T\alpha T1$ -Zellen gegenüber der Kontrolle (Abbildung 3.5, A). Gleiches ließ sich auch nach einer 1- und 2-stündigen Inkubationszeit beobachten. Im Gegensatz dazu wurde die D2 in den  $T\alpha T1$ -Zellen nach 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden durch LPS stimuliert (Abbildung 3.5, B), wobei der stimulierende Effekt nach einer 1-stündigen Inkubation signifikant und am größten war (vergleiche Säulen 2, 3 und 4).

### **3.1.5 Regulation der 5'Deiodasen im Zweikammer-Kokultursystem von $T\alpha T1$ -Zellen und TtT/GF-Zellen**

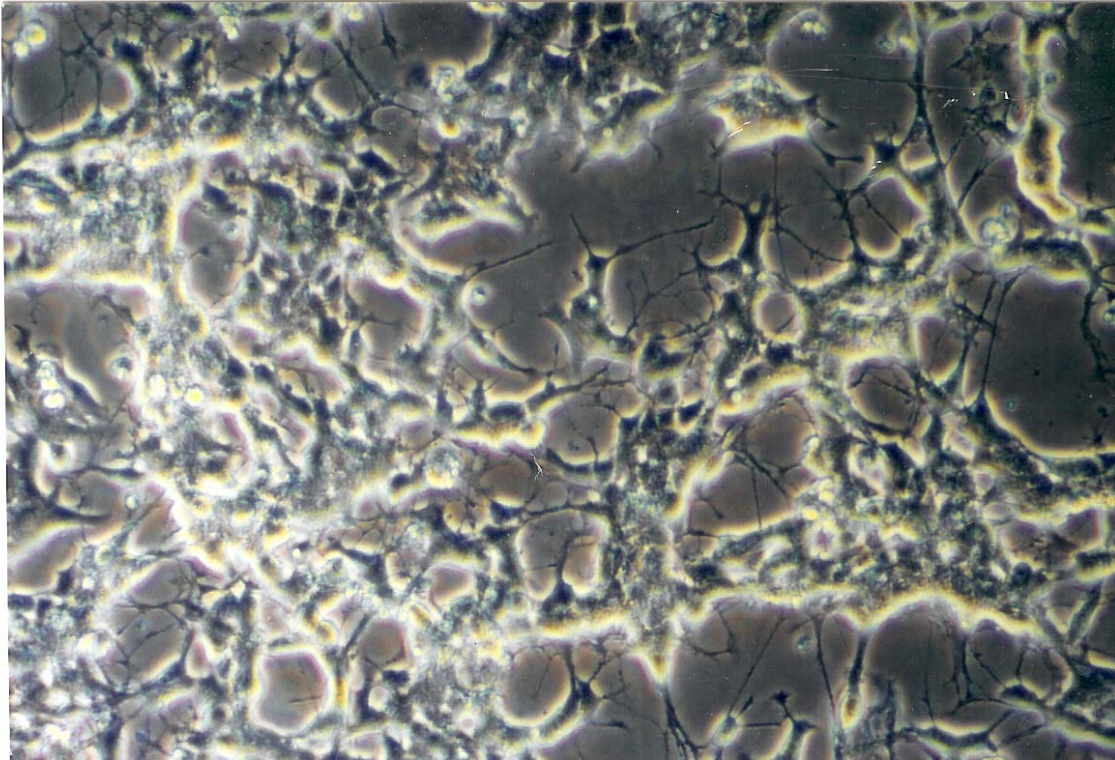
Eine wichtige Quelle der Zytokinbildung in der Adenohypophyse sind die nicht hormonbildenden Follikulostellarzellen. Sie produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren und beeinflussen eventuell auf parakrinem Weg die hormonbildenden Zellen. Inwieweit solche Zytokine auf die Deiodaseaktivität speziell in thyrotropen Zellen wirken, ist unklar. Als Modell für Follikulostellarzellen können die Zellen der Linie TtT/GF verwendet werden. Sie wurden aus thyrotropen Hypophysentumoren der TtTb Maus etabliert (Inoue *et al.*, 1992) und weisen charakteristische Merkmale von Follikulostellarzellen auf (keine Hormonbildung, phagozytotische Aktivität, Expression gliazellspezifischer Proteine, IL-6- Bildung). In Kultur bilden sie sternförmig verzweigte, adhärenzte Zellgruppen (Abbildung 3.7, siehe Seite 40). In TtT/GF-Zellen gibt es zudem keine nachweisbare Aktivität von D1, D2 und/oder D3.

Wurden  $T\alpha T1$ -Zellen in einem Zweikammer-Kokultur-System mit TtT/GF-Zellen gemeinsam kultiviert, zeigten sich zeitlich abhängige Aktivitätsunterschiede der 5'Deiodasen im Vergleich zu den alleine, aber unter vergleichbaren Umständen kultivierten  $T\alpha T1$ -Kontrollen. In serumhaltigem Nährmedium (10% fetales Kälberserum), welches alle drei Tage gewechselt wurde, wurden Kokulturen und Kontrollen angelegt und ab dem Tag vier bis neun wurde jeweils eine Versuchsreihe geerntet. So konnten D1- und D2-Aktivitätsmessung der  $T\alpha T1$ -Zellen alleine und aus Kokulturen mit TtT/GF-Zellen über einen Zeitraum von vier bis neun Tagen in ihrer Expression und Regulation beurteilt werden. In der Messung der D1-Aktivität zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, einige Werte sanken unter die Nachweisgrenze (Abbildung 3.6, A). Nach einer Kulturdauer bis zu 5 Tagen wiesen die Zellen eine geringere D2-Aktivität in den Kokulturen im Vergleich zu den Kontrollen auf

(Abbildung 3.6, B). Hingegen zeigten längere Inkubationen der T $\alpha$ T1-Zellen mit TtT/GF-Zellen über 7 Tage und darüber hinaus einen Aktivitätsanstieg der D2 in den Kokulturen im Vergleich zu den Kontrollen.



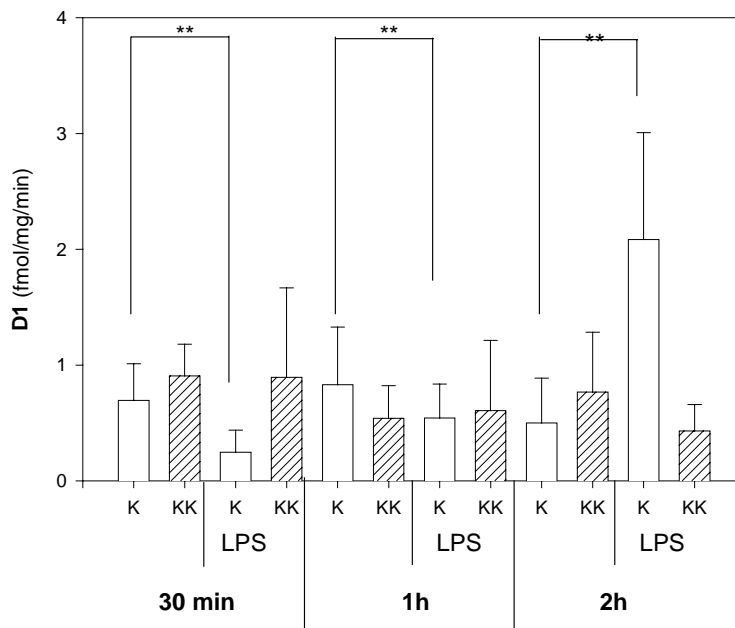
**Abbildung 3.6: Regulation der 5' Deiodasen (D1 A; D2 B) in T $\alpha$ T1-Zellen** alleine (K, weiße Säulen) und in Kokultur mit TtT/GF-Zellen (KK, schwarze Säulen) über die Zeiträume von 4 bis 9 Tagen. Es erfolgten keine Stimulationen. Kultur in serumhaltigen Nährmedium. Ein Mediumwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt (n=1).



**Abbildung 3.7: TtT/GF-Zellen**

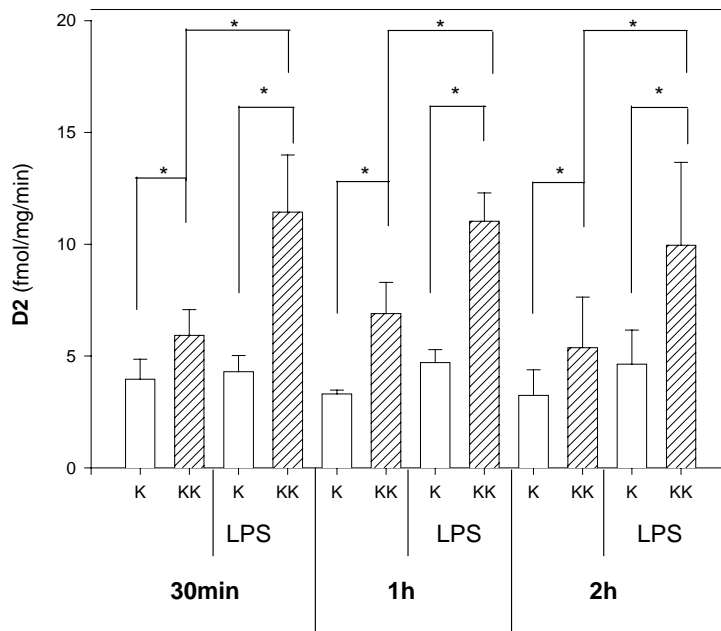
### **3.1.6 Effekte von LPS auf die Deiodaseaktivität im T $\alpha$ T1-TtT/GF-Kokultursystem**

Die Anordnung der Zelllinien T $\alpha$ T1 und TtT/GF im Zweikammer-Kokultur-System ermöglichte eine Zellkommunikation über lösliche Faktoren, die ins gemeinsame Medium abgegeben wurden. Die Kokulturen und dazugehörigen Kontrollen (T $\alpha$ T1-Zellen unter identischen Bedingungen kultiviert) wurden bis zum Erreichen einer hohen Zelldichte über fünf Tage hinweg mit serumhaltigen Medium kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde jeden dritten Tag durchgeführt. Die Stimulation mit LPS (2  $\mu$ g/ml) erfolgte zum einen in den TtT/GF-Zellen der Kokultur, zum anderen direkt in den alleine kultivierten T $\alpha$ T1-Zellen und dauerte jeweils 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden. Die Aktivität der D1 zeigte in den T $\alpha$ T1-Zellen der Kokultur ohne und mit LPS-Stimulation keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 3.8). Allerdings ließ sich in den alleine kultivierten T $\alpha$ T1- Kontrollen unter LPS-Stimulation eine signifikante Verminderung der D1-Aktivität nach einer Stimulationszeit von 30 min und 1 Stunde, bzw. eine signifikante D1-Aktivitätszunahme nach 2 Stunden beobachten (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: Effekte von LPS (2 µg/ml) auf die D1 in TαT1-Zellen** in Kokultur mit TtT/GF- Zellen (KK, schraffierte Säulen) und Kontrollen (K, weiße Säulen) über fünf Tage. Ein Mediumwechsel wurde jeden dritten Tag durchgeführt. Die Stimulationsversuche erfolgten über 30 min, 1 h und 2 h. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede sind als \*\* gekennzeichnet: \*\*: p < 0,05.

Im Aktivitätsverlauf der D2 zeigte sich zu allen drei Inkubationszeiten das gleiche Bild (Abbildung 3.9): Die Aktivität der D2 in den alleine kultivierten TαT1-Zellen war gegenüber der der kokultivierten Zellen minimal erniedrigt (durchschnittlich um Faktor 0,7). Die Aktivität der D2 in der Kokultur, in der die TtT/GF-Zellen mit LPS behandelt wurden, war gegenüber den direkt mit LPS stimulierten TαT1-Zellen erhöht. Dabei nahm die Aktivitätssteigerung mit zunehmender Inkubationsdauer von Faktor 2,3 auf Faktor 2,1 und Faktor 1,6 ab.



**Abbildung 3.9: Effekte von LPS (2 µg/ml) auf die D2 in TαT1-Zellen** in Kokultur mit TtT/GF- Zellen (KK, schraffierte Säulen) und Kontrollen (K, weiße Säulen) über fünf Tage. Ein Mediumwechsel wurde jeden dritten Tag durchgeführt. Die Stimulationsversuche erfolgten über 30 min, 1 h und 2 h. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM (n=3). Statistisch signifikante Unterschiede sind als \* gekennzeichnet: \*: p < 0,05.

### 3.1.7 Effekte von LPS auf die Deiodaseaktivität in TαT1-Zellen, die mit vorkonditionierten Medien von TtT/GF- Zellen behandelt wurden

Zur Untersuchung, ob TtT/GF-Zellen alleine oder unter LPS-Einfluß lösliche Faktoren (z.B. Zytokine) bilden, die die Deiodaseaktivität in TαT1-Zellen beeinflussen, wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Hierzu wurden TtT/GF-Zellen in serumhaltigem Medium bis zum Erreichen einer hohen Zelldichte für fünf Tage vorkultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Dann wurden die Zellen mit LPS (2 µg/ml) über verschiedene Zeiträume stimuliert, das Medium zu 100% isoliert und damit die TαT1-Zellen, die ihrerseits fünf Tage bis zum Erreichen einer hohen Zelldichte vorkultiviert wurden (Mediumwechsel jeden dritten Tag), wieder unterschiedlich lange inkubiert (Tabelle 3.1 siehe Seite 43). Als Kontrollen wurden TαT1-Zellen mit 100% auf TtT/GF- Zellen vorkonditionierten Medien ohne LPS-Stimulation inkubiert, sowie TαT1-Zellen direkt mit LPS (2 µg/ml serumhaltiges Medium) stimuliert.

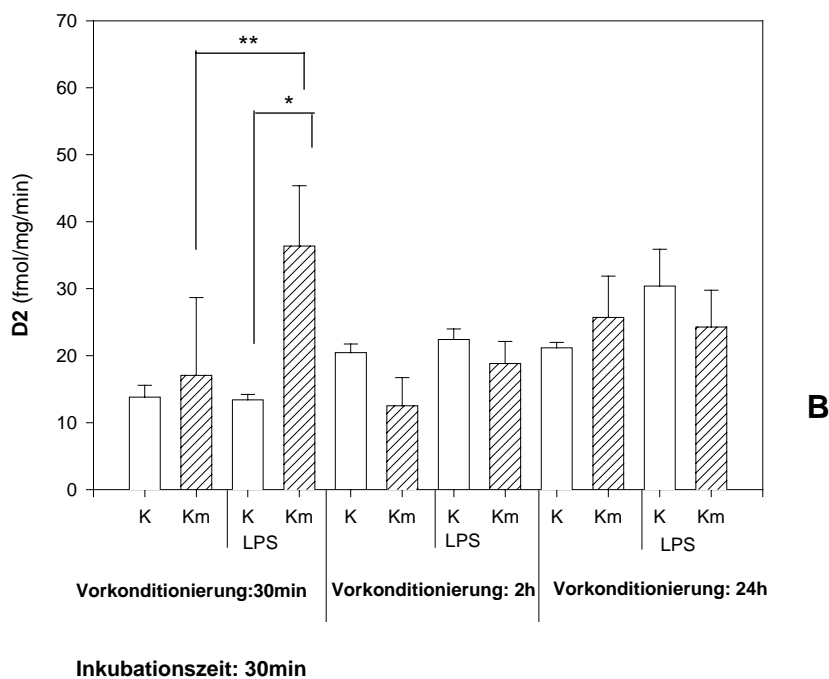
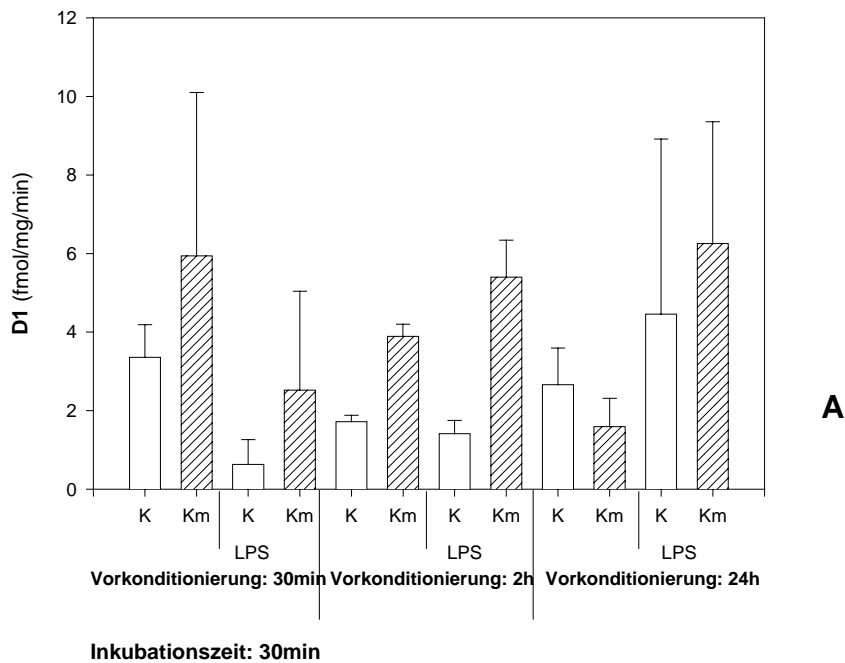


