

**Aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der  
Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg  
Leiter: Prof. Dr. H. Wajant**

**Sequenzanalyse des humanen  
5'-Deiodase (Typ I) -Gens  
bei Patienten mit  
Schilddrüsenfunktionsstörungen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Michael Wohlleben  
aus Würzburg  
Würzburg Mai 2003**

Referent: Prof. Dr. J. Köhrle

Koreferent: Prof. Dr. T. Grimm

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2004

Der Promovend ist Arzt.

für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1	Einführung .....	1
1.1	Das Schilddrüsenhormon-System .....	1
1.2	Die Enzymfamilie der Deiodasen .....	6
1.3	Die Typ I-5'-Deiodase .....	8
1.3.1	Das Gen der Typ I-5'-Deiodase.....	11
1.4	Schilddrüse und Spurenelemente .....	13
1.5	Molekulare Pathogenese von Schilddrüsenfunktionsstörungen .....	16
1.5.1	Störungen der Hormonbildung .....	16
1.5.2	Störung der Hormontransportproteine.....	16
1.5.3	Störungen der Hormonwirkung: Schilddrüsenhormon-Resistenz .....	17
1.5.4	Störungen der Hormonaktivierung .....	17
1.5.4.1	Tiermodelle für Veränderungen der 5'DI.....	17
1.5.4.2	Veränderungen der 5'DI beim Menschen .....	19
1.5.5	Störungen der Hormoninaktivierung.....	20
1.6	Problemstellung und Ziele der Arbeit.....	21
2	Patienten, Material und Methoden.....	22
2.1	Untersuchte DNA-Proben .....	22
2.1.1	Gesunde Probanden .....	22
2.1.2	Patienten .....	22
2.2	Materialien .....	26
2.2.1	Chemikalien.....	26
2.2.2	Geräte.....	26
2.3	Methoden .....	27
2.3.1	DNA-Extraktion aus Blutzellen.....	27
2.3.2	Spezifische DNA-Amplifizierung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion .....	28
2.3.3	Analyse und Reinigung der PCR-Produkte .....	31
2.3.4	Sequenzierung eines DNA-Abschnittes .....	34

3	Ergebnisse.....	38
3.1	Modifizierung des Verfahrens .....	38
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	38
3.1.2	Sequenzierung.....	41
3.2	Ergebnisse der Sequenzierung .....	43
3.2.1	Gesunde Probanden .....	43
3.2.2	Patienten .....	43
4	Diskussion.....	46
5	Zusammenfassung .....	52
6	Literaturverzeichnis .....	53
7	Anhang.....	63
7.1	Gensequenz der Typ I-5'-Deiodase .....	63
7.2	Aminosäuresequenz der Typ I-5'-Deiodase.....	65

## Abkürzungen

5'DI	-	Typ I-5'-Deiodase
5'DII	-	Typ II-5'-Deiodase
5D	-	5-Deiodase ("Typ III")
A	-	Adenin
bp	-	(DNA-) Basenpaare
C	-	Cytosin
cAMP	-	zyklisches Adenosinmonophosphat
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
G	-	Guanin
gDNA	-	genomische Desoxyribonukleinsäure
GPx	-	Glutathionperoxidase
MIT	-	Monoiodtyrosin
PCR	-	„polymerase-chain-reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
rpm	-	Umdrehungen pro Minute
rT <sub>3</sub>	-	reverses Triiodthyronin = 3,3',5'-Triiodthyronin
SeCys	-	Selenocystein
ER	-	endoplasmatisches Retikulum
T	-	Thymin
T <sub>3</sub>	-	3,3',5-Triiodthyronin
T <sub>4</sub>	-	3,3',5,5',-Tetraiodthyronin = L-Thyroxin
TPO	-	Thyroperoxidase
TRH	-	„thyrotropin-releasing hormone“, Thyroliberin
TSH	-	thyroidea-stimulierendes Hormon, Thyrotropin
U	-	„unit“, eine enzymatische Einheit
U	-	Uracil
ZNS	-	Zentrales Nervensystem

übliche SI-Einheiten

# 1 Einführung

## 1.1 Das Schilddrüsenhormon-System

Die Schilddrüse (Glandula thyroidea) ist ein aus zwei Lappen bestehendes ungewöhnlich gut durchblutetes endokrines Organ, das der Trachea an ihrer 2.-3. Knorpelspange unmittelbar aufliegt und in seiner Ausdehnung großen individuellen Schwankungen unterworfen ist. Durchschnittlich sind die beiden Seitenlappen 3-4cm hoch und 1-2cm dick. Daraus resultiert zusammen mit dem sie verbindenden Mittellappen (Isthmus) ein Gewicht von 16-25g. Das Schilddrüsenparenchym ist histologisch in Läppchen unterteilt, die jeweils eine große Anzahl kolloidgefüllter Follikel enthalten, die von einschichtigem, in seiner Höhe dem Funktionszustand angepassten Epithel ausgekleidet werden. Dieses wird von Thyreozyten, die die Schilddrüsenhormone produzieren, gebildet.

Der Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone verläuft in mehreren Schritten (nach Köhrle J, 1999a und Voigt K, 1996):

- **Hormonbildung:** Aus aktiv aus dem Blut aufgenommenen Aminosäuren werden in der Zelle verschiedene Vorstufen des Thyreoglobulins (Tg) gebildet, am GOLGI-Apparat glykosyliert und als vollständiges, jedoch noch nicht iodiertes Thyreoglobulin in das Follikellumen abgegeben. Durch die membrangebundene Thyroperoxidase (ein Hämprotein) wird an der apikalen Membranoberfläche die Iodierung des im Thyreoglobulin gebundenen Tyrosins katalysiert, wodurch Monoiodtyrosin und Diiiodtyrosin entstehen. Bei der Kopplung von Monoiodtyrosin mit Diiiodtyrosin oder zweier Diiiodtyrosin-Moleküle werden schließlich Triiodthyronin (T<sub>3</sub>) beziehungsweise Tetraiodthyronin (T<sub>4</sub>) gebildet. Dabei übersteigt bei ausreichender Iodversorgung die Menge an T<sub>4</sub> (etwa 100µg/d) bei weitem die des entstandenen T<sub>3</sub>. Das benötigte Iod wird in Form von Iodid (I<sup>-</sup>) von der Schilddrüsenzelle über den Natrium-Iodid-Symporter „NIS“ an der basolateralen Plasmamembran aufgenommen und zum apikalen Zellpol transportiert (Übersicht in: Schmutzler C, Köhrle J, 1998), wo es über erleichterte Diffusion mit Hilfe des Iodidkanalproteins „Pendrin“ ins Follikellumen gelangt (Royaux IE et al., 2000;

Scott DA et al., 1999; ). Nach Oxidation zu elementarem Iod ( $I_2$ ) durch die TPO wird es unter Beteiligung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) wie oben beschrieben in Tyrosin eingebaut.  $H_2O_2$  entsteht dabei durch die NADPH-abhängige Thyrooxidase (ThOx), die ebenfalls an der apikalen Plasmamembran extrazellulär orientiert gelegen ist.

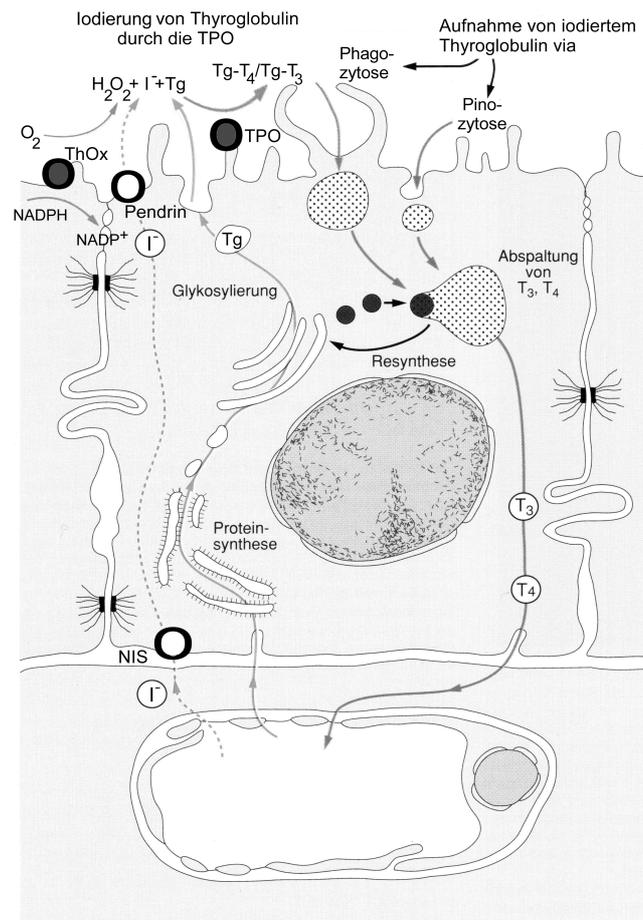


Abbildung 1: Thyreozyt  
(modifiziert nach Fleischhauer K, Groscurth P, 1993)

- **Sekretmobilisierung:** Die Abgabe des so entstandenen T<sub>4</sub> beziehungsweise T<sub>3</sub> erfolgt auf Stimulation durch TSH aus der Adenohypophyse, die ihrerseits in ihrer Sekretion von TRH aus dem Hypothalamus beeinflusst wird. Zwischen T<sub>3</sub> und TSH beziehungsweise zwischen T<sub>3</sub> und TRH besteht eine Regulation im Sinne einer negativen Rückkopplung (negatives „feed-back“). Auf den Stimulationsreiz des TSH hin nehmen die Thyreozyten das im Lumen gespeicherte Kolloid durch

Mikropinozytose beziehungsweise Endozytose auf und spalten es hydrolytisch in ihren Lysosomen. Das dabei entstandene  $T_4$  und  $T_3$  gelangt an der basalen Zellseite auf bislang unbekannte Weise in die Blut- und Lymphbahn, die übrigen Thyroglobulinreste werden in einem „Wiederverwertungskreislauf“ zur Neusynthese von weiteren Hormonmolekülen verwendet, soweit sie nicht ebenfalls sezerniert werden.

- **Transport und Aufnahme in die Zelle:** Die freigesetzten Schilddrüsenhormone müssen aufgrund ihrer ausgeprägten Lipophilie im Blut an Transportproteine gebunden werden, um an ihren Bestimmungsort zu gelangen (nur etwa 0.03% des gesamten  $T_4$  liegen im Plasma in freier Form vor). Diese Aufgabe erfüllen das Thyroxin-bindende Globulin (= TBG), das nur bei höheren Säugern zu finden ist, das im Tierreich weit verbreitete Transthyretin (= TTR, früher: „ $T_4$ -bindendes Präalbumin = TBPA“), sowie das Albumin, das hohe Kapazität aber geringere Affinität zu den Schilddrüsenhormonen besitzt.  $T_4$  wird hierbei im Vergleich zu  $T_3$  bevorzugt an die genannten Transportmoleküle gebunden.

Wie die Passage der Blut-Gewebe-Schranke erfolgt, ist bislang nicht beschrieben, in die Zellen gelangt das zwitterionische  $T_4$  carriervermittelt. Für  $T_3$  und  $T_4$  (möglicherweise auch für ihre Metaboliten) ist auch die Aufnahme über Transportmoleküle aus der Klasse der „organic anion transporters“ (oatp2 und 3) gezeigt worden (Abe T et al., 1998).

In der Zelle selbst sind mehrere zytosolische und kompartimentgebundene Bindungsproteine für Schilddrüsenhormone bekannt.

- **Aktivierung:** Wie bei anderen niedermolekularen, lipophilen Hormonen, die über ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren vom c-erbA-Typ wirken (beispielsweise auch Vitamin  $D_3$ , Retinol oder Steroidhormone, wie Sexualhormone, Gluco- und Mineralocortikoide), spielt die Zielzell-spezifische Aktivierung und Inaktivierung von Prohormonen als biologisches Prinzip der lokalen Feinregulation auch für die Schilddrüsenhormonwirkung eine große Rolle. Hinweise darauf, dass dieses Prinzip hier in Form der peripheren Bildung von  $T_3$  aus seinem „Vorläufer“  $T_4$  - gilt, ergaben sich aus der Isolierung von  $T_3$  aus dem Plasma thyreidektomierter Patienten, die als Hormonsubstitution nur  $T_4$  erhalten hatten (Braverman LE et al., 1970). Das gefundene  $T_3$  konnte offenbar nur außerhalb der Schilddrüse entstanden

sein, und in der Tat stammen beim Menschen nur etwa 20-30% des gesamten  $T_3$  (etwa 30  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) von der Schilddrüse selbst, die restlichen 80% werden durch Deiodierung, die vor allem in der Leber stattfindet, gebildet. Dieser relativ geringe Anteil scheint jedoch für einen regelrechten Hormonhaushalt durchaus von Bedeutung zu sein (Bunevičius R et al., 1999).

So setzt die Schilddrüse beispielsweise im Zustand des Iodmangels und bei erhöhtem TSH-Spiegel vermehrt  $T_3$  frei. Ob das in ihr deiodierte  $T_4$  aus der Zirkulation oder aus hydrolytischer Spaltung von Vorläufern aus der Drüse selbst stammt, bleibt zu klären. Den physiologisch bedeutsamen Schritt der Aktivierung des  $T_4$  in der Schilddrüse und in der Peripherie übernimmt die Enzymfamilie der Deiodasen, vor allem die 5' DI.

- **Inaktivierung:** Die Inaktivierung der Schilddrüsenhormone erfolgt auf zwei Wegen: Innerhalb der Zelle sind hierbei neben Modifizierung der Aminosäurekette durch reduktive und oxidative Dekarboxylierung, Desaminierung und anderen Reaktionen vor allem die Deiodierung durch die Deiodase-Isoenzyme und die Konjugation am Phenolring (Sulfatierung, Glukuronidierung u.a.) wichtig. Wenig ist bekannt über den extrazellulären Metabolismus der Schilddrüsenhormone, etwa eine spezifische Deiodierung, wie sie in der Schilddrüse beim „Iod-Recycling“ aus Monoiodtyrosin und Diiodtyrosin vorkommt.

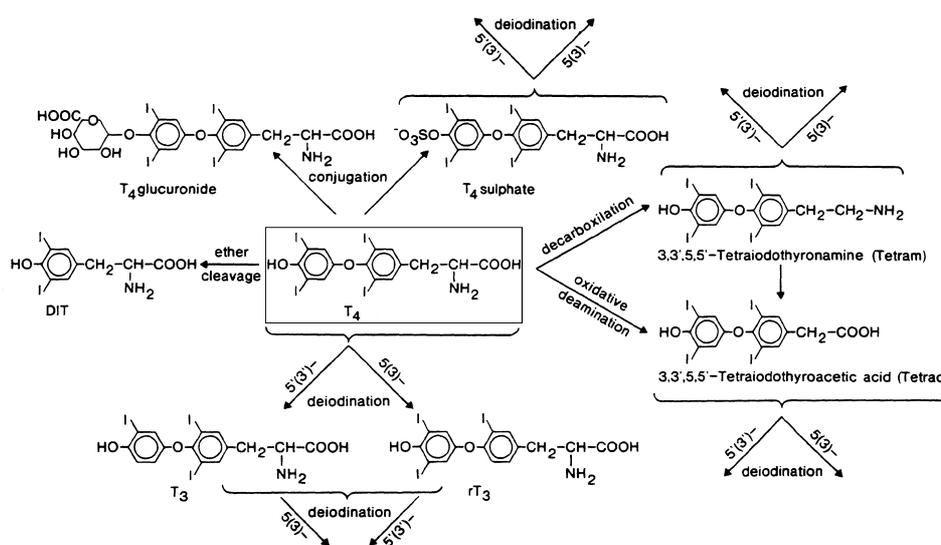


Abbildung 2: Schilddrüsenhormonmetabolismus (nach Köhrle J, 1994)

Die Schilddrüsenhormone spielen eine entscheidende Rolle in Gesamtstoffwechsel und Energiehaushalt sowie bei der körperlichen Entwicklung, besonders der des zentralen Nervensystems. Die meisten Effekte werden dabei durch  $T_3$  hervorgerufen, wobei jedoch auch  $T_4$  eine Anzahl von Wirkungen ausübt, die denen von  $rT_3$  oder 3,5-Diiodthyronin ähneln und nicht über nukleäre Rezeptoren vermittelt werden.