	<b>Versuchsreihe A</b>	<b>Versuchsreihe B</b>
<b>Vorkonditionierungszeit</b> des Mediums auf TtT/GF- Zellen	30min 2h 24h	30min
<b>Inkubationszeit</b> des vorkonditionierten Mediums auf T $\alpha$ T1-Zellen	30min	30min 2h 24h

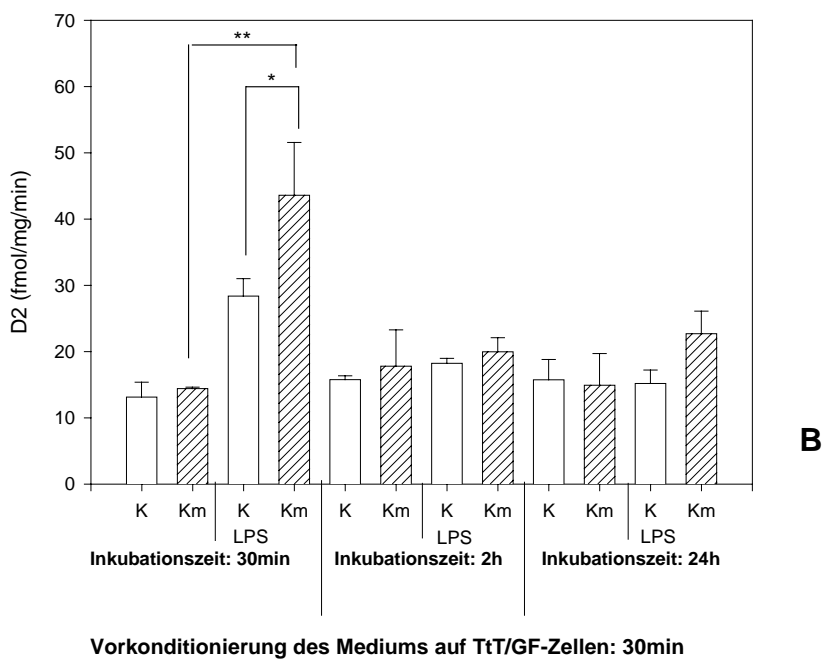
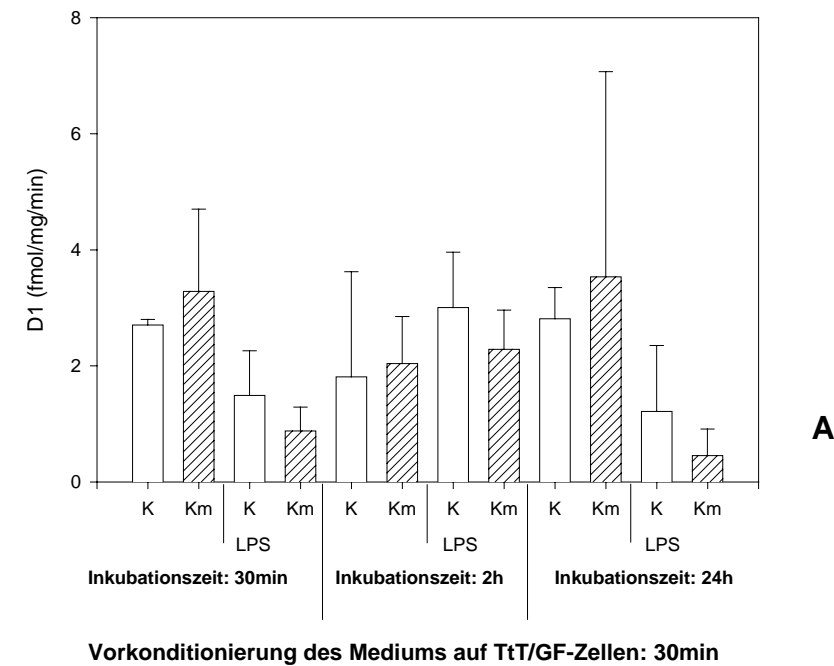
**Tabelle 3.1: Beschreibung der verschiedenen Versuchsreihen** zur Testung von Effekten von LPS auf die Deiodaseaktivitäten in T $\alpha$ T1-Zellen, die mit vorkonditionierten Medien von TtT/GF-Zellen behandelt wurden. In der Versuchsreihe A wurden Nährmedien von TtT/GF-Zellen über verschiedene Zeiträume hinweg vorkonditioniert (30min, 2h, 24h), um dann je 30min mit T $\alpha$ T1-Zellen inkubiert zu werden. In der Versuchsreihe B wurden Nährmedien von TtT/GF-Zellen für je 30min vorkonditioniert, um dann über verschiedene Zeiträume hinweg (30min, 2h, 24h) mit T $\alpha$ T1-Zellen inkubiert zu werden.

**In der Versuchsreihe A** waren die Aktivitäten der D1 z.T. sowohl unter Stimulation mit konditioniertem TtT/GF-Medium, als auch unter Stimulation mit LPS-konditioniertem TtT/GF-Medium im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, die Stimulationen führten jedoch nicht zu signifikanten Änderungen (Abbildung 3.10, A). Die Aktivität der D2 wurde nach 30-minütiger Inkubation mit LPS-konditioniertem TtT/GF-Medium erhöht (Abbildung 3.10, B, Säule 4). Im Vergleich zur Stimulation mit konditioniertem Medium betrug diese Aktivitätssteigerung den Faktor 2, im Vergleich zur direkten Stimulation der T $\alpha$ T1-Zellen mit LPS dagegen den Faktor 2,3. Die Inkubationen über 2- und 24-Stunden führten zu keiner signifikanten Aktivitätssteigerung der D2.

**In der Versuchsreihe B** wurde wie in der Versuchsreihe A die Aktivität der D1 nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 3.11, A). Die Aktivität der D2 zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf wie in der Versuchsreihe A (Abbildung 3.11, B). Auch hier wurde eine Steigerung der D2-Aktivität bei gleichzeitigem Vorhandensein von LPS-konditioniertem TtT/GF-Medium (um Faktor 3 im Vergleich zur Stimulation mit konditioniertem Medium, um Faktor 1,5 im Vergleich zur direkten Stimulation der T $\alpha$ T1-Zellen) deutlich.



**Abbildung 3.10: Effekte von LPS (2  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die D1 (A) und die D2 (B) in T $\alpha$ T1-Zellen alleine (K, weiße Säulen) und unter Behandlung mit konditionierten Medien (Km, schraffierte Säulen) der TtT/GF-Zellen nach dem Schema der **Versuchsreihe A** (Tabelle 3.1). Vor den Stimulationsversuchen wurden beide Zellreihen für fünf Tage bis zum Erreichen einer bestimmten Zelldichte vorkultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=2). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* angegeben: \* :  $p < 0,025$ , \*\*:  $p < 0,006$ .**



**Abbildung 3.11: Effekte von LPS (2  $\mu$ g/ml) auf die D1 (A) und die D2 (B) in T $\alpha$ T1-Zellen alleine (K, weiße Säulen) und unter Behandlung mit konditionierten Medien (Km, schraffierte Säulen) der TtT/GF- Zellen nach dem Schema der **Versuchsreihe B** (Tabelle 3.1). Vor den Stimulationsversuchen wurden beide Zellreihen für fünf Tage bis zum Erreichen einer bestimmten Zelldichte vorkultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=2). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit \* angegeben: \* $p$  < 0,025, \*\* $p$  < 0,006.**

### **3.1.8 Effekte proinflammatorischer Zytokine auf die Deiodaseaktivität von $T\alpha T1$ -Zellen alleine und in Kokulturen mit TtT/GF-Zellen**

Zur Untersuchung, ob TtT/GF-Zellen Zytokine oder andere Faktoren bilden, die die Deiodaseaktivitäten in  $T\alpha T1$ -Zellen beeinflussen, wurden beide Zelltypen in einem Zweikammer-System kokultiviert. Bis zum Erreichen der für die Versuche erforderlichen Zelldichte dauerte es sieben Tage. Ein Wechsel des serumhaltigen (10% fetales Kälberserum) Nährmediums erfolgte alle drei Tage. Als Kontrolle wurden  $T\alpha T1$ -Zellen unter gleichen Bedingungen, aber ohne TtT/GF-Zellen kultiviert.

Zur Analyse der Wirkung einzelner Zytokine auf  $T\alpha T1$ - und TtT/GF-Zellen wurden diese im Kokultursystem mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 in unabhängigen Versuchsreihen stimuliert. Die Stimulation erfolgte zum einen in den TtT/GF-Zellen der Kokultur, zum anderen direkt in den  $T\alpha T1$ -Kontrollen.

#### **3.1.8.1 Effekte von IL-1 $\beta$ auf die Deiodaseaktivität im $T\alpha T1$ -TtT/GF-Kokultursystem**

Die Messungen der D1-Aktivität in den  $T\alpha T1$ -Zellen der Versuchsreihe zeigten starke Schwankungen, wodurch die Ergebnisse der Behandlung der Zellen mit IL-1 $\beta$  (0,1 ng/ml) in serumhaltigem Medium über den Zeitraum von 30 Minuten und 24 Stunden (Abbildung 3.12, A) in Kontrollen und Kokultur nicht signifikant waren. Eine 30-minütige und 24-stündige Inkubation mit IL-1 $\beta$  zeigte keinen Einfluss auf die D2-Aktivität in  $T\alpha T1$ -Zellen (Abbildung 3.12, B), sowohl in den alleine kultivierten, als auch in den kokultivierten Zellen. Zu beobachten ist eine D2-Aktivitätsverminderung in den kokultivierten  $T\alpha T1$ -Zellen im Vergleich zu den Kontrollaktivitäten.

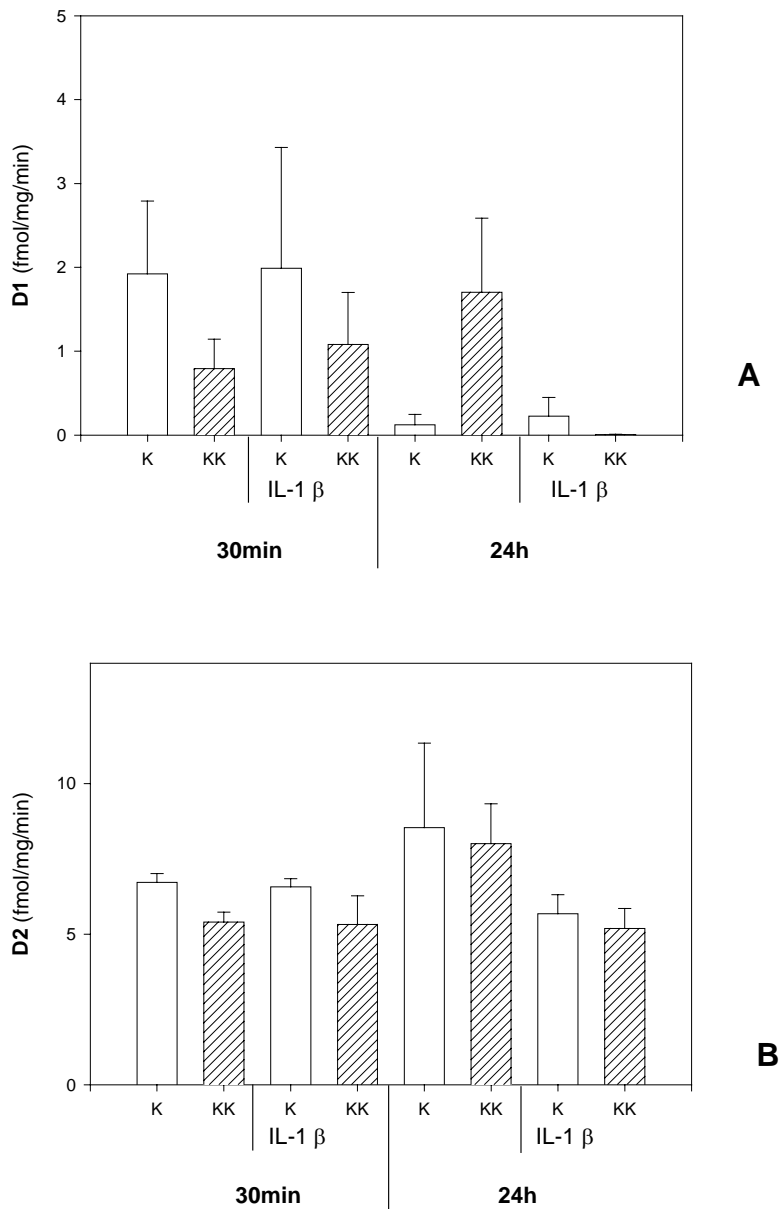
#### **3.1.8.2 Effekte von TNF $\alpha$ auf die Deiodaseaktivität im $T\alpha T1$ -TtT/GF-Kokultursystem**

In einer anderen Reihe von Experimenten wurden die Kulturen mit TNF $\alpha$  (0,1 ng/ml) in serumhaltigem Medium über die Zeiträume von 30 Minuten und 24 Stunden behandelt. Auch hier zeigten sich in den Messungen der D1-Aktivitäten unrelevante Werteschwankungen (Abbildung 3.13, A). Die D2 in  $T\alpha T1$ -Zellen wurde unabhängig von der An- und Abwesenheit der TtT/GF-Zellen durch die Stimulation mit TNF $\alpha$  über 30 Minuten und 24 Stunden nicht verändert. Allerdings zeigte sich wiederum eine

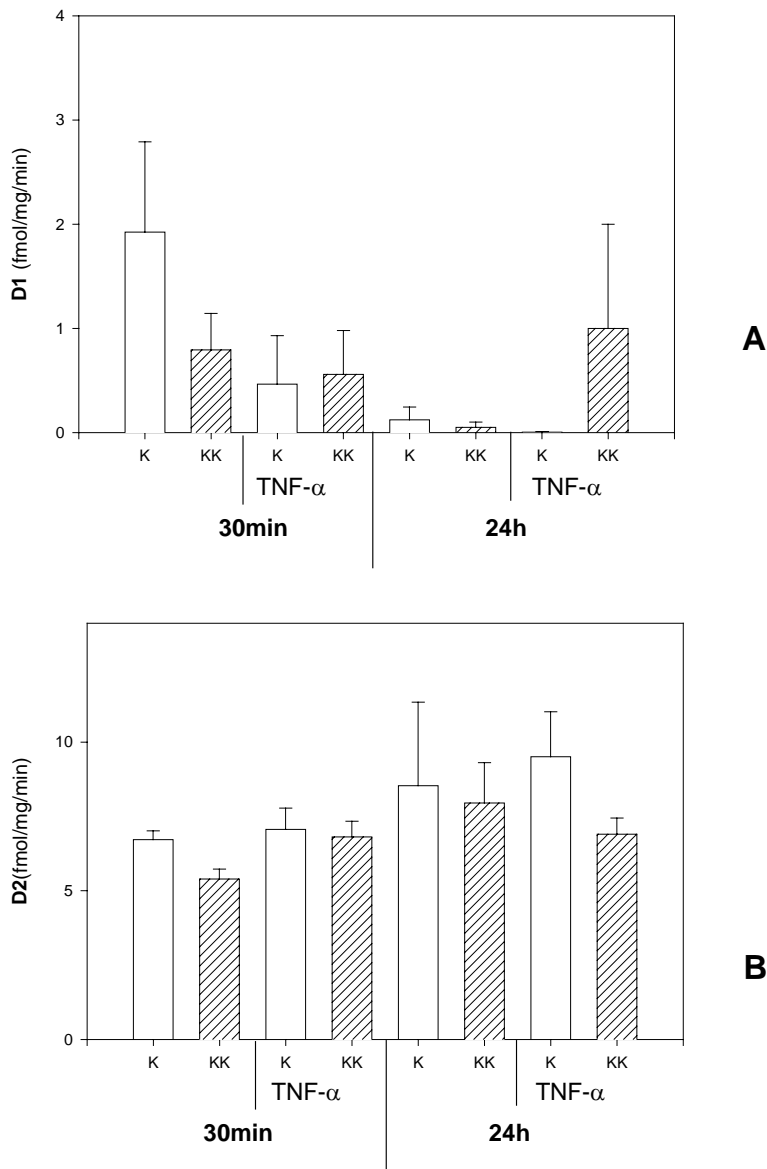
leichte Aktivitätsverminderung der D2 in den Kokulturen im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3.13, B).