#### Schilddrüsenhormone

- steigern die Proteinsynthese über einen  $T_3$ -Rezeptor-vermittelten Mechanismus der Modulation der Transkription im nukleären oder mitochondrialen Kompartiment.
- erhöhen die Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase sowie den Sauerstoffverbrauch, was zu einer Zunahme des Grundumsatzes und einem Anstieg der Körpertemperatur führt. Der erhöhte  $O_2$ -Verbrauch stimuliert außerdem die Erythropoetinausschüttung und damit die Erythropoese.
- heben den Blutglukosespiegel durch Stimulation der Glykogenolyse und Glukoneogenese, die mit einer gleichzeitigen Steigerung der Glykolyse einhergehen, stimulieren die Lipolyse, den Abbau von Lipoproteinen und die Ausscheidung von Gallensäuren, und sie fördern allgemein die Darmfunktion.
- sensibilisieren die Zielorgane für Katecholamine, was beispielsweise über  $\beta_1$ -Rezeptoren zu einer Zunahme von Herzfrequenz und Schlagkraft des Herzmuskels führt.
- haben schnelle Effekte (wie die Steigerung der neuromuskulären Erregbarkeit) auf Zellmembran-Ebene durch membrangebundene  $T_3$ -Rezeptoren, Ionenkanal- und Zytoskelett-assoziierte Mechanismen und auf der Ebene der Protein- oder Enzymfunktion durch ligandenabhängige Modulation.

Die Glandula thyroidea produziert neben den klassischen Schilddrüsenhormonen in den sog. parafollikulären oder C-Zellen das den Calcium-Haushalt regulierende Calcitonin, worauf hier jedoch nicht genauer eingegangen werden soll.

## 1.2 Die Enzymfamilie der Deiodasen

Die Enzymfamilie der Deiodasen spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivität der Schilddrüsenhormone, weshalb die Isoenzyme als „Türhüter“ der Schilddrüsenfunktion bezeichnet worden sind (Köhrle J, 1996).

Drei Vertreter dieser Enzymfamilie sind bekannt, die im Organismus unterschiedlich verteilt vorliegen und in seiner Entwicklung verschieden stark exprimiert werden, um zu jedem Zeitpunkt die optimale Versorgung mit aktivierten Schilddrüsenhormonen zu gewährleisten (Bates JM et al., 1999; Darras VM et al., 1999; Richard K et al., 1998):

- Typ II-5'-Deiodase

Sie aktiviert  $T_4$  zu  $T_3$  nach einem sequenziellen Reaktionsmechanismus vor allem auf lokaler Ebene und sichert damit die Versorgung des jeweiligen Gewebes mit aktiviertem Schilddrüsenhormon unabhängig vom zirkulierenden  $T_3$ -Pool. Die Expression erfolgt in der Schilddrüse, im ZNS, wo sie besonders an der Entwicklung des Gewebes und an der Steuerung des zirkadianen Rhythmus beteiligt ist, in der hypothyreoten Adenohypophyse, der Plazenta und der Haut, sowie im braunen Fettgewebe (brown adipose tissue (BAT)) bei Nagern (Salvatore D et al., 1996). Dort greift sie in das komplexe Geschehen der Thermogenese ein. Die Aktivität der 5'DII ist im Zustand der Hypothyreose erhöht und wird durch  $T_4$  und  $rT_3$  nicht jedoch durch  $T_3$  vermindert, wobei Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett wichtig sind. Über die Selenabhängigkeit der 5'DII Aktivität liegen unterschiedliche Daten vor, bei der Ratte existiert offenbar eine selenfreie Untereinheit des Enzyms (Buettner C et al., 1998; Leonard DM et al., 2000; Safran M et al., 1991).

- 5-Deiodase („Typ III“)

Die 5D inaktiviert  $T_4$  und  $T_3$  und eliminiert weitere Schilddrüsenhormonmetabolite wie beispielsweise  $rT_3$  durch Deiodierungen am Tyrosylring ebenfalls durch eine sequenzielle Reaktion. Die Produkte aus dieser Reaktion haben keine biologische Funktion mehr im Sinne einer Bindung an den  $T_3$ -Rezeptor, was der 5D die Aufgabe des Abbaus von Schilddrüsenhormonen und damit beispielsweise den Schutz der Gewebe vor übermäßiger Hormonlast im hyperthyreoten Zustand zukommen lässt.

Hierbei ist ihre Aktivität erhöht. Die 5D wird in den meisten Organen außer in Niere, Leber, Schilddrüse und Hypophyse exprimiert.

Das Enzym konnte als Selenoprotein mit einem UGA-Codon und einem funktionellen SECIS-Element in der mRNA identifiziert werden (Salvatore D et al., 1995).

Auf das dritte Mitglied der Enzymfamilie, die Typ I-5'-Deiodase wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

Einen Überblick über die Isoenzyme gibt folgende Tabelle (nach Köhrle J, 1999a):

Eigenschaft	Typ I 5'-Deiodase	Typ II 5'-Deiodase	5-Deiodase
<b>Reaktionskinetik</b>	ping-pong	sequentiell	sequentiell
<b>Bevorzugtes Substrat</b>	$rT_3 \gg T_4 \gg T_3$	$T_4 > rT_3$	$T_3$ (-Sulfat) $> T_4$
<b>Inhibitoren:</b>			
Thiouracile	++++	-/+	-
Iopansäure	++++	++++	++++
Iodazetat	++++	+	?
Flavonoide	++++	+++	+
<b>Molekulargewicht</b>	55000, 27kDa Untereinheit	200000, 29kDa Untereinheit	unbekannt, 32kDa Untereinheit
<b>Humane Genlokalisierung und -Struktur</b>	1p32-p33, 17.5kb, 4 Exons	14q24.2-q24.3, 2 Exons, 7.4kb Intron	14q32 1 Exon
<b>Gewebeverteilung</b>	Schilddrüse, Niere, Leber, euthyreote Hypophyse, ZNS	Schilddrüse, ZNS, Hypophyse, braunes Fettgewebe	nahezu alle Gewebe außer Leber, Niere, Schilddrüse, Hypophyse
<b>subzelluläre Lokalisation</b>	Leber: ER, Niere: basolaterale Plasmamembran	mikrosomale Membranen	mikrosomale Membranen
<b>Aktivität bei Hyperthyreose</b>	erhöht	vermindert	erhöht
<b>Aktivität bei Hypothyreose</b>	vermindert	erhöht	vermindert
<b>Aktivität im „low-<math>T_3</math>-Syndrom“</b>	vermindert	keine Veränderung	keine Veränderung
<b>Aminosäuren im aktiven Zentrum</b>	SeCys, Histidin, Phenylalanin	SeCys oder Cystein?	SeCys