### **3.1.8.3 Effekte von IL-6 auf die Deiodaseaktivität im T $\alpha$ T1-TtT/GF-Kokultursystem**

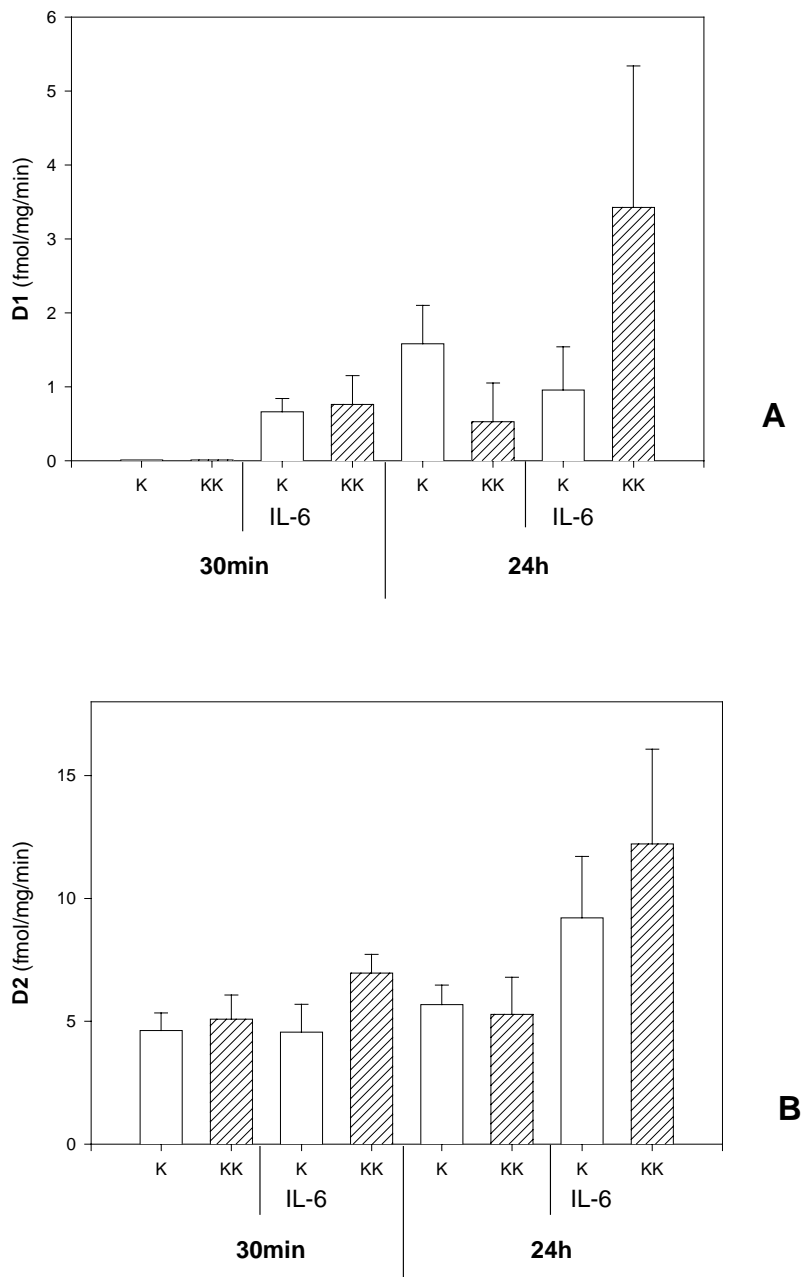
Die 30-minütige und 24-stündige Inkubation des Kontroll-Kokultur-Systems mit dem Zytokin IL-6 (0,1 ng/ml) in serumhaltigen Medium hatte keinen sichtbaren Einfluß auf die D1 (Abbildung 3.14, A), deren Aktivität z.T. unter der Nachweisgrenze lag. Die D2 zeigte nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten weder bei den T $\alpha$ T1-Zellen alleine noch in der Kokultur mit TtT/GF-Zellen eine deutliche Minderung oder Steigerung ihrer Aktivität (Abbildung 3.14, B). Allerdings wurde die D2 nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden durch IL-6 sowohl in der Kontrolle, als auch in der Kokultur stimuliert (Säulen 7 und 8). Verglichen mit den nicht mit IL-6 behandelten Proben (Säulen 5 und 6), wurde die Aktivität der sich in Kokultur befindenden T $\alpha$ T1-Zellen um ein 2,5 faches erhöht, während sich die Aktivität der T $\alpha$ T1-Zellen, die ohne TtT/GF-Zellen kultiviert wurden, nur um ein 1,3 faches erhöhte.



**Abbildung 3.12: Effekte von IL-1 $\beta$  (0,1 ng/ml) auf die D1 (A) und D2 (B) in T $\alpha$ T1-Zellen in Kokultur mit TtT/GF-Zellen (KK, schraffierte Säulen) und Kontrolle (K, weiße Säulen), die sieben Tage vorkultiviert wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Die Stimulationsreihe erfolgte über 30 min und 24 h. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=2).**



**Abbildung 3.13: Effekte von TNF $\alpha$  (0,1 ng/ml) auf die D1 (A) und auf die D2 (B) in T $\alpha$ T1-Zellen in Kokultur mit TtT/GF- Zellen (KK, schraffierte Säulen) und Kontrolle (K, weiße Säulen), die sieben Tage vorkultiviert wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag.. Die Stimulationsreihe erfolgte über 30 min und 24 h. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM (n=2).**



**Abbildung 3.14: Effekte von IL-6 (0,1 ng/ml) auf die D1 (A) und D2 (B) in T $\alpha$ T1-Zellen in Kokultur mit TtT/GF-Zellen (KK, schraffierte Säulen) und Kontrolle (K, weiße Säulen), die sieben Tage vorkultiviert wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag. Die Stimulation erfolgte über 30 min und 24 h. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=2).**



### 3.2 Effekte von T $\alpha$ T1-Zellen auf TtT/GF-Zellen

Im Rahmen der Untersuchung von Zytokineffekten im Bereich der intrahypophysären Achse zwischen Follikulostellarzellen und thyrotropen Zellen wurden im Folgenden die Einflüsse von thyrotropen Zellen auf Follikulostellarzellen am Beispiel der T $\alpha$ T1-TtT/GF-Zellmodelle geprüft.

#### 3.2.1 Nachweis der IL-6 Bildung im TtT/GF- T $\alpha$ T1-Kokultursystem

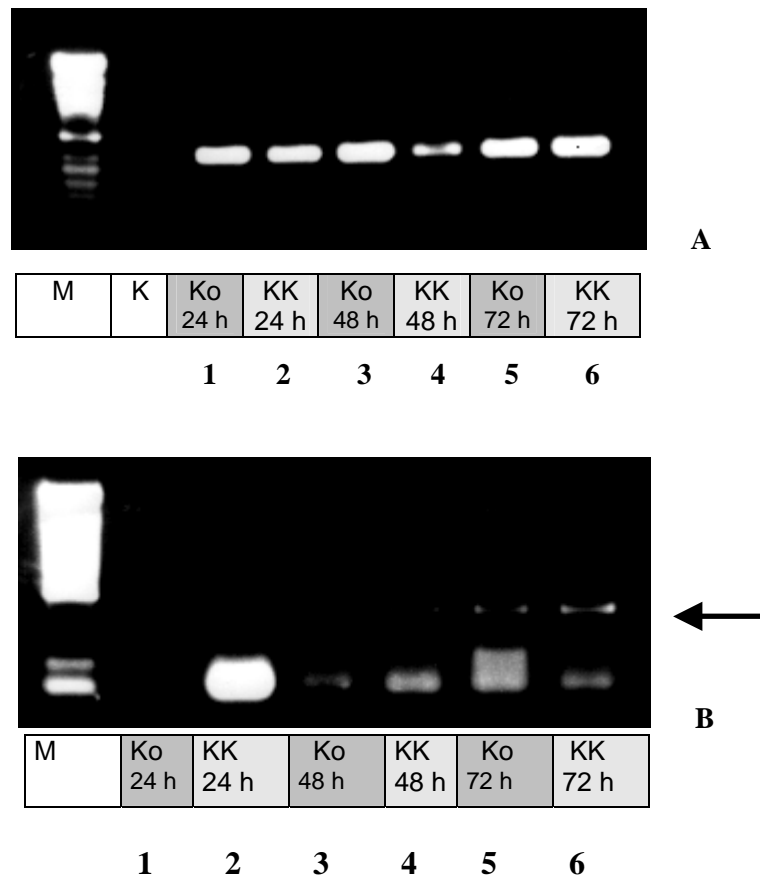
Um Effekte von T $\alpha$ T1- auf TtT/GF-Zellen in einem Kokultursystem zu untersuchen, wurden diese über 24, 48 und 72 Stunden hin angelegt und die TtT/GF-Zellen auf die Bildung von IL-6 in einer RT-PCR untersucht. Als Kontrolle dienten alleine kultivierte TtT/GF-Zellen, die gleichen Bedingungen unterlagen wie die Zellen in der Kokultur. Zur PCR-Kontrolle wurde parallel eine Aktin-PCR durchgeführt. Eine genaue Versuchsbeschreibung kann der Tabelle 3.2 entnommen werden.

Versuchsprobe	Art der Kultur	Zeit der Ernte
1	Kontrolle (TtT/GF alleine)	24 Stunden nach Anlage der Kontrolle
2	Kokultur (TtT/GF + T $\alpha$ T1)	24 Stunden nach Anlage der Kokultur
3	Kontrolle (TtT/GF alleine)	48 Stunden nach Anlage der Kontrolle
4	Kokultur (TtT/GF + T $\alpha$ T1)	48 Stunden nach Anlage der Kokultur
5	Kontrolle (TtT/GF alleine)	72 Stunden nach Anlage der Kontrolle
6	Kokultur (TtT/GF + T $\alpha$ T1)	72 Stunden nach Anlage der Kokultur

**Tabelle 3.2: Versuchsaufbau von T $\alpha$ T1 und TtT/GF- Zellen im Kokultursystem**

Die Zellen wurden im Zweikammer-Kokultursystem zum gleichen Zeitpunkt ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet.

Während die Aktin-PCR in allen Proben spezifische Signale zeigte (421 Basenpaare) (Abbildung 3.15, A), war in der IL-6-PCR nur in der über 72 Stunden kokultivierten Probe ein Signal nachweisbar (478 Basenpaare) (Abbildung 3.15, B, mit dem Pfeil markiert). Die zugehörige Kontrollprobe zeigte allerdings auch eine Bande. Die über 24 und 48 Stunden hinweg kultivierten Kontrollen und kokultivierten Proben zeigten keine Banden.



**Abbildung 3.15: RT-PCR-Nachweis von Aktin (A) und IL-6 (B) in TtT/GF-Zellen, die sich in einer Kokultur mit T $\alpha$ T1-Zellen befanden.**(n=3)

**M:** Marker ; **K:** Kontrolle (Laufpuffer ohne template); **Ko:** Kontrollprobe (TtT/GF-Zellen ohne T $\alpha$ T1-Zellen kultiviert); **KK:** Kokulturprobe (TtT/GF-Zellen in Kokultur mit T $\alpha$ T1-Zellen);

**Zeitangaben (24 h, 48 h, 72 h):** Dauer der Kokultur, bzw. Kontrollkultivierung;

**Zahlenreihen (1-6):** s. Erläuterungen Tabelle 3.2.

**Pfeilmarkierung in Abbildung B:** IL-6-Signal nachweisbar (478 Basenpaare)

### 3.2.2 Nachweis der IL-6 Bildung in TtT/GF-Zellen, die mit konditionierten Medien von T $\alpha$ T1-Zellen behandelt wurden

In mehreren Versuchsreihen wurden TtT/GF-Zellen über 24 Stunden mit verschiedenen behandelten Medien ( Tabelle 3.3) stimuliert und mittels RT-PCR auf ihre Bildung von IL-6 untersucht. Als PCR- Kontrolle diente wiederum die Aktin-PCR.

Versuchsprobe	Medium	Zusatz
1	DMEM low glucose, serumhaltig	
2	DMEM low glucose, serumhaltig	20% DMEM high glucose, serumhaltig*
3	DMEM low glucose, serumhaltig	20% vorkonditioniertes Medium AtT20**
4	DMEM low glucose, serumhaltig	10% vorkonditioniertes Medium T $\alpha$ T1***
5	DMEM low glucose, serumhaltig	20% vorkonditioniertes Medium T $\alpha$ T1***
6	DMEM low glucose, serumhaltig	LPS (2 $\mu$ g/ml)

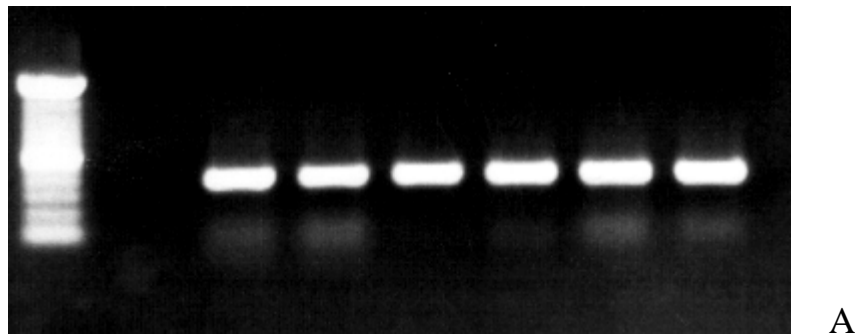
**Tabelle 3.3: Stimulationsversuche der TtT/GF-Zellen mit vorkonditionierten Medien.**

\*:DMEM high glucose Medium wurde zuvor über 24 Stunden in einer mit Matri-Gel beschichteten Flasche belassen, um einen Matri-Gel-Effekt auszuschließen.

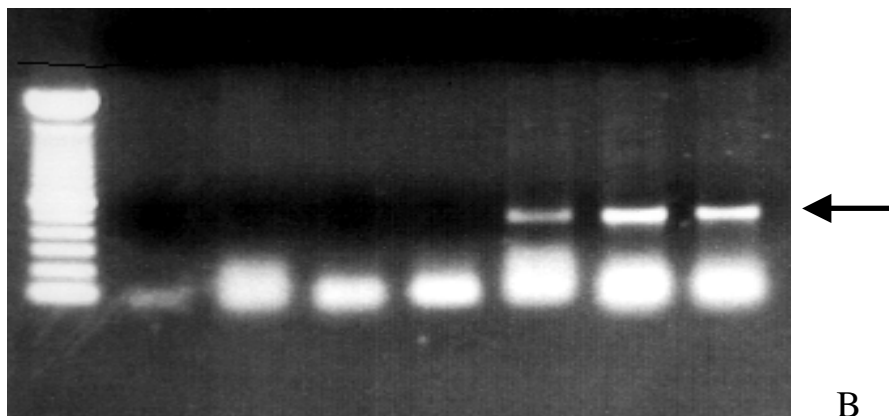
\*\* :DMEM high glucose Medium wurde zuvor über 24 Stunden auf AtT20-Zellen (kortioktrophe Zelllinie der Mausadenohypophyse) zur Kontrolle einer anderen Hypophysenzellgruppe belassen.

\*\*\*: DMEM high glucose Medium wurde zuvor über 24 Stunden auf T $\alpha$ T1-Zellen belassen.

Bei den verschiedenen stimulierten TtT/GF-Zellen ergaben sich in der Aktin-PCR spezifische Signale in der erwarteten Größe von 421 Basenpaaren (Abbildung 3.18, A). Hingegen zeigten sich in der IL-6-PCR nur in der Proben der Versuche 4,5 und 6 spezifische IL-6 Signale mit einer Größe von 478 Basenpaaren (Abbildung 3.16, B, mit dem Pfeil markiert). Demnach gelang ein IL-6-Nachweis in den TtT/GF-Zellen nach einer Stimulation mit verschiedenen konzentrierten, auf T $\alpha$ T1-Zellen vorkonditionierten Medien und LPS (Abbildung 3.16, B). Negativ blieben die Stimulation mit auf AtT20 vorkonditioniertem Medium und reinem high und low glucose DMEM-Medium.



M	K	LG	LG +20% HG	LG +20% KM AtT20	LG +10% KM T $\alpha$ T1	LG +20% KM T $\alpha$ T1	LG +LPS
		1	2	3	4	5	6



M	K	LG	LG +20% HG	LG +20% KM AtT20	LG +10% KM T $\alpha$ T1	LG +20% KM T $\alpha$ T1	LG +LPS
		1	2	3	4	5	6

**Abbildung 3.16: RT-PCR-Nachweis von Aktin (A) und IL-6 (B) in TtT/GF-Zellen, die mit konditionierten Medien von T $\alpha$ T1-Zellen behandelt wurden. (n=3)**

**M:** Marker ; **K:** Kontrolle (Laufpuffer ohne template); **LG:** DMEM low glucose Medium; **HG:** DMEM high glucose Medium; **KM:** Konditioniertes Medium; **AtT20, T $\alpha$ T1:** Zelllinien;  
**Zahlenreihen (1-6):** s. Erläuterungen Tabelle 3.2

**Pfeilmarkierung in Abbildung B:** IL-6-Signal nachweisbar (478 Basenpaare)

## 4. Diskussion

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben, dass die Zellen der Linie T $\alpha$ T1, die als Modell hypophysärer thyrotroper Zellen dienen, die Deiodaseisoenzyme D1 und D2 bilden, deren Aktivität durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann. Unter dem Aspekt der intrahypophysären Zell-Zell-Kommunikation wurden Aktivitätsänderungen der Deiodasen der T $\alpha$ T1-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulationsversuchen und Kokulturen mit TtT/GF-Zellen, die als Modell für Follikulostellarzellen beschrieben sind, untersucht. Im Interesse standen Veränderungen unter den Aspekten von parakrinen Regulationsmechanismen.

Im Folgenden soll anhand der durchgeführten Versuchsergebnisse aufgezeigt werden, in wie weit die Aktivität der Deiodaseisoenzyme der T $\alpha$ T1-Zellen durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann und welche Zusammenhänge dafür denkbar sind. Des Weiteren werden die Ergebnisse der Einflüsse von thyrotrophen Zellen auf Follikulostellarzellen und umgekehrt, am Beispiel der T $\alpha$ T1-TtT/GF-Zellmodelle diskutiert.

### 4.1 Expression der 5'-Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass T $\alpha$ T1-Zellen die 5'-Deiodasen Typ I und Typ II bilden, wobei die spezifische Aktivität der D2 stets höher gemessen wurde als die der D1, die meist nur schwach messbar war und in einigen Versuchen sogar unter der Nachweisgrenze lag. Im Vergleich zu anderen Hypophysenzelllinien wie z.B. GH3-, GX- und AtT20-Zellen, bei denen die D1 das vorherrschende Enzym darstellt, scheint in T $\alpha$ T1-Zellen die D2 verstärkt exprimiert zu werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass in T $\alpha$ T1-Zellen die D2 durch Transkriptions- und andere Faktoren, u.a. Zytokine, verstärkt exprimiert wird. Es könnte aber auch sein, dass die verstärkte D2-Expression durch die *in vitro* Situation induziert wurde, im Sinne eines klonalen Effektes. In der Zellkultur wurde den Nährmedien zur Versorgung der Zellen kein Schilddrüsenhormon oder TRH zugefügt. Lediglich das dem Medium zugesetzte FCS stellte einen minimalen Hormonlieferanten in der Zellkultur dar. Unter diesen Bedingungen könnte sich eine hypothyreote Stoffwechsellage in den Zellen entwickelt haben, unter der bekanntlich die D2 induziert wird, um für eine vermehrte lokale Deiodierung von T4 zu T3 zu sorgen. Bei Vergleichen der Ergebnisse mit der Literatur finden sich bei Aktivitätsmessungen der Deiodaseisoenzyme in der Hypophyse

verschiedenster Tiere und Modelle höher messbare Aktivitäten der D2 im Vergleich zur D1, was daran liegen könnte, dass viele Versuche an hypothyreoten Tieren durchgeführt wurden. Köhrle *et al.* (1995) zeigten allerdings bei Versuchen an Adenohypophysen von euthyreoten Ratten, dass die Aktivität der D1 höher war als die Aktivität der D2 und nach Stimulation mit T3 weiter zunahm. Es scheint also abhängig vom Zellsystem, der Zellspezies, der *in vitro* Kultur, den Kulturbedingungen und den vorhandenen Schilddrüsenhormonkonzentrationen zu sein, welche spezifische Deiodasenaktivität in Modellen der Adenohypophyse nachweisbar ist. Allgemein ist bekannt, dass die D1 und D2 in der Hypophyse exprimiert werden und dort die intrahypophysäre, lokale Deiodierung von T4 zu T3 vermitteln. Diese ist wichtig, um im Rahmen des negativen Feedbackmechanismus der Schilddrüse die TSH-Ausschüttung durch die thyrotropen Zellen der Adenohypophyse zu supprimieren. Das primäre Schilddrüsenhormon T4 wird somit vor Ort in der thyotropen Zielzelle zu T3 deiodiert, das an den Schilddrüsenhormonrezeptor binden kann. In welchem relativen Verhältnis die beiden Isoenzyme D1 und D2 in der Hypophyse exprimiert werden und in welchem Ausmaß beide Enzyme an der Deiodierung schlussendlich beteiligt sind, ist unklar.

Wie auch die D1, katalysiert die D2 die Bildung von T3 aus T4. Im Gegensatz zur D1 wird die D2 aber schnell durch erhöhte T4 oder rT3-Konzentrationen, also Substrate der Reaktion, inaktiviert. Im hypothyreoten Zustand ist die Halbwertszeit der D2 daher deutlich verlängert. Die D2-Aktivität kann auch durch cAMP und andere D2-stimulierende Faktoren (Glucokortikoide, Wachstumsfaktoren etc.) gesteigert werden. In der Literatur (Bianco *et al.*, 2002) ist beschrieben, dass die Aktivität der D2 nicht nur auf transkriptioneller Ebene geregelt wird, sondern rasche, posttranskriptionelle Aktivitätsregulationen vorhanden sein müssen. Dies basiert auf dem Nachweis einer niedrigen D2-Aktivitäts/D2-mRNA-Ratio in zahlreichen Geweben. In Anlehnung an diese Daten wählten wir die Stimulationszeiten unserer Experimente entsprechend kurz.

Es ist bekannt, dass die D1 und D2-Aktivität von manchen deiodasebildenden Zellen durch cAMP beeinflusst werden kann. Im durchgeführten Versuch zeigte die D2 in der thyotropen Zelllinie T $\alpha$ T1 nach cAMP (2-Dibutyryl-adenosin-3,5-Cyclo-Monophosphat)-Stimulation eine signifikante Zunahme ihrer Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollen. Die D1 hingegen blieb unverändert. Vergleicht man dieses Ergebnis mit anderen beschriebenen Studien zeigen sich Parallelen. In kortikotropen

AtT20-Mauszellen haben Araki *et al.* (2003) auch eine Stimulation der D2- Expression unter  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  nachweisen können. Bei der Stimulation von Astrozytenzellkulturen aus Rattenhirnen mit Dibutyryl-cAMP konnte die gesteigerte Expression der mRNA der D2, deren Aktivitätszunahme und die damit verbundene gesteigerte Umwandlung von T4 zu T3 nachgewiesen werden (Leonard 1988). In Anwesenheit von selenhaltigem Nährmedium induziert die Applikation von 8-bromo-cAMP die gesteigerte Expression der mRNA der D2 in Astrogliazellkulturen von Sprague Dawley Ratten (Pallud *et al.*, 1997). Schilddrüsenzellen, die von Patienten mit M. Basedow gewonnen und kultiviert wurden, reagierten bei der Inkubation mit  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  mit einem Aktivitätsanstieg der 5- und 5`Deiodasen, gleich, wie auf TSH-Stimulation (Ishii *et al.*, 1983). Studien mit der Rattenschilddrüsenzellreihe FRTL-5 dokumentieren einen TSH induzierten Anstieg der D1-mRNA, der auch mittels Stimulation der Zellen mit  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$  induziert werden konnte (Pekary *et al.*, 1994). All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Stimulation mit cAMP-Derivaten die TSH-Wirkung an Schilddrüsenzellen oder die Adenylatzyklaseaktivierung anderer Zellen durch entsprechende Rezeptorstimulation in Zellen verschiedenster Gewebe nachahmen kann. Im weiteren Sinne sind davon dann auch die Aktivitäten der 5`Deiodasen betroffen. Dies unterstreicht, dass die Wirkung von TSH an der Zielzelle Thyrozyt über einen cAMP abhängigen, second messenger gebundenen Signaltransduktionsweg gesteuert wird. Imai *et al.* (2001) zeigte anhand von Ergebnissen bei Versuchen mit humanen Schilddrüsenzellen, die mit TSH,  $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ , TPA, T4 und T3 stimuliert wurden, dass die Expression der D2 in den Zellen über den Signaltransduktionsweg der Proteinkinase A stimuliert, aber über den Signaltransduktionsweg der Proteinkinase C inhibiert wurde. Die verschiedenen Ergebnisse machen deutlich, dass je nach Gewebe und Versuchsmodell die D1 oder die D2 Aktivität durch cAMP stimuliert wird. Dies kann darin begründet liegen, dass sich cAMP Signaltransduktionskaskaden und die cAMP-responsiven, die Transkription modulierenden oder die Aktivität der Deiodasen beeinflussenden Faktoren unterscheiden. Die oben beschriebene höhere spezifische Aktivität der D2 gegenüber der D1 im Zellmodell T $\alpha$ T1 mit stets stark schwankenden, z.T. unter der Nachweisgrenze messbaren Aktivitäten der D1 mag hier einen Grund für das Ausbleiben einer signifikanten cAMP-Stimulation der Typ 1 Deiodase darstellen. Trotz alledem konnte gezeigt werden, dass die D2 Aktivität in T $\alpha$ T1-Zellen durch cAMP stimuliert wird. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass in thyrotropen Zellen der Adenohypophyse cAMP-abhängige Wirkungsmechanismen die Deiodierung von

Schilddrüsenhormonen beeinflussen und damit in den Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis eingreifen können.

Selen ist ein wichtiges Spurenelement, das im Zellstoffwechsel eine herausragende Rolle spielt. Zahlreiche Selen-inkorporierende Polypeptide konnten bislang identifiziert werden und wurden in der Familie der Selenoproteine begrifflich zusammengefasst. Die Deiodaseisoenzyme werden als dieser Familie zugehörig beschrieben und sind funktionell auf die Anwesenheit von Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum angewiesen. Mit dem verwendeten Zellmodell T $\alpha$ T1 wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, um zu überprüfen, wie lange die Deiodaseaktivität der Zellen unter Selenmangelbedingungen stabil bleibt. Es zeigte sich, dass die Aktivität von D1 und D2 in der Maushypophysenzellreihe T $\alpha$ T1 unabhängig war vom externen Selenangebot im Nährmedium. Unter selenarmen Bedingungen stellte sich auch nach mehreren Wochen keine signifikante Veränderung der Aktivität der Enzyme ein. Da das Ergebnis allerdings nur auf einer Versuchsreihe begründet ist, können qualifizierte Schlussfolgerungen nicht gemacht werden. Dennoch deutet der Versuch darauf hin, dass die Bildung der Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen nicht von der externen Selenzufuhr abhängig ist. In der Literatur finden sich z.T. widersprüchliche Angaben über Aktivitätsveränderungen von Deiodaseisoenzymen unter dem Einfluss von Selen, jeweils abhängig von Versuchsaufbau und Ausmaß des Selenmangels im Modell. Safran *et al.* (1991) beschrieben keinen Effekt von veränderten Selen-Mediumkonzentrationen auf die Aktivität der D2 in ihrem Versuchsmodell mit LLC-PK1-Zellen, bei denen es sich um eine epitheliale Nierenzelllinie von Schweinen handelt. Im Gegensatz dazu beschrieben Pallud *et al.* (1997) einen verminderten Aktivitätsanstieg der D2 in Astrogliazellkulturen aus Sprague Dawley Ratten nach cAMP Stimulation im selenfreien Medium im Vergleich zum selenangereicherten Medium. Mehrere Studien beschreiben gewebsspezifische Änderungen der intrazellulären Selenoproteinsynthese unter diätetischem Selenmangel. So zeigte sich die Abnahme der D1-Aktivität in Leber und Nieren von Selen-defizienten Ratten (Behne *et al.*, 1990), während im Schilddrüsen Gewebe (Bermano *et al.*, 1995) und in der Hypophyse (Bates *et al.*, 2000) die D1-Aktivität unverändert blieb. Demnach scheint es Gewebe zu geben, die über lokale Mechanismen zur Speicherung von Selen verfügen und bei Bedarf dieses bereitstellen können. Die Effekte eines Selenmangels auf die Aktivität der 5`Deiodasen erscheinen abhängig von der verwendeten Spezies, Gewebe



und Modell, sowie vom Grad des Selenentzugs im jeweiligen Versuch. In einer Arbeit von Gross et al. (1995) wird beschrieben, dass es auch in der epithelialen Zelllinie LLC-PK1 nicht einfach ist, eine Selenmangelsituation herzustellen. Hier wurden die Selenoproteine cGPx (zytosolische Glutathionperoxidase) und die D1 in ihrer Aktivität unter Selenmangelbedingungen untersucht. Es zeigte sich, dass die Enzymexpression von der Anwesenheit von Selen abhängig ist, allerdings zeigte sich auch, dass ein sehr geringes Selenangebot ausreicht (das im Nährmedium der Zellen vorhandene 10%ige FCS bringt Selen mit sich), um eine Enzymexpression der D1 zu gewährleisten. Möglicherweise waren in unserem Fall daher die Versuchsbedingungen zur Überprüfung dieser Fragestellung nicht optimal gewählt.

#### **4.2 Parakrine Regulation der Aktivität von 5'-Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen**

Der stimulierende oder inhibierende Effekt von immunologischen Signalen auf der Ebene von Hypothalamus und Hypophyse ist schon längere Zeit bekannt und wird als wichtige Reaktion des Organismus auf ein systemisches, entzündliches und/oder infektiöses Ereignis zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus angesehen (Reichlin, 1993; Besedovsky *et al.*, 1996). Aktivierte Zellen des Immunsystems können die Blut-Hirn-Schranke überwinden, breiten sich im Gehirn aus und sezernieren vor Ort Zytokine u.a. immunologische Modulatoren (Leukotriene, Prostaglandine). Zytokine, die im Bereich der Hypothalamus-Hypophysen-Achse aktiv werden, greifen vor Ort in das immunologische, neurologische und endokrine Netzwerk ein. Schlussendlich treten dadurch Veränderungen in der Bildung und Freisetzung von Hormonen in den sekretorisch aktiven Zellen der Adenohypophyse auf, die zu Veränderungen im gesamten endokrinen System des Organismus führen können. Als Beispiel eines solchen pathologischen Zustandes des Organismus kann das „euthyroid sick syndrome“ (ESS) genannt werden. Es tritt im Rahmen von schweren Allgemeinerkrankungen auf und man beobachtet bei den betroffenen Patienten einen erniedrigten Serum-T3- und teils auch T4- Spiegel begleitet von erhöhten Serum-rT3-Konzentrationen (Docter *et al.*, 1993). Der TSH- Spiegel ist in der Regel trotz der niedrigen T3/T4- Spiegel im Serum im normalen bis normal-erniedrigten Bereich. Eine befriedigende pathophysiologische Erklärung des Krankheitsbildes ist bislang noch nicht gelungen. Untersuchungen haben wahrscheinlich simultan ablaufende Veränderungen (Boelen *et al.*, 2004) auf verschiedenen Regulationsebenen im Organismus gezeigt. Ein wichtiger Endpunkt im Erklärungsmodell des ESS ist der Nachweis der reduzierten T3-Produktion in der Leber

mit verminderter Aktivität der D1. Daraus resultieren zum einen verminderte Serum-T3-Spiegel, zum anderen eine erhöhte Serum-rT3-Konzentration als Ergebnis eines verminderten Abbaus von rT3 durch die D1. Einen weiteren Faktor im Erklärungsmodell des ESS liefert die Annahme, dass eine zusätzliche Störung der Bildung und/oder Sekretion von TSH in thyrotropen Zellen der Adenohypophyse vorliegt, da der Abfall der peripheren Schilddrüsenhormonkonzentration im Feedbackregelkreis einen TSH- Anstieg induzieren müsste. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass Zytokine dabei eine entscheidende Rolle spielen (Bartalena *et al.*, 1998; Papanicolaou, 2000). Boelen *et al.* (2004) zeigten in einer kürzlich publizierten Arbeit ein fingiertes ESS-Modell bei Mäusen, mit dem Nachweis einer, nach LPS-Stimulation simultanen Expression von IL-1 $\beta$ -mRNA und anschliessenden simultanen Änderung der Expression von D1, D2-mRNA, TR- und TSH-Rezeptoren auf allen Ebenen des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-systems und in der Leber. Wir stellten uns die Frage, ob und in welchem Masse Zytokine die Aktivität der 5`Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen beeinflussen und ob auf diesem Hintergrund die Hypothese, parakrine Regulationen könnten im Bereich der thyrotropen Zellen an der Entstehung des ESS beteiligt sein, diskutiert werden kann. In verschiedenen Versuchsreihen wurden deshalb Modelle parakriner Regulationen der 5`-Deiodasen von thyrotropen T $\alpha$ T1-Zellen, in denen der TSH-Feedback stattfindet, untersucht.