+ = Stärke der Inhibition; - = keine Inhibition; ? = unbekannt oder fraglich

### 1.3 Die Typ I-5'-Deiodase

Die 5' DI ist eines der Schlüsselenzyme in Stoffwechsel und Regulation der Aktivität der Schilddrüsenhormone. Das im aktiven Zentrum des Proteins vorhandene Selenocystein (SeCys) ist essentiell für die Aktivität, was durch gezielte Mutationen und Austausch gegen Cystein gezeigt werden kann (Berry MJ et al., 1991c). Dabei sinkt trotz vermehrter Translation die katalytische Effizienz des veränderten Proteins (Berry MJ et al., 1992a). Der Austausch der in verschiedenen Spezies konservierten Cysteinmoleküle des Proteins hat keine größeren Auswirkungen auf die Aktivität, vielmehr sind zwei Histidin- und ein Phenylalaninmolekül im aktiven Zentrum für eine regelrechte Funktion der 5' DI wichtig (Berry MJ, 1992b; Croteau W et al., 1998). Das Enzym entfernt Iod von der 5'- oder 3'-Position in  $T_4$ ,  $T_3$ ,  $rT_3$ ,  $3,3'$ - $T_2$ ,  $3',5'$ - $T_2$  und  $3'$ - $T_1$  und aktiviert damit beispielweise das von der Schilddrüse sezernierte  $T_4$  in seine biologisch aktivere Form  $T_3$  beziehungsweise inaktiviert Schilddrüsenhormone und ihre Metabolite (Moreno M et al., 1994). Bevorzugt wird hierbei  $rT_3$  umgesetzt. Zusätzlich inaktiviert die 5' DI  $T_3$  (vor allem in sulfatisierter Form), besonders im hyperthyreoten Zustand. Nicht näher bekannte Veränderungen im aktiven Zentrum des Enzyms begründen diese „Promiskuität“ in der Wahl des Substrats (Köhrle J, 1996). Die Reaktion erfolgt nach einem zweistufigen „ping-pong“-Mechanismus, wobei - wie bei den anderen beiden Deiodaseisoformen - Kosubstrate oder -faktoren noch nicht identifiziert sind. Die im Vergleich zu den Reaktionen des Intermediärstoffwechsels relativ geringen Umsatzraten der Schilddrüsenhormone könnten aber auch den Verbrauch der Enzyme bei der Reaktion ermöglichen und damit Kofaktoren unnötig machen (Köhrle J, 1999a). Neben der genannten Reaktion katalysiert die 5' DI bevorzugt im alkalischen pH-Bereich auch die Deiodierung am 5- beziehungsweise 3-Iodatom, wodurch das in Bezug auf eine Schilddrüsenhormon-Wirkung nicht mehr potente  $rT_3$  entsteht.

Die 5' DI wird vor allem in Leber, Niere, Schilddrüse, euthyreoter Hypophyse und dem ZNS exprimiert. Innerhalb der einzelnen Organe ist sie in der Leber im rauhen und glatten ER und in der Niere im S3-Segment des proximalen Tubulus in der basolateralen Plasmamembran lokalisiert.

Das aktive Zentrum ist dabei jeweils zum Zytosol hin ausgerichtet (Fekkes D et al., 1979; Lee WS et al., 1993; Leonard JL et al., 1991).

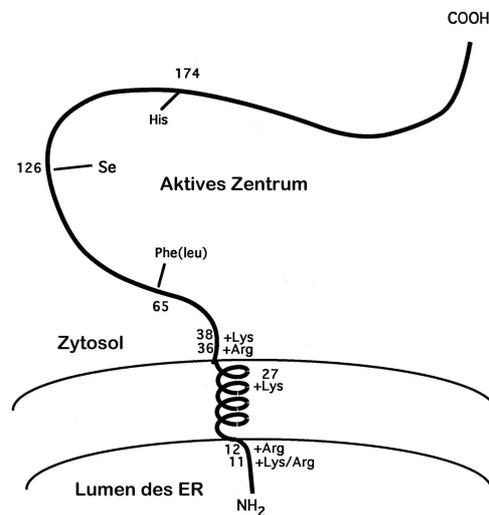


Abbildung 3: Hypothetische Ausrichtung der 5'DI in der ER-Membran (modifiziert nach Toyoda N et al., 1995)

Die genaue Lokalisation der 5'DI in der Schilddrüse ist nicht bekannt.

Durch ihre Aktivität in Leber und Niere erzeugt die 5'DI 70-80% des peripher gebildeten  $T_3$ . Der Beitrag aus den anderen Organen wie Muskeln, Haut und Magen-Darm-Trakt ist normalerweise gering. Die 5'DI ist damit das Enzym, das unter normalen Bedingungen die Versorgung des Organismus als Gesamtheit mit  $T_3$  gewährleistet.

Eine andere wichtige Aufgabe der 5'DI ist die Teilnahme am feedback-Mechanismus der Schilddrüsenhormone in den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse. Liegt  $T_3$  in ausreichenden Mengen im Plasma vor, stimuliert es die Expression und Aktivität der 5'DI, was einen Anstieg von  $T_3$  im Gewebe der Hypophyse nach sich zieht. Die Synthese der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des TSH wiederum wird vom entstandenen  $T_3$  unterdrückt, wodurch die Schilddrüse nicht weiter zur Hormonproduktion angeregt wird (Köhrle et al., 1995; Köhrle J, 1999a). (Die verminderte Aktivität der 5'DII, die auch einen Einfluss auf den Regelkreis hat, kann in diesem Zusammenhang noch nicht schlüssig erklärt werden und ist möglicherweise für die Anpassung in der hypothyreoten Stoffwechselkonstellation von Bedeutung.) Eine Wirkung auf die somatotropen (auch hier wird die 5'DI durch  $T_3$  stimuliert), gonatotropen und corticotropen Zellen des

Organs gibt darüber hinaus Anhaltspunkte für weitere systemische Regulationsprozesse der Schilddrüsenhormone (Baur A, Köhrle J, 1999).

Das Enzym wird in Expression und Aktivität durch mehrere Stoffe vielfältig variiert: Die Expression des Homodimers aus zwei p27-Untereinheiten wird durch Schilddrüsenhormone selbst, durch Retinoide in follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen und durch TSH mit cAMP als „second messenger“ in Thyreozyten stimuliert (Schreck R et al., 1994; Toyoda et al., 1992). Auch die Aktivität der 5' DI wird durch  $T_3$ , das somit seine eigene Produktion anregt, und durch TSH in der Schilddrüse gesteigert (Toyoda N et al., 1990). Aktivitätshemmend dagegen wirken natürliches  $T_4$  und  $rT_3$ , das dadurch seine Entstehung selbst negativ beeinflusst (Kaminski T et al., 1981), 6-n-Propyl-2-Thio-Uracil (PTU), das für funktionelle Analysen in vitro Verwendung finden kann, Röntgenkontrastmittel wie Iopansäure, das antiarrhythmische Medikament Amiodaron, sowie Methimazol, Propranolol und antiinflammatorische und antiphlogistische Medikamente wie Goldverbindungen. Die genannten Stoffe haben aber zur thyreostatischen Therapie in ihrer Deiodasehemmenden Wirkung bislang keine klinische Relevanz (Die antithyroide Wirkung von PTU hingegen beruht auf der Hemmung der TPO in der Schilddrüsenhormonsynthese) (Köhrle J, 1999a).