Die Stimulation mit dem Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) gilt als repräsentative, physiologisch relevante Induktion des Immunsystems und damit der Zytokinsekretion. Unter diesem Gesichtspunkt wird sie in Versuchsmodellen eingesetzt. Man weiss, dass systemisch appliziertes LPS einen infekähnlichen Zustand im Organismus induziert, begleitet von einer gesteigerten Aktivität proinflammatorischer Zytokine, die v.a. von aktivierten dendritischen Zellen sezerniert werden. Baur *et al.* (2000) untersuchten LPS-Effekte auf die Deiodaseaktivität in somatotropen Rattenhypophysenzellen der Linie GH3. Hier zeigte sich eine Stimulation der D1, die Aktivität der D2 veränderte sich nicht signifikant. Es konnte also ein signifikanter LPS-Effekt auf die D1 dieser Hypophysenzelllinie nachgewiesen werden. Auf der Grundlage dieses Ergebnisses haben wir in unseren durchgeführten Versuchsreihen thyrotrope T $\alpha$ T1-Zellen mit LPS stimuliert und die Deiodaseaktivitäten gemessen. Es zeigte sich, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen mit GH3- Zellen, eine Abnahme der D1 Aktivität unter Stimulation mit LPS. Dagegen kam es zu einem Aktivitätsanstieg der D2 in den mit

LPS stimulierten Zellen. Als Ursache für die Veränderungen der Deiodaseaktivitäten nach Applikation von LPS kann unter den oben beschriebenen, bekannten Erkenntnissen eine zytokinvermittelte Deiodasemodulation diskutiert werden. An welchem Ort und über welchen Mechanismus LPS welches Zytokin moduliert, ist unklar. Voraussetzung einer zytokininduzierten Aktivitätsveränderung der T $\alpha$ T1-Zellen ist die Anwesenheit von spezifischen Zytokinrezeptoren. Es ist bekannt, dass lösliche Zytokinrezeptoren vorhanden sind, z.B. der lösliche IL-6 Rezeptor (sIL-6R), der mit einem transmembranösen Glycoprotein gp130 assoziiert und so eine intrazelluläre Signalkette induzieren kann. Diese besteht aus der Aktivierung spezieller Janus-Kinasen (Jak), die zur Phosphorylierung von Signaltransduktoren und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (STAT) führen (Heinrich *et al.*, 1998). Möglicherweise könnten solche Rezeptorkonstellationen im verwendeten Modell eine Rolle spielen.

Als Quelle der Zytokinbildung in der Adenohypophyse sind als Erstes, wie bereits oben beschrieben, die aktivierten immunologischen Zellen bekannt: Monozyten, Makrophagen und v.a. dendritische Zellen. Die Signalkette, die LPS durch die Interaktion mit noch unreifen, dendritischen Zellen auslöst, läuft über die Interaktion mit dem Oberflächenrezeptor TLR-4 (Toll-like-receptor-4), was zur Aktivierung der ERK (extracellular signal regulated kinase), der JNK (c-Jun N-terminal kinase), der MAPKs (p38 mitogen-activated protein kinases) und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt. Es kommt zur Sekretion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- $\alpha$  (Xie *et al.*, 2003).

Zweitens bilden endokrine Zellen selbst Zytokine, die v.a. parakrine Effekte haben. In Kulturen aus Hypophysenvorderlappenzellen von Ratten führte die Stimulation mit LPS zu einer vermehrten Freisetzung von TNF- $\alpha$  (Theas *et al.*, 1998). Whiteside *et al.* (1999) beschrieben, dass in Rattenhypophysen nach LPS-Injektion 0,5 Stunden später ein Anstieg der mRNA Expression von IL-1 $\beta$  beobachtet werden konnte, dem nach 2 Stunden die vermehrte Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) und IL-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1RA) folgten. Das am meisten untersuchte Interaktionsmodell von Zytokinen und Hormonsekretion ist das der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Eine systemische Entzündung induziert die vermehrte CRH-Sekretion des Hypothalamus, was zu einer verstärkten ACTH-Sekretion aus cortikotropen Zellen des HVL und einer verstärkten Sekretion von Glucocorticoiden der Nebennieren führt. Zahlreiche Ergebnisse von Versuchen postulieren, dass IL-6 das wichtige Zytokin mit dem entscheidenden Einfluss auf die hypothalamisch-hypophysäre

Hormonsituation während einer systemischen Entzündungsreaktion ist. Die *in vivo* Gabe von IL-6 zeigte Veränderungen der Plasmakonzentrationen von ACTH in Nagern (Lyson *et al.*, 1992; Matta *et al.*, 1992). Eine IL-6-Stimulation induzierte eine verstärkte CRH-Sekretion aus hypothalamischen Zellen (Lyson *et al.*, 1992; Navarra *et al.*, 1991). Van Enckevort *et al.* (2001) demonstrierten, dass LPS die ACTH-Sekretion stimuliert und dass dieser Effekt in IL-6-defizienten Mäusen z.T. aufgehoben ist. Bei Versuchen *in vitro* induzierte die IL-6-Stimulation eine verstärkte ACTH-Sekretion in humanen Hypophysenzellen (Shimon *et al.*, 1997) und in AtT20-Zellen (Katahira *et al.*, 1998). Gautron *et al.* (2003) demonstrierten, dass corticotrope Rattenhypophysenzellen IL-6-Rezeptoren und gp130 mRNAs exprimieren und postulierten eine LPS-induzierte IL-6-assoziierte direkte Wirkung an corticotropen Zellen während einer systemischen Entzündungssituation. Auch in unserem Modell könnte für die gemessenen Deiodaseveränderungen folglich eine direkte, LPS induzierte, zytokinabhängige Modulation der Expression von Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen ursächlich sein. Oder die Veränderungen könnten durch eine LPS induzierte, zytokinabhängige Modulation im Bereich des hormonellen Regelkreises der thyotropen Zellen entstehen. D.h. die Veränderungen der Deiodaseaktivität wären die Folge einer Veränderung der hormonalen Aktivität der thyotropen Zellen im zytokinsensitiven hypothalamisch-hypophyseären Feedbackregelkreis. Die TSH-Antwort auf das TRH wird durch TNF- $\alpha$  reduziert (Pang *et al.*, 1989). In der Adenohypophyse selbst induziert LPS die Sekretion von IL-1 (Koenig *et al.*, 1990) und IL-6 (Vankelecom *et al.*, 1989), die beide die TSH-Sekretion über einen parakrinen Mechanismus hemmen.

Drittens wurde nachgewiesen, dass aktivierte Gliazellen auch Zytokine sezernieren können. Bekannt ist die Sekretion von IL-1, 2, 4 und 6, sowie TNF- $\alpha$ . Daneben konnten in vielen Bereichen des Gehirns IL-1-Rezeptoren und IL-1-Rezeptorantagonisten kolokalisiert nachgewiesen werden (Reichlin, 1993). Dies deutet auf ein multifaktorielles, komplexes, parakrines Regulationssystem im Gehirn hin, das auch auf der hypothalamischen Ebene die Feedbackregulation der Schilddrüsenachse unterbrechen könnte.

Viertens werden Zytokine von den Follikulostellarzellen in der Adenohypophyse gebildet. LPS stimuliert hier z.B. die IL-6 Bildung (Lohrer *et al.*, 2000). Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass FS-Zellen als Quelle der Zytokinbildung und Modulatoren der Aktivitäten der hormonbildenden Zellen in der Adenohypophyse die entscheidende Rolle spielen. Ihre sternförmige, retikuläre Organisation erlaubt den

Kontakt zu den einzelnen Zellgruppen der hormonbildenden Zellen und den anderen in der Adenohypophyse vertretenen Zellspezies. Es gibt viele Hinweise darauf, dass FS-Zellen als Schaltstelle zwischen Immunsystem, Nervensystem und Endokrinium agieren. Über parakrine Mechanismen sollen sie die hormonbildenden Zellen entscheidend modulieren können (Jones *et al.*, 1990; Allaerts *et al.*, 1990).

Auf diesem Hintergrund wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt. In den Kokulturen von T $\alpha$ T1- und TtT/GF- Zellen war kein direkter Zell-Zell-Kontakt von thyrotropen Zellen und FS-Zellen möglich. So konnte der Verdacht, eine Veränderung der Aktivität der in den thyrotropen Zellen gebildeten 5 $\alpha$ Deiodasen könne durch lösliche, also parakrine Faktoren induziert werden, erhärtet werden. In den durchgeführten Kokulturexperimenten zeigte sich im Verlauf der ersten 5 Tage des Versuchs ein Aktivitätsabfall der D2 in der Kokultur im Vergleich zu den alleine kultivierten T $\alpha$ T1-Zellen. Hier scheint zunächst ein inhibierender Einfluss der TtT/GF-Zellen auf die Deiodasebildung der T $\alpha$ T1-Zellen vorzuliegen, bzw. eine weniger ausgeprägte Stimulation. Ab dem 7. Versuchstag zeigte sich dann eine Aktivitätszunahme der D2 in der Kokultur im Vergleich zur Kontrolle. Hier scheint sich nun ein stimulierender Effekt der TtT/GF-Zellen auf die T $\alpha$ T1-Zellen zu entwickeln, der augenscheinlich erst nach längerer Koinkubation der Zellen an Relevanz gewinnt. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass es sich lediglich um einen einmalig durchgeführten Versuch handelt. Die Bedeutung dieses Ergebnisses ist daher relativ gering. Es zeigen sich dennoch messbare Veränderungen der D2 Aktivität in T $\alpha$ T1-Zellen unter dem Einfluss der TtT/GF-Zellen. Im Kokulturmodell besteht die Möglichkeit des Übertritts von Stoffwechselprodukten u.a. löslichen Faktoren, die von den Zellen gebildet und ins Nährmedium abgegeben werden, was eine bidirektionale Interaktion der Zellen ermöglicht. Eine direkte Zell-Zell-Kommunikation über z.B. Gap junctions ist in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Daher muss hier eine Zell-Zell-Kommunikation über lösliche, parakrin wirkende Faktoren ursächlich sein. Zur Identifizierung relevanter Faktoren wären noch weitere aufwendige Experimente erforderlich.

In der oben beschriebenen Annahme, LPS induziere Aktivitätsänderungen der 5 $\alpha$ Deiodasen in T $\alpha$ T1-Zellen durch Aktivierung von Zytokinen, die unter anderem der Quelle der Follikelstanzellen entspringen könnten, wurden die beiden zuletzt beschriebenen Versuche miteinander kombiniert. Es konnte gezeigt werden, dass die

Aktivität der D2 in den Versuchen mit konditionierten Medien und Kokulturen von T $\alpha$ T1- und TtT/GF-Zellen deutlich stimuliert wurde und dass dieser Effekt unter dem Einfluss von LPS zusätzlich gesteigert werden konnte. Dagegen zeigte sich keine signifikante Veränderung der D1, weder unter LPS-Stimulation, noch unter Einfluss von konditionierten Medien oder den Bedingungen der Kokultur.

Warum die D1 in den Stimulationsversuchen von alleine kultivierten T $\alpha$ T1-Zellen mit LPS eine deutliche Aktivitätsminderung zeigte, die in den nachfolgenden Versuchen der Kokultur aber nicht mehr nachgewiesen werden konnte, ist unklar. Im labilen Kokultursystem könnte ein quantitativer Mangel an zur Verfügung stehendem Zellmaterial ursächlich sein, da bei der Aussaat der Zellen nicht immer ein befriedigendes, flächendeckendes Zellwachstum erreicht werden konnte. Allerdings kann ein solches Faktum im Bezug auf die Versuche mit konditioniertem Medium nicht diskutiert werden. So muss davon ausgegangen werden, dass weder LPS noch die Anwesenheit von TtT/GF Zellen einen signifikanten Einfluss auf die D1-Aktivität haben.

In Bezug auf die Aktivität der D2 scheinen TtT/GF-Zellen alleine und mit LPS einen stimulierenden Effekt zu haben. Für diesen Effekt verantwortlich sind parakrine Mechanismen. So könnten die TtT/GF-Zellen unter Anwesenheit von T $\alpha$ T1-Zellen stimulierende Faktoren produzieren, die zur Aktivitätssteigerung der D2 führten. Da im Versuchsmodell sowohl bei den konditionierten Medien, als auch im Zweikammer-Kokultursystem kein direkter Zell-Zell-Kontakt möglich war, kann die Kommunikation der Zellen untereinander nur über ins Nährmedium sezernierte lösliche Faktoren gelingen. Follikulostellarzellen wurden als Quelle der IL-6 Bildung in der Adenohypophyse identifiziert (Vankelecom *et al.*, 1989). Sie bilden aber noch eine Reihe weiterer Faktoren, die endokrine Zellen parakrin beeinflussen können. Dazu gehören z.B. Wachstumsfaktoren, wie basic fibroblast growth factor (bFGF) (Ferrara *et al.*, 1987), vascular endothelial growth factor (VEGF) (Gospodarowicz *et al.*, 1987), insulin-like growth factor-I (INF-I) (Bach *et al.*, 1992) und TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- beta) (Renner *et al.*, 2002) und andere Zytokine (z.B leukemia inhibitory factor (LIF) (Vankelecom *et al.*, 1993) und IL-11 (Castro *et al.*, 2000). In der vorliegenden FS-Zelllinie TtT/GF konnte die IL-6 Bildung ebenfalls nachgewiesen werden (Matsumoto *et al.*, 1993). Auf diesem Hintergrund könnte das Zytokin IL-6 ein wichtiger Faktor sein, der unter Anwesenheit von T $\alpha$ T1-Zellen von TtT/GF-Zellen gebildet wird und die 5 $\alpha$ -Deiodasen und damit die TSH-Bildung in thyrotropen T $\alpha$ T1

Zellen moduliert. Die Annahme, dass Zytokine die D2-Aktivität im Versuch stimulieren können, kann weiter dadurch gestützt werden, dass LPS zusätzlich einen stimulierenden Effekt auf die D2 zeigte. Wie oben beschrieben, induziert LPS die IL-6-Bildung in TtT/GF-Zellen (Lohrer *et al.*, 2000). So könnte LPS die TtT/GF-Zellen zusätzlich in ihrer parakrinen Modulationsfunktion beeinflussen. Neben der Möglichkeit der Verstärkung des Modulationseffektes von TtT/GF-Zellen durch LPS muss aber auch daran gedacht werden, dass möglicherweise LPS primär einen Effekt auf die thyrotropen Zellen ausübt und dort, wie bereits oben beschrieben, die Zytokinbildung oder andere Mechanismen direkt moduliert, bzw. im Bereich des hormonellen Regelkreises eingreift.

Wie bereits oben diskutiert wurde, ist bisher noch nicht geklärt, ob proinflammatorische Zytokine in der Pathogenese des ESS eine Rolle spielen. Die in den bisherigen Versuchen beschriebenen Effekte könnten aber auf diesen Umstand hinweisen. Tatsache ist, dass die Typ 2 Deiodase in T $\alpha$ T1-Zellen durch TtT/GF-Zellen stimuliert wurde und dass dieser Effekt durch die Zugabe von LPS verstärkt werden konnte. Einen Hinweis darauf, dass IL-6 eine entscheidende Rolle beim ESS spielen könnte, liefern Versuche mit Wildtyp- und IL-6-knockout-Mäusen. Hier zeigt sich ein durch LPS-Injektion, Listerieninfektion oder Terpentin-Injektion ausgelöstes ESS in den knockout Mäusen weniger ausgeprägt als in den Wildtyp Mäusen (Boelen *et al.*, 1996). Im Zusammenhang mit dieser These können die im Versuch nachgewiesenen, LPS induzierten Aktivitätsänderungen der 5'-Deiodasen Typ 1 und 2 in T $\alpha$ T-1 Zellen als Komponente eines LPS sensitiven, modulierbaren Hypophysen-Schilddrüsen-Systems betrachtet werden.

Zytokine beeinflussen hormonbildende Zellen des HVL in ihrer endokrinen Aktivität (Imura *et al.*, 1994, Besedovsky, 1996). Sie modulieren auch die Aktivität von Deiodasen. Quelle der Zytokinbildung in der Adenohypophyse sind auch die Follikulostellarzellen, die zwischen den endokrin aktiven Zellen angeordnet sind. Sie sollen eine entscheidende Rolle in der Organisation der parakrinen Kommunikation spielen (Jones *et al.*, 1990; Allaerts *et al.*, 1990). IL-6, eines von vielen Zytokinen, das von FS-Zellen gebildet und sezerniert wird, stimuliert z.B. die Sekretion von PRL, LH, FSH und GH in vitro und ACTH in vivo (Arzt *et al.*, 1999). Im Versuchsmodell wurde die Wirkung einzelner Zytokine, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 auf die Deiodaseaktivität von thyrotropen T $\alpha$ T1-Zellen alleine und in Kokultur mit follikulostellaren TtT/GF-Zellen

untersucht. Dabei zeigten sich keine Effekte von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  auf die Aktivität sowohl der D1, als auch der D2. Bei der Stimulation mit IL-6 zeigte sich dagegen nach 24 Stunden Stimulationszeit ein Anstieg der D2 Aktivität sowohl in der direkt stimulierten T $\alpha$ T1-Kontrollgruppe, als auch in den sich in Kokultur mit TtT/GF Zellen befindlichen Kulturen. Dabei war der stimulierende Effekt von IL-6 auf die D2 in der Kokultur stärker als in der Kontrolle. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Anwesenheit von TtT/GF Zellen den stimulierenden Zytokineffekt von IL-6 verstärkt. Offensichtlich ist, dass TtT/GF Zellen nicht direkt über Zellkontakte die T $\alpha$ T1-Zellen in ihrer Deiodasebildung beeinflussen, sondern hier lösliche Faktoren, vermutlich parakrine Mechanismen, eine Rolle spielen müssen, da im vorliegenden Versuchsaufbau kein direkter Zell-Zell-Kontakt möglich war. Diesem Effekt können mehrere Ursachen zugrunde liegen. TtT/GF Zellen könnten ihrerseits IL-6 bilden und so über eine höhere Konzentration des Zytokins die Deiodaseaktivität beeinflussen. Es wären aber auch Einflüsse über andere Faktoren denkbar. Über welchen Mechanismus IL-6 die Deiodaseaktivität beeinflusst ist unklar. In der Literatur wurden bisher unterschiedliche Effekte von Zytokinen auf die D1 und D2 beschrieben, abhängig vom untersuchten Organ, Spezies und Modell. In Reaggregatkulturen von Rattenhypophysen konnte beispielsweise eine Stimulation der D2 durch TNF- $\alpha$  und IL1- $\beta$  (Baur *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Die erhöhte D2-Aktivität führt in den thyrotrophen Zellen zu einer vermehrten Bildung von T3, was zu einer TSH-Suppression führt. Die Stimulation der Deiodasen in der Adenohypophyse und, wie hier demonstriert werden konnte, im thyrotrophen Zellmodell durch das Zytokin IL-6 könnten somit eine kausale Rolle bei der Entstehung des euthyroid sick syndrome (ESS) spielen. Dass in unseren Versuchsreihen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der D1 und D2 hatten, schließt einen Effekt dieser Zytokine auf die Deiodaseaktivität in T $\alpha$ T1-Zellen nicht aus. Zur weiteren Abklärung hätten Versuchsreihen mit unterschiedlichen Zytokinkonzentrationen und Zeitreihen gemacht werden müssen. Diese hätten jedoch den Rahmen der Arbeit gesprengt.

Es konnte gezeigt werden, dass die direkte Zytokinstimulation von T $\alpha$ T1 Zellen mit IL-6 einen Anstieg der D2 Aktivität induzierte. Dieser Effekt war im gleichen Versuch in der Kokultur von TtT/GF und T $\alpha$ T1 Zellen verstärkt, was darauf hinweisen könnte, dass FS-Zellen über parakrine oder andere Faktoren den Zytokineffekt verstärken. Dies könnte eine wesentliche Rolle spielen im Bezug auf die erniedrigte TSH Konzentration im pathophysiologischen Zustand des Nieder T3 Syndroms.



### 4.3 Effekte von $T\alpha T1$ -Zellen auf TtT/GF-Zellen und bidirektionale Effekte

Follikulostellarzellen werden als intrahypophysäre Modulatoren der Aktivität von hormonbildenden Zellen diskutiert. Wie oben beschrieben, scheint eine solche Zell-Zell-Kommunikation zwischen FS-Zellen und thyrotropen Zellen u.a. über parakrine Regulationsmechanismen zu erfolgen. Dabei scheint das Zytokin IL-6 eine entscheidende Rolle zu spielen. TtT/GF-Zellen exprimieren IL-6 neben einer Reihe weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren. Die IL-6 Bildung durch TtT/GF Zellen kann direkt durch LPS induziert werden (Lohrer *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurden einzelne Kulturen von TtT/GF Zellen in den Versuchreihen mit LPS stimuliert und auf ihre IL-6-Expression hin untersucht. Dies ermöglichte unter anderem die Kontrolle der Effizienz der jeweiligen Versuchsreihe.

Durch verschiedene Versuchsreihen mit Kokulturen und konditionierten Medien von  $T\alpha T1$  und TtT/GF Zellen haben wir die IL-6 Expression der TtT/GF Zellen in Abhängigkeit von den  $T\alpha T1$  Zellen nachgewiesen. Thyrotropen Zellen modulieren so ihrerseits die FS-Zell-Aktivität. Im Gegensatz dazu konnte eine IL-6 Expression der TtT/GF Zellen bei Stimulation mit auf AtT20 Zellen (kortikotrope Zellen aus der Mauthypophyse) vorkonditioniertem Medium und reinem high und low glucose DMEM-Medium nicht nachgewiesen werden. Damit zeigte sich, dass eine spezifisch durch die thyrotropen  $T\alpha T1$ -Zellen vermittelte Expression des Zytokins IL-6 in follikulostellaren TtT/GF Zellen induziert wird, unabhängig von Faktoren, die sich im Nährmedium der Zellen befinden könnten. Welcher Wirkungsmechanismus hierbei eine Rolle spielt, ist unklar. In der Literatur ist beschrieben, dass die IL-6 Bildung durch FS-Zellen nicht nur durch LPS induziert wird, sondern auch durch Glukokortikoide, VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid), PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating peptide) und andere Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ ) (Renner *et al.*, 1998) vermittelt werden kann. Die molekularen Mechanismen der Wirkungsentfaltungen dieser Faktoren an der FS-Zelle sind dabei nur z.T. bekannt. Beschrieben wurde die Aktivierung von Proteinkinasen, zum einen des cAMP/Proteinkinase A-Systems durch VIP und PACAP (Matsumoto *et al.*, 1993) und zum anderen die Aktivierung des Inositolphosphat/Proteinkinase C-Systems durch IL-1 (Spangelo *et al.*, 1996). Außerdem wurden Glukokortikoidrezeptoren (Carmeliet *et al.*, 1991) und NF $\kappa$ B nachgewiesen, bei dem es sich um einen intrazellulären Transkriptionsfaktor handelt, den IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  aktivieren und damit ihre Wirkung entfalten können (Bauerle *et al.*, 1996). Es ist bekannt, dass IL-1 $\beta$  die IL-6 Bildung induzieren kann (Koenig *et al.*,

1990; Vankelecom *et al.*, 1989). Das Gen das für die Bildung von IL-6 codiert, beinhaltet eine NF $\kappa$ B Bindungsstelle in seiner Promotorregion (Lieberman *et al.*, 1990). Wird diese aktiviert kommt die IL-6 Produktion in Gang. Es wurde beschrieben, dass die Zytokine TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B in TtT/GF Zellen und Reaggregaten von Rattenhypophysen führen (Baur *et al.*, 2000). Dies könnte die Möglichkeit in Erwägung ziehen, dass die Kommunikation zwischen T $\alpha$ T1 Zellen und TtT/GF Zellen über die Zytokine IL1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  erfolgt, die ihrerseits durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B die IL-6 Bildung in TtT/GF Zellen induzieren. Nagashima *et al.* (2003) beschreiben dagegen eine PACAP stimulierte IL-6 Transkription in TtT/GF-Zellen, die über die TRE und CRE Bindungsstellen des IL-6-Promotors induziert wird und durch Estradiol gehemmt werden kann. Dies führt zu der Annahme, dass vermutlich mehrere Mechanismen auf molekularer Ebene zur gesteigerten IL-6-Expression führen können, je nachdem welches System durch einen bestimmten Stimulus aktiviert wird.

Wir haben gezeigt, dass die Zellen der Reihe TtT/GF durch T $\alpha$ T1-Zellen dahingehend stimuliert werden, dass sie IL-6 exprimieren. Dies lässt vermuten, dass eine bidirektionale Kommunikationsebene zwischen beiden Zellpopulationen besteht, bei der das Zytokin IL-6 eine Rolle spielt. Allerdings ist unklar, über welche Faktoren und Wirkungsmechanismen T $\alpha$ T1-Zellen die IL-6 Bildung in den TtT/GF-Zellen induzieren. Möglich wären hierbei parakrinen Faktoren, z.B. IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , aber auch andere Faktoren des endokrinen, neuroendokrinen und immunologischen Systems. Betrachtet man im Zusammenhang die oben beschriebene Zunahme der Aktivität der D2 in T $\alpha$ T1- Zellen unter dem Einfluss von LPS und IL-6, die in der Kokultur mit TtT/GF nochmals gesteigert werden kann, unter dem Gesichtspunkt der nun nachgewiesenen vermehrten IL-6 Expression der TtT/GF Zellen unter Anwesenheit von T $\alpha$ T1 Zellen, erhärtet sich der geäußerte Verdacht, die D2 Aktivität der thyrotropen Zellen würde über IL-6, das durch die TtT/GF Zellen gebildet wird, zusätzlich stimuliert.

Blickt man über die molekulare Ebene unserer Versuchsergebnisse hinaus, lässt sich zusammengefasst sagen, dass eine bidirektionale Kommunikationsebene zwischen dem endokrinen und dem immunologischen System auf der Ebene der Adenohypophyse existiert. Zusammen mit anderen Modellen lassen sich Veränderungen von Stoffwechselfunktionen im Rahmen von infektiologischen, entzündlichen, malignen,

intensivmedizinischen und anderen Erkrankungen erklären. Immunologische Interaktionen auf Ebene der Adenohypophyse beeinflussen entscheidend die neuroendokrine Kontrolle von Körperfunktionen. Dies ist bisher v.a. auf Ebene der adrenergen, gonadalen und thyroidalen Achse untersucht worden. Letztere ist bis heute nicht vollständig verstanden. Unter Berücksichtigung anderer Versuchsmodelle lassen unsere Ergebnisse Schlussfolgerungen zu, dass ein Einfluss von Zytokinen auf die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse eine entscheidende Grundlage zur Entwicklung des ESS bildet. Trotz alledem ist im Klinikalltag die Einschätzung der Schilddrüsenfunktion bei Patienten mit dem Nieder-T3-Syndrom, v.a. solcher, die auf der Intensivstation hospitalisiert werden müssen, schwierig. Es zeigen sich auch unterschiedliche Muster in der Konzentration von TSH und den Schilddrüsenhormonen. Entgegen der niedrigen T3-Serumkonzentrationen glaubt man, dass die Patienten eine euthyreote Stoffwechsellage besitzen. Daher, und bei fehlendem Nachweis eines positiven Effektes, wird aktuell die Schilddrüsenhormonsubstitutionstherapie bei diesen Patienten nicht empfohlen. Jedoch existiert auf der klinischen Ebene kein pathophysiologisches Erklärungsmodell und so bleiben weiterhin die Fragen offen, ob es langfristige Auswirkungen dieser, oft passageren Stoffwechselsituationen gibt und ob und wenn welche therapeutischen Möglichkeiten bestehen. Es gilt also, weitere zell- und molekularbiologische Untersuchungen auf Ebene der Adenohypophyse anzustellen, zur Untersuchung der Deiodase- und Hormonaktivität in thyrotropen Zellen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Fragestellung, ob eine parakrin gesteuerte Kommunikationsebene zwischen thyrotropen  $T\alpha T1$ -Zellen und follikulostellaren TtT/GF-Zellen der Hypophyse besteht. Sie wurde auf dem Hintergrund formuliert, dass die TSH bildenden thyrotropen Zellen der Adenohypophyse nicht nur durch Releasing- und Inhibiting-Hormone des Hypothalamus und durch Schilddrüsenhormone im Rahmen des negativen Rückkopplungseffektes, sondern auch durch ein intrahypophysäres Kommunikationssystem gesteuert werden, wobei Follikulostellarzellen als nicht hormonbildende Zellen der Adenohypophyse vor allem über parakrine Mechanismen entscheidend Einfluss auf die Synthese- und Sekretionsaktivität in thyrotropen Zellen nehmen sollen. Als wichtiges Enzymsystem der Feedbackregulation durch Schilddrüsenhormone in thyrotropen Zellen fungieren die 5`Deiodasen, die den Schilddrüsenhormonrezeptoren vorgeschaltet sind und so direkt in der Zielzelle das primäre Sekretionsprodukt der Schilddrüse T4 zu T3 umwandeln, welches schlussendlich an die Hormonrezeptoren binden kann und so die Aktivität der thyrotropen Zellen im Rahmen des negativen Feedbackregelkreises moduliert. Inwieweit intrahypophysäre Zell-Zell-Kommunikationen Einfluss nehmen auf die Aktivität der thyrotropen Zellen und die Expression der 5`Deiodasen, ist bislang im Detail nicht geklärt.

Die Versuche wurden mit  $T\alpha T1$ -Zellen, einer Maushypophysenzelllinie mit charakteristischen Merkmalen thyrotroper Zellen und TtT/GF-Zellen, einer weiteren Maushypophysenzelllinie mit den Charakteristika für FS-Zellen durchgeführt. In verschiedenen Versuchsreihen konnten die Aktivitäten der 5`Deiodasen D1 und D2 in  $T\alpha T1$ -Zellen nachgewiesen werden, die trotz Selenmangelbedingungen über einen längeren Zeitraum stabil blieben. Im Zweikammer-Kokultursystem von  $T\alpha T1$ - und TtT/GF-Zellen zeigte sich ein Effekt der Kokultur auf die Aktivität der D2, die innerhalb der ersten 5 Tage abnahm, dann aber ab Tag 7 der Kokultur zunahm. Dies zeigte, dass die Anwesenheit von TtT/GF-Zellen die Aktivität der D2 in  $T\alpha T1$ -Zellen modulieren kann. Da der Versuchsaufbau keinen direkten Zell-Zell-Kontakt ermöglichte, kann nur eine Kommunikation über lösliche Faktoren, die ins Nährmedium abgegeben wurden, in Betracht gezogen werden. Hier könnten parakrine Regulationsmechanismen also durchaus als modulierende Faktoren diskutiert werden. Die Stimulation von  $T\alpha T1$ -Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS, 2  $\mu\text{g/ml}$ )

zeigte eine Verminderung der D1-Aktivität und eine Zunahme der D2-Aktivität der Zellen. Da LPS als Induktor einer vermehrten Bildung und Sekretion von Zytokinen beschrieben wird, ist hier eine zytokinvermittelte Modulation der Deiodaseaktivität wahrscheinlich. Da eine LPS-induzierte Freisetzung von IL-6 aus TtT/GF-Zellen in der Literatur beschrieben ist, wurden weitere Experimente im Kokultursystem bzw. Versuche mit 100% konditionierten Nährmedien von TtT/GF-Zellkulturen durchgeführt, die mit LPS (2 µg/ml) stimuliert wurden. Es zeigte sich ein Anstieg der D2 Aktivität in TαT1-Zellen, der unter LPS-Stimulation noch verstärkt wurde. Dies lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit von TtT/GF-Zellen die LPS-Wirkung verstärkt oder dass sich Wirkungen von LPS und TtT/GF-Zellen an der TαT1-Zelle verstärken können. Eine direkte Stimulation mit IL-6 in der Kokultur zeigte auch den Anstieg der D2 Aktivität der TαT1-Zellen. Dieses Ergebnis stützt erneut die Hypothese, dass Zytokine, insbesondere IL-6 in der Zell-Zell-Kommunikation zwischen TtT/GF- und TαT1-Zellen eine wichtige Rolle spielen. In der RT-PCR von TtT/GF-Zellen konnte zudem eine IL-6 Expression in TtT/GF-Zellen der Kokultur bzw. in Versuchen mit konditionierten Medien (100%) aus TαT1-Zellkulturen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine bidirektionale Kommunikationsebene zwischen follikulostellaren TtT/GF-Zellen und thyrotropen TαT1-Zellen besteht.

Es konnten gegenseitig modulierende Effekte von TtT/GF- und TαT1-Zellen beobachtet werden, die bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung eines gestörten TSH Feedback in pathologischen Zuständen beteiligt sein könnten. Die daraus folgenden Veränderungen in den Funktionen auf der Ebene der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse unterstreichen die wichtige Funktion der Hypophyse als übergeordnetes Organ in der Regulation von Körperfunktionen. Zudem lassen die gewonnenen Daten auch im Zusammenhang mit anderen verfügbaren Modellen darauf schließen, dass es eine wichtige Kommunikationsebene gibt zwischen Immunsystem und der Schilddrüsenhormonachse, die in bestimmten Situationen wie z.B. Stress, Infektionen und Entzündungssituationen beide Systeme auf der Ebene der Adenohypophyse miteinander interagieren lassen.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abraham EJ, Villalobos C, Frawley LS** 1998

Effects of cellular interactions on calcium dynamics in prolactin-secreting cells.

*Endocrinology* 139: 2988-2993

**Allaerts W** 1995

Functional communication between the endocrine and immune system at the pituitary: pleiotropism or transient differentiation stages within the folliculo-stellate and dendritic cell group?

*Belg J Zool* 125 29-51

**Allaerts W, Carmeliet P, Denef C** 1990

New perspectives in the funktion of pituitary folliculostellate cells.

*Mol Cell Endocrinol* 71:73-81

**Araki O, Moritura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M, Muratami M** 2003

Expression of type 2 iodothyronine deiodinas in corticotropin-secreting mouse pituitari tumor cells is stimulated by glucocorticoid and corticotropin-releasing hormone.