Verminderte Aktivität der Leber-5' DI tritt auch im Hungerzustand, bei schwerer systemischer Krankheit, Sepsis oder nach großen chirurgischen Eingriffen und Traumen auf. Eine ähnliche Beobachtung wird auch in dem Zustand gemacht, der phänomenologisch als „low- $T_3$ -syndrome“, „euthyroid-sick-syndrome“ oder „non-thyroidal illness“ bezeichnet wird. Der genaue Mechanismus dieser Störung ist nicht geklärt. Eine verminderte 5' DI-Aktivität, die mit Erhöhung von TSH, Steigerung der Iodaufnahme der Schilddrüse und Erhöhung der Konzentrationen von  $T_4$ ,  $rT_3$ , und 3',5'- $T_2$  und einer Verminderung von  $T_3$ , 3,3'- $T_2$ , 3,5- $T_2$  einhergehen sollte, könnte zur Entstehung beitragen. Neben Effekten auf andere Organsysteme wird im Plasma der Patienten erhöhtes  $T_4$  und  $rT_3$  bei erniedrigtem  $T_3$  gefunden, was eine weitgehend ungestörte Produktion der Hormone durch die Schilddrüse („non-thyroidal“) und eine normale Funktion der 5D, allerdings unzureichenden Abbau (erhöhtes  $rT_3$ ) und ungenügende Aktivierung (vermindertes  $T_3$ ) durch die 5' DI widerspiegelt. Da die 5' DI

keinen nennenswerten Beitrag zum zirkulierenden  $T_3$  liefert, kann sie den Funktionsverlust der 5'DI wohl nicht ausgleichen.

Der Abfall ihrer Aktivität wird von verschiedenen Autoren durch Zytokine, eine generell verminderte Proteinsyntheseleistung der Leber wie im Zustand der „akuten Phase“ oder auch durch Selenmangel erklärt, ohne dass der Beitrag der einzelnen Faktoren endgültig geklärt ist. Neben diesen Veränderungen sind wohl auch gestörte Eiweißbindungen und Aufnahme der Hormone in die Leberzellen an der Pathogenese des „low- $T_3$ -syndromes“ beteiligt (Bartalena L et al., 1998; Davies PH et al., 1997; McIver B, Gorman CA, 1997; Reinhardt W, Mann K, 1998; Schilling JU et al., 1999; Vos RA et al., 1995;).

### 1.3.1 Das Gen der Typ I-5'-Deiodase

Das Gen der 5'DI liegt auf dem kurzen Arm des 1. Chromosoms im Bereich 1p32-p33:



Abbildung 4: Chromosom 1  
(nach Jakobs TC et al., 1997a)

Es hat eine Gesamtlänge von 17.5kbp und besteht aus vier Exons, die von drei Introns der Größen 10.1, 1.3 und 3.9kbp getrennt werden (Jakobs TC et al., 1997a). Die aus ihm transkribierte mRNA hat eine Länge von 2222bp. Exon 1 reicht bis Base 362 der mRNA und enthält das Start-Codon AUG an der Stelle 25-27. Exon 2 umfasst die Basen 363-517 und trägt am Codon 126 die Information zum Einbau von SeCys. Die Basen 518-715 bilden das Exon 3 und die restlichen Nukleotide 716-2222 formen das 4. Exon, das am Codon 250 den Translationsstop markiert (Toyoda N et al., 1996).

---

Die 3'-untranslatierte Region der mRNA beinhaltet das für den SeCys-Einbau essentielle SECIS-Element („selenocysteine-insertion element“) (Berry MJ et al., 1991a).

Der Promotor des 5'DI-Gens enthält T<sub>3</sub>-(DR+4) und Retinsäure-responsive Elemente, sowie eine Erkennungsstelle für SP-1 (GC-reiche Sequenz), ist aber frei von TATA- oder CAAT-Boxen (Jakobs TC et al., 1997b). Bislang sind, wie unten genauer beschrieben wird, außer Polymorphismen im Promotorbereich, die keine Änderung in der Genexpression nach sich ziehen, keine relevanten Veränderungen im Gen der 5'DI beim Menschen bekannt. (Köhrle J et al., 1997; Toyoda N et al., 1996).

## 1.4 Schilddrüse und Spurenelemente

Der Zusammenhang zwischen einer regelrechten Schilddrüsenfunktion und dem Spurenelement Iod ist schon länger bekannt. Der Mensch benötigt davon etwa 150 µg/d, die er in Form von Iodid mit der Nahrung aufnimmt. In den Schilddrüsenhormonen T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> ist Iod ein essentieller Bestandteil und Iodmangel, wie er in vielen Gebieten der Erde (z.B. auch in Deutschland) vorkommt, hat vielfältige negative Auswirkungen auf Wachstum und körperliche Reifung. Folgen einer Unterversorgung mit Iod in der Entwicklung sind unter anderem Strumabildung, Minderwuchs, Innenohrschäden, mentale Retardierung und Lähmungen. Die Schilddrüsenparameter im Plasma verändern sich dabei so, dass T<sub>4</sub> abfällt, TSH ansteigt und T<sub>3</sub> normal oder ebenfalls leicht erhöht ist (Lang F, 1998; Obregón MJ et al., 1991).

Neben Iod ist in den letzten Jahren ein weiteres Spurenelement, das früher noch als hoch toxisch und karzinogen galt, als unverzichtbar für die Funktion der Schilddrüse erkannt worden: Selen. Es kommt im Organismus in Enzymen vor allem in Form von Selenocystein, der 21. Aminosäure, vor. Bislang sind 11 Selenoproteine bekannt, zu denen die Deiodasen, mehrere Formen der Glutathionperoxidase, Selenoprotein P und W, Thioredoxin-Reduktasen und die Selenophosphat-Synthetase gehören. Diese Enzyme sind meist an Redoxprozessen beteiligt. Neben dem Codon UGA in der mRNA, das normalerweise ein Stop-Signal für die Translation darstellt, sind für die Synthese der Selenoproteine einige Besonderheiten wie spezielle Elongationsfaktoren oder das SECIS-Element („selenocysteine-insertion element“) im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA zur „Umgehung“ des Stop-Signals nötig (Übersicht in: Holben DH, Smith AM, 1999).

Die Schilddrüse, die drei Formen der Glutathionperoxidase (cGPx, pGPx, PH-GPx), Selenoprotein P und die 5'DI und 5'DII exprimiert, hat von allen Organen den höchsten Selengehalt pro g Gewebe (Dickson RC, Tomlinson RH, 1967). In der Hierarchie der Selenverteilung innerhalb der Organe nimmt die Schilddrüse neben dem ZNS einen der ersten Plätze ein, was sich in der Speicherung des Elements im Gegensatz zur Mobilisierung aus anderen Organen wie der Skelettmuskulatur bei Selenmangel ausdrückt (Bermano G et al., 1995). Auch intrazellulär besteht eine Rangordnung in der

Verteilung des Elements: Für die Expression der 5'DI ist beispielsweise nur etwa 1/10 der Menge an Selen in der Nahrung (i.e. etwa 20 µg/d) nötig wie für die der GPx, die als funktioneller Parameter für die Bestimmung des Selenstatus herangezogen werden kann (Oertel M et al., 1993). (Einschränkend ist hierbei zu sagen, dass der Gehalt der Zellen an 5'DI deutlich geringer ist als der an GPx, was zu einem kleineren Pool an Selen in der 5'DI und damit geringeren benötigten Mengen führt.)