*Endocrinology* 144 (10):4459-65

**Arzt E, Paez Pereda M, Perez Castro C, Pagotto U, Renner U, Stalla GK** 1999

Pathophysiological role of cytokine network in the anterior pituitari gland.

*Front Neuroendocrinol.* 20:71-95

**Bach MA, Bondy CA** 1992

Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor sytem.

*Endocrinology* 131(6): 2588-94

**Baes M, Allaerts W, Denef C** 1987

Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates.

*Endocrinology* 120:685-91

**Baeurle PA, Baltimore D** 1996

NFkB: Ten years after.

*Cell* 87: 13-20

**Bartelana L, Brogioni S, Grasso L, Rago T, Vitti P, Pinchera A, Martino E** 1994

Interleukin-6: a marker of thyroid-destructive process?

*Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79:1424-27

**Bartelana L, Bogazzi F, Brogiono S, Grasso L, Martino E** 1998

Role of cytokines in the pathogenesis of euthyroid sick syndrome.

*European J Endocrinol* 138:603-14

**Bates JM, Spate VL, Morris JS, St. Germain DL, Galton VA** 2000

Effects of selenium defeciency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development.

*Endocrinology* 141: 2490-2500

**Baur A, Bauer K, Jarry H, Köhrle J 2000**

Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'-deiodinases type I and type II.

*Journal of Endocrinology* 167:505-15

**Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J 1990**

Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme.

*Biochem Biophys Res Commun* 173:1143-1149

**Bergmann M, Wittkowski W, Hoffman K 1989**

Ultrastructural localisation of thyrotropin (TSH)-like immunoreactivity in specific secretory cells of the hypophysial pars tuberalis in the Djungarian hamster, *Phodopus sungarus*.

*Cell Tissue Res* 256:649-52

**Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE 1995**

Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats.

*Biochem J* 311: 425-430

**Besedovsky HO, del Ray A 1996**

Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses.

*Endocr Rev* 17:64-102

**Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR 2002**

Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases.

*Endocr Rev* 23:38-89

**Bockers TM, Sourgens H, Wittkowski W, Jekat A, Pera F 1990**

Changes in TSH-immunoreactivity in the pars tuberalis and pars distalis of the fetal rat hypophysis following maternal administration of propylthiouracil and thyroxine.

*Cell Tissue Res* 260:403-8

**Bockman J, Bockers TM, Winter C, Wittkowski W, Winterhoff H, Deufel T, Kreutz MR 1997**

Thyrotropin expression in the hypophysial pars tuberalis specific cells is 3,5,3'-triiodothyronine, thyrotropin-releasing-hormone, and pit-1 independent.

*Endocrinology* 138:1019-28

**Boelen A, Maas MAW, Lowik CWGM, Platvoet MC, Wiersinga WM 1996**

Induced illness in interleukin-6 (IL-6) knockout mice: causal role of IL-6 in the development of the low 3,5,3'-triiodothyronine syndrome.

*Endocrinology* 137:5250-5254

**Boelen A, Kwakkel J, Thijssen-Timmer DC, Alkemade A, Fliers E, Wiersinga WM 2004**

Simultaneous changes in central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute illness in mice.

*J Endocrinol* 182 (2): 315-323

**Bradford MM** 1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Analytical Biochemistry* 72:248-254

**Brent GA** 2000

Tissue-specific actions of thyroid hormone: insights from animal models.

*Rev Endocrinol Metab Disord* 1/2:27

**Carmeliet P, Vankelecom H, Van Damme J, Billiau A, Denef C** 1991

Release of IL-6 from anterior pituitary cell aggregates: Developmental pattern and modulation by glucocorticoids and forskolin.

*Neuroendocrinology* 53: 29-34

**Castro CP, Nagashima AC, Pereda MP, Goldberg V, Chervin A, Largen P, Renner U, Stella GK, Arzt E** 2000

The gp130 cytokines interleukin-11 and ciliary neurotropic factor regulate through specific receptors the function and growth of lactosomatotropic and folliculostellate pituitary cell lines.

*Endocrinology* 141:1746-53

**Chin WW, Shupnik MA, Ross DS** 1985

Regulation of the alpha and thyrotropin beta-subunit messenger ribonucleic acids by thyroid hormones.

*Endocrinology* 116:873-78

**Chomczynski P, Sacchi N** 1987

Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction.

*Anal Biochem* 162 (1):156-9

**Condorelli G, Formisano P, Miele C, Beguinot F** 1992

Thyrotropin regulates autophosphorylation and kinase activity of both insulin and insulin-like growth factor-I receptors in FRTL-5 cells.

*Endocrinology* 130:1615-1625

**Croteau W, Davery J, Galton V, St Germain DL** 1996

Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues.

*J Clin Invest* 98:404-17

**Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St Germain DL, Galton VA** 1995

Cloning of cDNA for the type II iodothyronine deiodinase.

*J Biol Chem* 270:26786-9

**Davery JC, Schneider MJ, Becker KB, Galton VA** 1999

Cloning of a 5.8 kB cDNA for a mouse type 2 deiodinase.

*Endocrinology* 140:1022-25



**Davies PH, Sheppard MC, Franklyn JA** 1997

Inflammatory cytokines and type I 5'-deiodinase expression in rat liver cells.  
*Molecular and Cellular Endocrinology* 129:191-98

**Del Prete GF, Mavilia C, Giudizi MG, De Carli M, Mastromauro C, Toccafondi R** 1990

IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  upregulate IL-6 production by human thyrocytes.  
*Cytokines: Basic Principles and Clinical Applications*, pp 71-76. Eds S Romagnani & AK Abbas. New York: Raven Press

**Desvergne B** 1994

How do thyroid hormone receptors bind to structurally diverse response elements?  
*Mol Cell Endocrinol* 100:125-131

**Docter R, Krenning EP, de Jong M, Hennemann G** 1993

The sick euthyroid syndrome: changes in thyroid hormone serum parameters and hormone metabolism.  
*Clinical Endocrinology* 39:499-518

**Evans RM** 1988

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.  
*Science* 240 (4854):889-95

**Fauquier T, Guerineau N, McKinney R, Bauer K, Mollard P** 2001

Folliculostellate cell network : A route for long-distance communication in the anterior pituitary.  
*PNAS* 98: 8891-8896

**Fekkes D, Hennemann G, Visser TJ** 1982

Evidence for a single enzyme in rat liver catalyzing the deiodination of the tyrosyl and the phenolic ring of iodothyronines.  
*Biochem J* 201:673-676

**Ferrara N, Schweigereer L, Neufelo G, Mitchell R, Gospodarowicz D** 1987

Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 84:5773-777

**Forrest D, Erway LC** 1996

Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function.  
*Nat Genet* 13:354

**French RA, Zachary JF, Dantzer R, Frawley LS, Chizzonite R** 1996

Dual expression of p80 type I and p68 type II interleukin-I-receptor on anterior pituitary cells synthesizing growth hormone.  
*Endocrinology* 137:4027-4036

**Fujii T, Sato K, Chol Han D, Kawakami M, Tsushima T, Shizume K** 1989

Effects of interleukine 1 (IL-1) on thyroid hormone metabolism in mice: stimulation by IL-1 of iodothyronine 5'-deiodination activity (type 1) in the liver.  
*Endocrinology* 124:167-174

**Gabellec M-M, Griffais R, Fillion G, Haour F 1995**

Expression of interleukin-1a, interleukin-1b and interleukin-1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: Regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment.  
*Brain Res Mol Brain Res* 31:122-130

**Gautron L, Lafon P, Tramu G, Layé S 2003**

In vivo activation of interleukin-6 receptor/gp 130 signaling pathway in pituitary corticotropes of lipopolysaccharide-treated rats.  
*Neuroendocrinol* 77:32-43

**Gereben B, Bartha T, Tu H, Harney JW, Rudas P, Larsen PR 1999**

Cloning and expression of chicken type 2 iodothyronine 5'-deiodinase.  
*J Biol Chem* 274:13768-76

**Glinoeer D 1999**

What happens to the normal thyroid during pregnancy?  
*Thyroid* 9(7):631-5

**Gloddek J, Pagotto U, Paez Pereda M, Arzt E, Stalla GK, Renner U 1999**

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells.

*J Endocrinol* 160(3): 483-90

**Gospodarowicz D, Lau K 1987**

Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin.  
*Biochem Biophys Res Commun* 165:292-98

**Gothe S, Wang Z 1999**

Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation.  
*Genes Dev* 13:1329

**Green VL, Atkin SL, Speirs V, Jeffreys RV, Landolt AM, Mathew B, White MC 1996**

Cytokine expression in human anterior pituitary adenomas.  
*Clin Endocrinol* 45: 179-185

**Gross M, Oertel M, Köhrle J 1995**

Differential selenium-dependent expression of type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in the porcine epithelial kidney cell line LLC-PK1.  
*Biochem J* 306: 851-6

**Grubeck-Loebenstein B, Bichan G, Chantry D, Kassal H, Londei M, Pirich K 1989**

Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1a and interleukin-6.  
*Clinical and Experimental Immunology* 77:324-30

**Hashimoto H, Igarashi N, Miyawaki T, Sato T 1995**

Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 on type I iodothyronine 5'-deiodination in rat thyroid cell line, FRTL-5.

*Journal of Interferon and Cytokine Research* 15:367-375

**Heider J, Baron C, Bock A 1992**

Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into proteins.

*EMBO J* 11(10):3759-66

**Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L 1998**

Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp 130/Jak/STAT pathway.

*Biochem J* 334:297-314

**Heufelder AE 1995**

Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy: recent controversies and progress

*European Journal of Endocrinology* 135:532-41

**Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI et al. 1989**

Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific.

*Science* 244:76-79

**Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L 1996**

Nuclear receptor coactivators and corepressors.

*Mol Endocrinol* 10:1167-1177

**Imai Y, Toyoda N, Maeda A, Kadobayashi T, Fangzheng G, Nishikawa M, Iwasaka T 2001**

Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by the protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by the protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells.

*Thyroid* 11(19):899-907

**Imura H, Fukata J 1994**

Endocrine-paracrine interaction in communication between the immune and endocrine systems. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammation.

*Eur J Endocrinol* 130:32-37

**Inoue K, Matsumoto H, Koyama C, Shibata K, Nakazato Y, Ito A 1992**

Establishment of a folliculo-stellate-like cell line from a murine thyrotropic pituitary tumor. *Endocrinology* 131 (6):3110-6

**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(3):500-5

- Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser F, Schmid M, Köhrle J** 1997  
Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localisation to chromosome 1p32-33.  
*Genomics* 42:361-363
- Japon MA, Rubinstein M, Low MJ** 1994  
In situ hybridisation analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development.  
*J Histochem* 42: 1117-1125
- Jones TH, Brown BL, Dobson PRM** 1990  
Paracrine control of anterior pituitary hormone secretion.  
*J Endocrinol* 127:5-13
- Jones TH, Daniels M, James RA, Justice SK, McCorkle R, Price A, Kendall-Taylor P, Weetman AP** 1994  
Production of bioactive and immunoreactive interleukin-6 (IL-6) expression of IL-6 messenger ribonucleic acid by human pituitary adenomas.  
*J Clin Endocrinol Metab* 78:180-187
- Kaczur V, Puskas LG, Takacs M, Racz IA, Szendroi A, Toth S, Nagy Z, Szalai C, Balazs C, Falus A, Knudsen B, Farid NR** 2003  
Evolution of the thyrotropin receptor: A G-protein coupled receptor with an intrinsic capacity to dimerize.  
*Mol Genet Metab.* 78(4):275-90
- Katahira M, Iwasaki Y, Aoki Y, Oiso Y, Saito H** 1998  
Cytokine regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT20.  
*J Endocrinol* 122:33-39
- Kobayashi H, Fukata J, Murakami N, Usui T, Ebisui O, Muro S, Hanaoka I, Inove K, Imura H, Nakao K** 1997  
Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells.  
*Brain Res* 758:45-50
- Köhrle J**, 2000  
The deiodinase family-selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action.  
*Cellular Mol Life Sciences* 57:1853-63
- Köhrle J, Schomburg L, Drescher S, Fekete E, Bauer K** 1995  
Rapid stimulation of type I 5'-deiodinase in rat pituitaries by 3,3',5-triiodo-L-thyronine.  
*Mol Cell Endocrinol* 108:17-21
- Koenig RJ** 1998  
Thyroid hormone receptor coactivators and corepressors.  
*Thyroid* 8:703

**Koenig JL, Snow K, Clark BD, Toni R, Cannon JG, Shaw AR, Dinare M, Reichlin S, Lee SL, Lechan RM** 1990

Intrinsic pituitary interleukin-1 beta is induced by bacterial lipopolysaccharide.

*Endocrinology* 126:3053-58

**Krane IM, Spindel ER, Chin WW** 1991

Thyroid hormone decreases the stability and poly (A) tract length of rat thyrotropin beta-subunit messenger RNA.

*Mol Endocrinol* 5:469-75

**Leonard JL** 1988

Dibutyryl cAMP induction of type II 5'-deiodinase activity in rat brain astrocytes in culture.

*Biochem Biophys Res Commun* 151:1164-1172

**Leonard JL, Rosenberg IN** 1980

Iodothyronine 5'-deiodinase from rat kidney: Substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine.

*Endocrinology* 107:1376-1383

**Leonard JL, Rosenberg IN** 1980

Characterization of essential enzyme sulfhydryl groups of thyroxine 5'-deiodinase from rat kidney.

*Endocrinology* 444-451

**Leonard JL, Farwell A** 1997

Thyroid hormone-regulated actin polymerisation in brain.

*Thyroid* 7:147-51

**Leonard JL, Köhrle J** 2000

Intracellular pathways of thyroid hormone metabolism.

In: *Braverman LE, Utiger RD, (eds): Werner and Ingbar's The Thyroid-A Fundamental and Clinical Text.*

Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 2000

**Libermann TA, Baltimore D** 1990

Activation of interleukin-6 gene expression through the NFκB transcription factor.

*Molecular and Cellular Biology* 10:2327-2334

**Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG** 1994

Pituitary ontogeny of the snell dwarf mouse reveals pit-1-independent and pit-1-dependent origins of the thyrotrope.

*Development* 120:515-22

**Lohrer P, Gloddek A, Carbia Nagashima A, Korali Z, Hopfner U, Arzt E, Stalla GK, Renner U** 2000

Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38α mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-κB pathway.

*Endocrinology* 141:4457-65

**Low SC, Berry MJ** 1996

Knowing when not to stop: selenocystein incorporation in eukaryotes.  
*Trends Biochem Sci* 21:203-8

**Lyson K, McCann SM** 1992

Induction of adrenocorticotrophic hormone release by interleukin-6 in vivo and in vitro.  
*Ann NY Acad Sci* 650:182-185

**Lyson K, McCann SM** 1992

Involvement of arachidonic acid cascade pathways in interleukin-6-stimulated corticotropin-releasing factor release in vitro.  
*Neuroendocrinology* 55:708-713

**Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer DJ, Harney JW, Warne RL, Larsen PR** 1992

Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase.  
*J Clin Endocrinol Metab* 75:1133-39

**Matsumoto H, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K** 1993

Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotrophic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3',5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation.  
*Endocrinology* 133:2150-55

**Matta SG, Weatherbee J, Sharp BM** 1992

A central mechanism is involved in the secretion of ACTH in response to IL-6 in rats: Comparison to and interaction with IL-1 beta.  
*Neuroendocrinology* 56:516-525

**McCabe CJ, Yarwood NJ, Gurr JA, Gilloes NJ, Sheppard MC, Franklyn JA** 1998

Differential regulation of the human thyrotropin alpha-subunit promoter by thyroid hormone receptors alpha1 and beta1.  
*Thyroid* 8(7):601-8

**Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z** 1999

Possible interactions between gonadotrophs and somatotrophs in the pituitary of tilapia: apparent roles for insulin-like growth factor I and estradiol.  
*Endocrinology* 140: 1386-1398

**Morand I, Fonlupt P, Guerrier A, Trouillas J, Calle A, Remy C, Rousset B, Munari-Silem Y** 1996

Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: Evidence for Gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells.  
*Endocrinology* 137:3356-67

**Moreno M, Berry MJ, Horst C et al.** 1994

Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinases.  
*FEBS Lett* 344:143-146

**Nagashima AC, Giacomini D, Perez Castro C, Paez Pereda M, Renner U, Stalla GK, Arzt E 2003**

Transcriptional regulation of interleukin-6 in pituitary folliculostellate TtT/GF cells.  
*Mol Cell Endocrinol* 201(1-2):47-56

**Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K 1980**

S100 protein in folliculo-stellate cells of the rat pituitary anterior lobe.  
*Brain Res.* 191 523-531

**Navarra P, Tsagarakis S, Faria MS, Rees LH, Besser GM, Grossman AB 1991**

Interleukines-1 and -6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway.  
*Endocrinology* 128:37-44

**Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y 1990**

A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells.  
*Nucleic Acids Res* 18:6169

**Nolte A, Bechtner G, Rafferteder M, Gartner R 1994**

Interleukin-1 beta (IL-1 beta) binds to intact porcine thyroid follicles, decreases iodide uptake but has no effect on cAMP formation or proliferation.  
*Horm Metab Res* 26:413-418

**Ozawa M, Sato K, Chol Han D, Kawakami M, Tsushima T, Shizume K 1988**

Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ /cachectin on thyroid hormone metabolism in mice.  
*Endocrinology* 123:1461-67

**Pallud S, Lennon AM, Ramauge M, Gavaret JM, Croteau W, Pierre M, Courtin F, ST. Germain DL 1997**

Expression of the type II iodothyronine deiodinase in cultured rat astrocytes is selenium-dependent.  
*J Biol Chem* 272(29):18104-110

**Pang XP, Hershman JM, Mirell CJ, Kary AE 1989**

Impairment of hypothalamic-pituitary-thyroid function in rats treated with human recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  (cachectin).  
*Endocrinology* 125:76-84

**Pang XP, Hershman JM, Chung M, Pekary AE 1989**

Characterisation of tumor necrosis factor- $\alpha$  receptors in human and rat thyroid cells and regulation of the receptors by thyrotropin.  
*Endocrinology* 125:1783-88

**Papnicolaou DA 2000**

Euthyroid sick syndrome and the role of cytokines.  
*Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 1:43-8

**Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I, Hershman JM 1994**

Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells.  
*Mol Cell Endocrinol* 101:R31-R35

**Perez Castro C, Nagashima AC, Pereda MP, Goldberg V, Chervin A, Largen P, Renner U, Stalla GK, Arzt E** 2000

The gp130 cytokines interleukin-11 and ciliary neurotropic factor regulate through specific receptors the function and growth of lactosomatotropic and folliculostellate pituitary cell lines.