Eine selenabhängige Synthese ist für die 5'DI und 5D bekannt, für die 5'DII ist dies nicht eindeutig geklärt (siehe oben). Bei gravierender Unterversorgung fällt die Aktivität der Leber-5'DI bei der Ratte um bis zu 95%, der Gehalt an mRNA um etwa 50%. Die normalerweise gegebene Stimulation der 5'DI durch T<sub>3</sub> hat dann nahezu keinen Einfluss. Der mRNA-Gehalt allerdings kann durch T<sub>3</sub> unabhängig vom Selenstatus wieder auf normale Werte angehoben werden. Diese Tatsache lässt auf eine Regulation auf der Ebene der Translation schließen, möglicherweise über einen Block des UGA-vermittelten Selenocysteineinbaus im Selenmangelzustand oder eine Veränderung der mRNA-Stabilität (Bermano G et al., 1995; DePalo D et al., 1994). Anders dagegen verhält sich die Schilddrüse bei Selenmangel: Hier steigen 5'DI-Aktivität um 15%, mRNA-Gehalt um 95% und die Produktion von Schilddrüsenhormonen, wobei Iodspeicher der Drüse abgebaut werden. Peripher ergibt sich insgesamt aber ein Abfall von T<sub>3</sub> im Plasma, während T<sub>4</sub> ansteigt. TSH, das normalerweise abfallen sollte, bleibt im Normbereich. Dies könnte durch eine Störung des feed-back-Mechanismus in der Hypophyse, der den Anstieg an T<sub>4</sub> messen sollte, erklärt werden. In der Folge sollte sich eine erhöhte lokale T<sub>3</sub>-Produktion mit Hilfe der 5'DI und 5'DII ergeben, die wiederum die TSH-Bildung herabsetzt. In dieser Fehlfunktion des Regelkreises scheint auch die Beeinflussung der Deiodase-Isoenzyme durch proinflammatorische Zytokine, die aktivierend auf ihre Funktion wirken, eine große Rolle zu spielen (Arthur JR et al., 1993; Baur A et al., 2000; Beckett GJ et al., 1989; Bermano G et al., 1995).

Die genannten Veränderungen sind nach Selengabe reversibel, wobei die 5'DI-Aktivität homöostatisch kontrolliert ist und durch zusätzliche Gabe nicht gesteigert werden kann (Behne D, Kyriakopoulos A, 1993).

Neben den direkten Veränderungen im Schilddrüsenhormon-Haushalt ist inadäquate Selenversorgung offenbar mit der Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen verbunden

und scheint in die Pathogenese des myxödematösen Kretinismus involviert, der mit Anzeichen von Hypothyreose, mentaler Retardierung, Wachstumsdefekten und Destruktion des Schilddrüsengewebes in der Kindheit einhergeht (Contempré B et al., 1992).

An dieser Stelle werden Verbindungen zwischen Iod, Selen und der Schilddrüsenfunktion deutlich: Bei Iodmangel erfährt das Organ eine Überstimulation durch TSH, wodurch erhöhter oxidativer Stress in Form von  $H_2O_2$  auf die Zelle einwirkt. Dieser kann bei Selenmangel nicht vom „Schutzsystem“ der GPx und Glutathionreduktase abgefangen werden und führt somit zu Gewebnekrosen und Fibrosierung. Eine wichtige Rolle bei dieser letztlich inflammatorischen Reaktion spielt vermutlich TGF- $\beta$  („transforming growth factor- $\beta$ “), da durch den Einsatz von TGF- $\beta$ -Antikörpern die Fibrosierung in vitro zum Teil verhindert werden kann (Contempré B et al., 1996).

Gleichzeitig ist aber eine gesteigerte Schilddrüsenhormonsynthese möglich, da  $H_2O_2$  normalerweise der limitierende Faktor hierbei ist (Corvilian B et al., 1993).

Ein zweiter Aspekt berücksichtigt die Selenoproteinnatur der 5' DI und wird in Gebieten beobachtet, in denen beide Spurenelemente nicht ausreichend mit der Nahrung aufgenommen werden können (beispielsweise in Nord Zaire). Ersetzt man in dieser Situation nur Selen, regeneriert sich die 5' DI, was zu einem verstärkten Iodverlust des Körpers durch Deiodierung führt, aus dem erhöhte TSH-Spiegel und damit wieder erhöhter Zellstress resultieren. Zusätzlich verstärken sich die Symptome einer Schilddrüsenunterfunktion durch gesteigerten Metabolismus der Hormone.

Dadurch scheint in diesen Gebieten der Erde Selenmangel besonders in der Schwangerschaft vor übermäßigem Iodverlust der Mutter zu schützen und die Versorgung des fetalen Gehirns mit maternalem  $T_4$  zu „sichern“ (Contempré B et al., 1991).

Selen sollte in Iodmangelgebieten folglich zurückhaltend und nur nach erfolgter Iodsubstitution von außen zugeführt werden (Vanderpas JB et al., 1993).

## **1.5 Molekulare Pathogenese von Schilddrüsenfunktionsstörungen**

Neben Veränderungen, die eine regelrechte Organanlage und Entwicklung der Schilddrüse negativ beeinflussen, ist mittlerweile die molekulare Pathogenese von Funktionsstörungen der Schilddrüse auf mehreren Ebenen bekannt. Bis auf Abweichungen der 5'DI sollen diese hier nur in grober Übersicht dargestellt werden:

### **1.5.1 Störungen der Hormonbildung**

Obwohl nur etwa 15-20% aller Formen von kongenitaler Hypothyreose auf Veränderungen der Schilddrüsenhormonsynthese zurückzuführen sind, wurden in letzter Zeit zahlreiche Mutationen in Genen, die für die Bildung der Hormone mitverantwortlich sind, gefunden. Sie betreffen zum einen den Komplex des Iodtransports in den Thyreozyten in Form von Mutationen im Gen des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) und des Kanalproteins Pendrin, wobei letztere im sogenannten Pendred-Syndrom mit Taubheit verbunden sein können. Weitere Genveränderungen sind für die Thyroperoxidase (TPO) und Thyreoglobulin (Tg) beschrieben und fallen wie die erstgenannten klinisch in der Regel durch die Entwicklung einer Struma bei Hypothyreose auf. (Übersicht in: Krude H et al., 2000)

### **1.5.2 Störung der Hormontransportproteine**

Erworbene Defekte in den Transportproteinen für Schilddrüsenhormone können unter anderem durch Medikamente, Leberfunktionsstörungen oder schwere Allgemeinerkrankungen (wie Tumoren) hervorgerufen werden.

Für die drei wichtigen Transportsysteme des Thyroxin-bindenden Globulins (TBG), Transthyretins (TTR) und Albumins sind aber auch erblich bedingte Abweichungen bekannt, die sich in einem Anstieg oder Abfall der Serumkonzentration oder der Affinität zu Schilddrüsenhormonen äußern und selten auch in Kombination auftreten

können. Sie folgen verschiedenen Erbgängen und gehen klinisch meist mit euthyreoter Stoffwechsellage einher. (Übersicht in: Langsteger W, 1996)

### **1.5.3 Störungen der Hormonwirkung: Schilddrüsenhormon-Resistenz**

Das Syndrom der „Resistenz gegen Schilddrüsenhormone“, auch Refetoff-Syndrom genannt, manifestiert sich klinisch in einem recht variablen Krankheitsbild, mit euthyreoter Struma, erhöhten Serumspiegeln an freiem T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> bei normalen oder leicht erhöhten TSH-Werten.

Grundlage des Syndroms sind Mutationen im Gen des Schilddrüsenhormon-Rezeptors, von denen eine Vielzahl bekannt ist. Nahezu ausnahmslos wurden sie im Schilddrüsenhormon-Rezeptor Gen  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) in der T<sub>3</sub>-bindenden Domäne gefunden und bewirken eine herabgesetzte Wirkung der Schilddrüsenhormone in den Zielorganen. Dabei ist zu bemerken, dass auch bei heterozygoten Mutationen die regelrechte Funktion des aus zwei Untereinheiten aufgebauten Rezeptors beeinflusst werden kann, wenn eine wildtypische und eine veränderte Untereinheit aufeinander treffen. Dieses Phänomen wird als „dominant-negativer Effekt“ bezeichnet (Übersichten in: Chatterjee VK, Beck Peccoz P, 1994; Janssen OE, 1998).

### **1.5.4 Störungen der Hormonaktivierung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nur Störungen in der Aktivierung der Schilddrüsenhormone angesprochen werden, die auf Veränderungen der 5'DI zurückgeführt werden können.

#### **1.5.4.1 Tiermodelle für Veränderungen der 5'DI**

Es gibt verschiedene Tiermodelle mit Störungen im Schilddrüsenhormonstoffwechsel, bei denen 5'DI-Defekte bekannt sind oder diese als Erklärung für den Phänotyp nahe liegen:

- Mausstamm C3H/He: Er zeigt verminderten Gehalt an 5'DI-mRNA, eine verringerte Expression der p27-Untereinheit und damit nur etwa 10% der Leber-5'DI-Aktivität gegenüber dem Vergleichsstamm C57. Damit liegt hier ein normaler oder leicht erhöhter T<sub>4</sub>- bei nahezu normalen T<sub>3</sub>-Spiegeln und erhöhtem rT<sub>3</sub> vor. Als Grund für die Expressionsstörung wurde ein 21 Basen großes Insert mit fünf CTG-Wiederholungen im Promotorbereich des 5'DI-Gens angenommen. Daneben fand sich eine Restriktionsfragment-Längen-Variation (RFLV), die in einem um 150 Basen verlängerten 2. Intron begründet liegt. Die Expression des so veränderten Gens in HepG2-Zellen bestätigte diese Abweichungen als Ursache für die verminderte Expression der 5'DI. Eine veränderte Exonstruktur ist im Vergleich mit dem Wildtyp nicht nachweisbar. Ob die erhöhte Inzidenz von Leberzelltumoren bei diesen Mäusen mit den Abweichungen der 5'DI zusammenhängt ist fraglich (Maia AL et al., 1995a; Maia AL et al., 1995b; Schoemakers CHH et al., 1993).
- Mausstamm 129 B6: Diese Maus, die eine Muskeldystrophie aufweist, fällt durch eine um 50% verminderte Leber-5'DI-Aktivität auf. Dies äußert sich in normalen Serum-T<sub>4</sub>- und erniedrigten T<sub>3</sub>-Spiegeln. Daraus resultiert beispielsweise ein geringer Gehalt an Wachstumsfaktoren in der Unterkieferspeicheldrüse, die abhängig von T<sub>3</sub> exprimiert werden, dessen Bildung wiederum von der 5'DI-Aktivität geregelt wird. Die Gründe für die Veränderungen der 5'DI-Aktivität sowie für die zusätzlich bekannten Störungen in der Hypophysen-Schilddrüsen-Achse sind nicht bekannt (Watson AY et al., 1985).
- Fettleibige Zucker-Ratten (fa/fa): Im Vergleich zu den heterozygoten, schlanken Geschwistern aus einem Wurf zeigen diese Tiere geringeren Energieverbrauch und verminderte Thermogenese im braunen Fettgewebe bei Kälte und nach Norepinephrin-Stimulation. Im Plasma erscheint erniedrigtes T<sub>3</sub> trotz erhöhter T<sub>4</sub>-Spiegel. Bei thyroidektomierten Tieren aus diesem Stamm kann mit Hormonsubstitution zwar ein normaler Gehalt an T<sub>4</sub> in den Geweben des sogenannten „schnellen Pools“ (5'DI-haltig, vor allem Leber und Niere) erzielt

werden, die Synthese von  $T_3$  normalisiert sich aber nicht. Daneben hat die Gabe von PTU keinen Einfluss auf die Schilddrüsenhormon-Werte im Plasma. Diese Befunde erlauben es, neben anderen möglichen Ursachen, auf einen Defekt der 5'DI rückzuschließen, der der Situation im „low- $T_3$ -syndrome“ nahe kommt. Da das TSH bei den Tieren normal hoch ist, kann außerdem auf eine Veränderung im feedback-Mechanismus geschlossen werden, der normalen Gehalt an  $T_3$  in der Hypophyse trotz verminderter peripherer  $T_3$ -Konzentration sicherstellt. Die Aktivität der 5'DI ist dort im Gegensatz zu der der Leber normal (Chomard P et al., 1994; Katzeff HL, Selgrad C, 1993; Young RA et al., 1984).

- Mausstamm C57 BL/6J (ob/ob): Die ebenfalls fettleibigen Tiere zeigen erhöhten Energie-Stoffwechsel, beeinträchtigte Thermogenese bei Kälte und kalorienarmer Diät und verminderte Plasma- $T_4$  und - $T_3$ -Spiegel. Dies resultiert aus einer veränderten 5'DII-Aktivität im BAT beziehungsweise herabgesetzten 5'DI-Aktivität in Leber und Niere, die mit ungenügender Deiodierung von  $T_4$  einhergeht. Die Mäuse weisen ein ähnliches Alters- und  $T_3$ -induziertes Profil der Leber- und Nieren-5'DI in gesunden (ob/- oder -/-) und betroffenen Tieren auf, weshalb die veränderten Schilddrüsenparameter durch unzureichende Aufnahme von  $T_3$  und  $T_4$  in die Leber und (dadurch?) verminderte Funktion der Deiodase erklärt werden (Hillgartner FB, Romsos DR, 1985; Hillgartner FB, Romsos DR, 1988; Kaplan MM, Young JB, 1987; Kates AL, Himms-Hagen J, 1990).

#### 1.5.4.2 Veränderungen der 5'DI beim Menschen

Aus den genannten Tiermodellen wurde geschlossen, dass auch beim Menschen veränderte 5'DI-Aktivität oder Expression zu vergleichbaren Symptomen führen könnten. Trotz analoger Schilddrüsenhormon-Konstellationen sind jedoch derartige Störungen bislang nicht gefunden worden.

Es ist allerdings eine Patientin beschrieben worden, deren klinische Erscheinung zunächst einen 5'-Deiodase-Defekt vermuten ließ. Dabei handelt es sich um eine damals

25-jährige Frau, die bei klinisch euthyreoter Stoffwechsellage und negativer Familienanamnese lediglich durch eine wenig ausgeprägte Struma auffiel. Die Bestimmung der Schilddrüseparameter ergab erhöhte Werte an freiem  $T_4$ , freiem und Gesamt- $rT_3$  sowie  $3',5'$ - $T_2$ . Niedrignormale und erniedrigte Spiegel fanden sich für freies und Gesamt- $T_3$  sowie  $3,5$ - $T_2$  und  $3,3'$ - $T_2$ . Diese Befunde deuten auf eine verminderte Aktivierung von Schilddrüsenhormonen beziehungsweise einen herabgesetzten Abbau ihrer Metaboliten hin, wie es bei Defekten der  $5'DI$  zu erwarten wäre. Nach Ausschluss von Bindungsanomalien in Transportproteinen für Schilddrüsenhormone, Fehlen von Autoantikörpern gegen Thyroglobulin oder peripherer Resistenz gegen Schilddrüsenhormone wurde auch das Gen der  $5'DI$  sequenziert. Dabei fanden sich jedoch keine Mutationen in den Sequenzen der Exons 1 bis 4 und lediglich ein stiller Polymorphismus im Promotorbereich, der keine Auswirkungen auf die Genexpression hat. Diese Befunde deuten darauf hin, dass bisher nicht näher bekannte Störungen für den Phänotyp dieser Patientin verantwortlich sein müssen (Kleinhaus N et al., 1988; Maxon HR et al., 1982; Toyoda N et al., 1996).