*Endocrinology* 141(5): 1746-53

**Perryman EK, de Vellis J, Bagnara JT** 1980

Phagocytic activity of the stellate cells in the anuran pars intermedia.

*Cell Tissue Res* 208(1):85-98

**Pierce JG, Parsons T** 1981

Glycoprotein hormones: structure and function.

*Annu Rev Biochem* 50:456-95

**Popa GT, Fielding U** 1930

A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region.

*J Anat* 67:227-232

**Rees DA, Lewis MD, Lewis BM, Smith PJ, Scanlon MF, Ham J** 2002

Adenosine-regulated cell proliferation in pituitary folliculostellate and endocrine cells: differential roles for the A(1) and A(2B) adenosine receptors.

*Endocrinology* 143(6): 2427-36

**Reichlin S** 1993

Neuroendocrine-immune interactions.

*N End J Med* 329: 1246-1253

**Renner U, Gloddek J, Pereda MP, Arzt E, Stalla GK** 1998

Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells.

*Domestic Animal Endocrinology* 15(5): 353-362

**Renner U, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, Arzt E, Stalla GK** 2002

Transforming Growth Factor-beta stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells.

*Endocrinology* 143(10): 3759-65

**Rinhart JF, Farquhar MG** 1953

Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland.

*J Histochem Cytochem* 1: 93-113

**Safran M, Leonard J** 1991

Comparison of the physicochemical properties of type I and type II iodothyronine 5'-deiodinase.

*J Biol Chem* 266:3233-8

**Safran M, Farwel A, Leonard J** 1991

Evidence that type II 5'-deiodinase is not a selenoprotein.

*J Biol Chem* 266:13477-80



**Safran M, Farwel A, Leonard J 1996**

Catalytic activity of the type II iodothyronine 5'-deiodinase polypeptide is dependent upon a cyclic AMP activation factor.

*J Biol Chem* 271:16363-8

**Sakai T, Inoue K, Kurosumi K 1992**

Light and electron microscopic immunocytochemistry of TSH-like cells occurring in the pars tuberalis of the adult male rat.

*Arch Histol Cytol* 55:151-157

**Sakai T, Sakamoto S, Ijima K, Matsubara K, Kato Y, Inoue K 1999**

Characterization of TSH-positive cells in foetal rat pars tuberalis that fail to express Pit-1 factor and thyroid hormone beta2 receptors.

*J Neuroendocrinol* 11:187-193

**Salvatore D, Low SC, Berry M, Maia AL, Harney JW, Croteau W, Germain DL, Larsen PR 1995**

Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression and functional analysis of the placental selenoenzyme.

*J Clin Invest* 95:2421-30

**Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR 1996**

Molecular biology and biochemical characterisation of the human type 2 selenodeiodinase.

*Endocrinology* 137:3308-15

**Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR 1996**

Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid.

*J Clin Invest* 98:962-8

**Sasaki S, Lesoon-Wood LA, Dey A, Kuwala T, Weintraub BD, Humphrey G, Yang WM, Seto E, Yen PM, Howard BH, Ozato K 1999**

Ligand-induced recruitment of histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene.

*EMBO J* 18(19):5389-98

**Sato K, Satoh T, Shizume K, Ozawa M, Han DC, Imamura H, Tsushima T, Demura H, Kanaji Y, Ito Y, et al. 1990**

Inhibition of <sup>125</sup>I organification and thyroid hormone release by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma in human thyrocytes in suspension culture.

*J Clin Endocrinol Metab* 70:1735-1743

**Sauer J, Arzt E, Gumprecht H, Hopfner U, Stella GK 1994**

Expression of interleukin-1 receptor antagonist in human pituitary adenomas in vitro.

*J Clin Endocrinol Metab* 79:1857-1863

**Schwartz HL, Lazar MA, Oppenheimer JH 1994**

Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone beta2 receptor (TRb2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues.

*J Biol Chem* 269:24777-24782

**Schwartz J** 2000

Intercellular communication in the anterior pituitary.  
*Endocrine Reviews* 21:488-513

**Shimon I, Yan X, Ray DW, Melmed S** 1997

Cytokine-dependent gp130 receptor subunit regulates human fetal pituitary adrenocorticotropin hormone and growth hormone secretion.  
*J Clin Invest* 100:357-363

**Shupnik MA, Greenspan SL, Ridgway EC** 1985

Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone.  
*J Biol Chem* 260:2900-03

**Shupnik MA, Ridgway EC, Chin WW** 1989

Molecular biology of thyrotropin.  
*Endocrine Rev* 10:459-75

**Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA et al.** 1990

Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors.  
*Genes Dev* 4:695-711

**Spangelo BL, Judd AM, Call GB, Zumwal J, Gorospe WC** 1995

Role of the cytokines in the hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes.  
*Neuroimmunomodulation* 2:299-312

**Spangelo BL, Jarvis WD** 1996

Lysophosphatidylcholine stimulates IL-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro.  
*Endocrinology* 137:4419-4426

**St Germain DL, Galton VA** 1997

The deiodinase family of selenoproteins.  
*Thyroid* 7:655-68

**Svenson M, Kayser L, Hansen MB, Krogh Rasmussen A, Bendtzen K** 1991

Interleukin-1 receptors in human thyroid cells and on the rat thyroid cell line FRTL-5.  
*Cytokine* 3:125-30

**Takano T, Culp SG, De Souza EB** 1993

Reciprocal modulation of interleukin-1 beta (IL-1 beta) and receptors by lipopolysaccharide (endotoxin) treatment in the brain-endocrine-immune axis.  
*Endocrinology* 132:1497-1504

**Takano T, Takada K, Tada H, Nishiyama S, Amino N** 1993

Genistein, a tyrosine kinase inhibitor blocks the cell cycle progression but not Ca<sup>2+</sup> influx by BAY K8644 in FRTL-5 cells.  
*Biochem Biophys Res Commun* 190:801-807

**Tang K, Braverman LE, De Vito WJ 1995**

Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  modulate gene expression of type I 5'-deiodinase, thyroid peroxidase and thyroglobulin in FRTL-5 rat thyroid cells.

*Endocrinology* 136:881-888

**Theas MS, De Laurentis A, Lasaga M, Pisera D, Duvilanski BH, Seilcovich A 1998**

Effect of lipopolysaccharide on tumor necrosis factor and prolactin release from rat anterior pituitary cells.

*Endocrine* 8(3): 241-245

**Todd VL, Atkin SL, Speirs V, White MC 1995**

PCR expression of cytokines in anterior pituitary adenomas.

*J Endocrinol* 144:

**Tominaga T, Yamashita S, Nagayama Y, Morita S, Yokoyama N, Izumi M, Nagataki S 1991**

Interleukin 6 inhibits human thyroid peroxidase gene expression.

*Acta Endocrinol (Copenh)*124:290-294

**Tsagarakis S, Kontogeorgos G, Giannou P, Thalassinos N, Woolley J, Besser GM, Grossman A 1992**

Interleukin-6, a growth promoting cytokine, is present in human pituitary adenomas: An immuno-cytochemical study.

*Clin Endocrinol* 37:163-167

**Utsuyama M, Hirokawa K 2002**

Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice.

*Experimental Gerontology* 37:411-420

**Van Enkevort FH, Sweep CG, Span PN, Demacker PN, Hermsen CC, Hermus AR 2001**

Reduced adrenal response to bacterial lipopolysaccharide in interleukin-6-deficient mice.

*J Endocrinol Invest* 24:786-795

**Van Haasteren GA, van der Meer MJ, Hermus AR, Linkels E, Kaptein E, van Toor H, Sweep CG, Visser TJ, de Greef WJ 1994**

Different effects of continuous infusion of interleukin-1 and interleukin-6 on the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis.

*Endocrinology* 135:1336-1345

**Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Deneef C 1989**

Produktion of Interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system.

*Neuroendocrinology* 49:102-6

**Vankelecom H, Matthys P, Van Damme J, Heremans H, Billiau A, Deneef C 1993**

Immunocytochemical Evidence that S-100-positive cells of the mouse anterior pituitary contain interleukin-6 immunoreactivity.

*J Histochem Soc Inc* 41:151-6

**Vassart G, Dumont JE** 1992

The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth.  
*Endocr rev* 13:596-611

**Velasco M, Roessmann U, Gambetti P** 1982

The presence of glial fibrillary acidic protein in the human pituitary gland.  
*J Neuropathol Exp Neurol* 41 150-163

**Verhoelst CH, Vandenborne K, Severi T, Bakker O, Zandieh Doulabi B, Leonard JL, Kuhn ER, van der Geyten S, Darras VM** 2002

Specific detection of type III iodothyronine deiodinase protein in chicken cerebellar purkinje cells.  
*Endocrinology* 143(7): 2700-7

**Vidal S, Roman A, Oliveira MC, De La Cruz LF, Moya L** 1998

Simultaneous localization of Pit-1 protein and gonadotropins on the same cell type in the anterior pituitary glands of the rats.  
*Histochem Cell Biol* 110:183-188

**Visser TJ, Kaplan MM, Leonard JL, Larsen PR** 1983

Evidence for two pathways of iodothyronine 5`-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil, sensitivity and response to hypothyroidism.  
*J Clin Invest* 71:992-1002

**Wakelkamp IMMJ, Bakker O, Baldeschi L, Wiersinga WM, Prummel MF** 2003

TSH-R expression and cytokine profile in orbital tissue of active vs. inactive Graves' ophthalmopathy patients.  
*Clin Endocrinol* 58(3):280-7

**Wassen FW, Moerings EP, van Toor H, De Vrey EA, Hennemann G** 1996

Effects of interleukin-1 beta on thyrotropin secretion and thyroid hormone uptake in cultured rat anterior pituitary cells.  
*Endocrinology* 137:1591-1598

**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 (6098):641-6

**Weiss RE, Forrest D, Pohlenz J** 1997

Thyrotropin regulation by thyroid hormone in thyroid hormone receptor beta-deficient mice.  
*Endocrinology* 138:3624

**Whitcher JT, Evans SW** 1990

Cytokines in disease.  
*Clinical Chemistry* 36:1269-81

**Whiteside MB, Quan N, Herkenharn M** 1999

Induction of pituitary cytokine transcripts by peripheral lipopolysaccharide.  
*Journal of Neuroendocrinology* 11: 115-120

**Wu Y, Koenig RJ** 2000

Gene regulation by thyroid hormone.

*Trends Endocrinol Metab* 11:207

**Xie J, Qian J, Wang S, Freeman ME, Epstein J, Yi Q** 2003

Novel and detrimental effects of lipopolysaccharide on in vitro generation of immature dendritic cells: involvement of mitogen-activated protein kinase p38

*The Journal of Immunology* 171:4792-4800

**Yusta B, Alarid ET, Gordon DF, Ridgway EC, Mellon PL**1998

The thyrotropin  $\beta$ - subunit gene is repressed by thyroid hormone in a novel thyrotrope cell line, mouse T $\alpha$ T1 cells.

*Endocrinology* 139 (11):4476-4482

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Köhrle für die Überlassung des Themas, Bereitstellung der benötigten Materialien und Räumlichkeiten, Möglichkeiten der Präsentation meiner Arbeitsergebnisse, anregenden Diskussionen und die über die Arbeit hinausgehende Beratung und Hilfestellung bezüglich der Planung und Organisation meiner beruflichen Orientierung und Weiterbildung. Weiter möchte ich mich bei Dr. Astrid Baur bedanken für die Betreuung und Unterstützung in der Versuchsplanung, im Versuchsaufbau, dem Erlernen von Methoden und nicht zuletzt in der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit. Darüber hinaus gilt mein Dank auch Frau Dr. Birgit Mentrup, die sich stets als Ansprechpartnerin angeboten hat, sowohl in der praktischen Phase meiner Arbeit als auch während der schriftlichen Ausarbeitungszeit und die, gerade zum Ende hin, eine von mir sehr geschätzte betreuende Funktion übernommen hat. Auch Frau PD Dr. Cornelia Schmutzler und Herr Dr. Lutz Schomburg haben sich stets als kompetente und hilfsbereite Ansprechpartner gezeigt, was mir immer eine Hilfe und Stütze war und wofür ich mich hier auch bedanken möchte. Weiter bedanke ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe Molekulare Innere Medizin der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg, dass ich dort meine Versuche durchführen konnte. Unter allen Mitarbeitern herrschte stets ein freundliches, hilfsberechtigtes und offenes Verhältnis, was ein großer Gewinn und eine angenehme Zeit für mich war.

Mein Dank gilt auch vielen Privatpersonen, die mich zu allen Zeiten begleitet haben, in Höhen und Tiefen und guten und schlechten Tagen: Julia Philipp, Eva Maria Rollmann und Nils Lazer. Besonderer Dank gilt meinen Eltern Dr. Joachim Utech und Gisa Utech und meiner Schwester Dr. Tina Utech, sowie Dr. David Conen für Verständnis, anregende Diskussionen, Unterstützung in jeglicher Hinsicht und vieles mehr.

## **Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

	Katrin Utech
	Meierweg 62
	CH- 4125 Riehen
	Tel: 0041 61 6811646
	mobil: 0041 76 4617249
e-mail privat	utech.katrin@gmx.de
e-mail geschäftlich	katrin.utech@ksbh.ch
Geburtsdatum	23.03.1977
Geburtsort	Landau/Pfalz, Deutschland
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### **Schulbildung**

1982-1986	Grundschule, Ilbesheim
1986-1996	Max-Slevogt-Gymnasium, Landau

### **Studium**

10/1996-11/1996	Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
11/1996-5/2003	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
9/1998	Ärztliche Vorprüfung
8/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
3/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Praktika und Famulaturen**

6/1996-8/1996	Pflegepraktikum im Städtischen Krankenhaus Landau
3/1997-4/1997	Pflegepraktikum im St. Agatha Krankenhaus in Köln
3/1999-4/1999	Famulatur in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Ludwigshafen
9/1999-10/1999	Famulatur im Pathologischen Institut der Universität Wien
8/2000-9/2000	Famulatur im Städtischen Krankenhaus Landau, Medizin
3/2001-5/2001	Famulatur in der endokrinologischen Klinik an der University of Massachusetts in Worcester/USA
4/2002-8/2002	Praktisches Jahr Innere Medizin Universitätsspital Basel, Schweiz
8/2002-12/2002	Praktisches Jahr Chirurgie Kantonsspital Baden, Schweiz

12/2002-3/2002

Praktisches Jahr Radiologie  
Universitätsspital Basel, Schweiz

### **Sonstige klinische Tätigkeiten**

5/1997-6/2001

Nachtwachen in der Medizinischen  
Klinik der Universität Würzburg  
Perfusionsdienst (studentische  
Hilfskraft im OP bei Explantationen),  
organisiert durch die DSO (Deutsche  
Stiftung Organtransplantation)

1/2000-12/2001

### **Klinische Tätigkeiten**

8/2003-3/2004

Medizinische Poliklinik  
Universitätsspital Basel,  
wissenschaftliche Assistentin und  
Assistenzärztin

4/2004 bis heute

Kantonsspital Bruderholz, Schweiz,  
Assistenzärztin