### 1.5.5 Störungen der Hormoninaktivierung

Die Inaktivierung der Schilddrüsenhormone geschieht neben der Dekarboxylierung, Desaminierung und der Konjugation am Phenolring durch Sulfatierung und Glukuronidierung vor allem durch Deiodierung am inneren Ring durch die  $5D$ . Eine Form von übermäßigem Abbau von Schilddrüsenhormonen fand sich bei der Untersuchung von Patienten mit stark ausgeprägten Hämangiomen. In diesen entdeckte man hohe Expressionsraten der  $5D$  (wahrscheinlich durch Stimulation lokaler Wachstumsfaktoren), die für die beschleunigte Inaktivierung von  $T_3$  und  $T_4$  und die daraus resultierende hypothyreote Stoffwechselsituation verantwortlich zu sein scheinen. (Huang SA et al., 2000)

## 1.6 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Das Vorliegen anderweitig nicht erklärbarer Fälle von „Resistenz gegen Schilddrüsenhormone“ legt die Hypothese nahe, dass Funktionsstörungen im System der Deiodasen, im besonderen der 5'DI, ein bislang beim Menschen nicht beschriebener Grund für Veränderungen im Schilddrüsenhormonhaushalt sein könnten. Die „Resistenz gegen Schilddrüsenhormone“ bezieht sich in diesem Fall auf ein Nichtansprechen der Patienten auf T<sub>4</sub>-Gabe mit Erhöhung der T<sub>3</sub>-Spiegel im Sinne einer „Konversionshemmung“ und nicht auf einen Defekt im Schilddrüsenhormon-Rezeptor, der „Schilddrüsenhormon-Resistenz“ im engeren Sinn. Wie oben verdeutlicht konnten derartige Veränderungen bei entsprechenden klinischen Hinweisen bislang nicht durch Abweichungen im Gen der 5'DI erklärt werden.

Ein Ziel der Arbeit ist es deshalb, die bekannten Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion und der Gensequenzierung so abzuwandeln, dass sich mit ihnen das Gen der 5'DI analysieren lässt, und mögliche Defekte der 5'DI auf molekularer Ebene beschrieben werden können. Dabei beschränkt sich die Untersuchung auf den translatierten Teil des Gens.

Das Untersuchungsverfahren soll möglichst einfach und rationell gestaltet sein, um eventuellen einen späteren Einsatz im „Routinelabor“ zu ermöglichen.

Mit der so modifizierten Analyse wurde die DNA von gesunden Probanden und von fünf Patienten (bei einer Patientin auch die DNA einiger ihrer Verwandten) mit Schilddrüsenhormonstörungen und Verdacht auf Defekte der 5'DI sequenziert. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist somit auch eine (Ausschluss-) Diagnostik der beschriebenen Veränderungen dieser Patienten.

Die beschränkte Anzahl der untersuchten Patienten verleiht der Arbeit den Charakter von retrospektiven Einzelfallstudien, als die sie zu verstehen und bewerten ist.

## **2 Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Untersuchte DNA-Proben**

#### **2.1.1 Gesunde Probanden**

Zur Ausarbeitung des Verfahrens wurde von 12 freiwilligen, in Bezug auf die Schilddrüse gesunden Probanden DNA aus kernhaltigen Blutzellen extrahiert und untersucht.

#### **2.1.2 Patienten**

Bei den untersuchten Patienten handelt es sich um klinisch auffällig gewordene Personen, deren Störung im Schilddrüsenhormonhaushalt mit bisherigen Untersuchungen, wie einer Suche nach Veränderungen im Schilddrüsenhormon-Rezeptor im Sinne einer Schilddrüsenhormon-Resistenz, nicht erklärt werden konnte. Ihre Laborparameter lassen bei ihnen neben anderen möglichen Veränderungen auch den Verdacht auf einen Defekt in der 5'DI aufkommen.

Von allen Patienten liegen Einverständniserklärungen zur molekulargenetischen Untersuchung auf Deiodase-Defekte bei den überweisenden Ärzten vor.

- **Patientin SH**

1994 wurde die „derbe“ Struma dieser 1934 geborenen Patientin zytologisch untersucht und als „verdächtig“ (bezüglich ihrer Dignität) eingestuft, worauf eine Hemithyreoidektomie rechts erfolgte. (Durch „“ gekennzeichnete, nicht genauer zu bestimmende Termini sind Zitate der überweisenden Ärzte.)

Die histologische Untersuchung ergab eine HASHIMOTO-Thyreoiditis, Atrophie des Schilddrüsengewebes, onkozytäre Veränderungen aber keinen Malignom-Hinweis.

Soweit bekannt lauten die Schilddrüsen-Parameter:

Parameter	Präoperativ	Postoperativ I	Postoperativ II	Norm
<b>T<sub>4</sub>-Substitution</b>	∅	100µg	100µg	∅
<b>TSH</b>	21-32mU/l	5.1U/l	0.29U/l	0.3-4U/l
<b>Gesamt-T<sub>3</sub></b>	1.6-2.4nmol/l	1.1nmol/l	1.1nmol/l	1.3-3.2nmol/l
<b>Gesamt-T<sub>4</sub></b>	74.0-75.0nmol/l	>320nmol/l	>320nmol/l	66-174nmol/l

Die nur geringen T<sub>3</sub>-Werte, die trotz T<sub>4</sub>-Substitution erreicht wurden, lassen den Verdacht auf eine Konversionshemmung durch peripheren 5' DI-Defekt aufkommen. Unabhängig von diesen Befunden erhielt die Patientin 1984 eine Transplantat-Niere und wird seitdem mit Cyclosporin behandelt. Inwieweit eine Beziehung zwischen der eingeschränkten Nierenfunktion, der immunsuppressiven Therapie und den Veränderungen im Schilddrüsenhormonhaushalt besteht, soll weiter unten diskutiert werden.

- **Familie M**

Über die Patientin MMP (28 Jahre) liegen folgende Daten vor:

Seit dem 12. Lebensjahr ist eine große Knotenstruma bekannt, die im Alter von 17 und 22 Jahren bei Rezidiv teilreseziert wurde. Die Patientin stellte sich 12/97 wegen hyperthyreoter multinodoser Rezidivstruma vor. Die angesetzte Therapie mit Triac (Tricana<sup>®</sup>) erreichte bei der Vorstellung 4/98 zunächst klinisch euthyreoten Zustand. Im Juni 1998 erfolgte dann eine Radioiodtherapie mit 740MBq Iod<sup>131</sup>, der sich eine Behandlung mit L-Thyroxin (Novothyral<sup>®</sup>) anschloss.

Bei Wiedervorstellung 1999 zeigten sich sonographisch im rechten Lappen (3.7ml) ein echoisodenser Knoten, im linken Lappen (15.6ml) ein großer echoarmer und diverse kleinere Knoten. Durch Szintigraphie wurde dieser Befund bei vermehrter Radionuklid-Aufnahme als autonome Knotenstruma präzisiert.

Schilddrüsen-Parameter der Patientin wurde wie folgt bestimmt:

Parameter	12/97	12 Tage nach Triac-Therapie	5 Monate unter Triac-Therapie	Norm
Gesamt-T <sub>4</sub>	219µg/l	∅	∅	50-120µg/l
Freies T <sub>4</sub>	29ng/l	21ng/l	24ng/l	8-20ng/l
Freies T <sub>3</sub>	7.9pmol/l	10.1pmol/l	27pmol/l	3.7-6.9pmol/l
TSH basal	38.5mU/l	37.05mU/l	16.7mU/l	0.3-4mU/l

Aus den Daten geht hervor, dass vor Therapiebeginn freies T<sub>3</sub> und freies T<sub>4</sub> bei stark vermehrtem TSH nur mäßig erhöht waren, was am ehesten mit dem Bild einer „klassischen“ Resistenz gegen Schilddrüsenhormone vereinbar wäre. Diese war zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht bekannt, wurde aber im Verlauf der Arbeit nachgewiesen (siehe Kapitel 4) und zeigte, wie angegeben, eine Reaktion auf Triac-Therapie.

Der Verdacht auf Konversionshemmung ergab sich bei der Patientin aus dem stark erhöhten Wert für Gesamt-T<sub>4</sub>, der nahezu einer Verdoppelung des Normalwertes entsprach.

Im Rahmen der Arbeit wurde auch die DNA einiger weiterer Familienmitglieder untersucht:

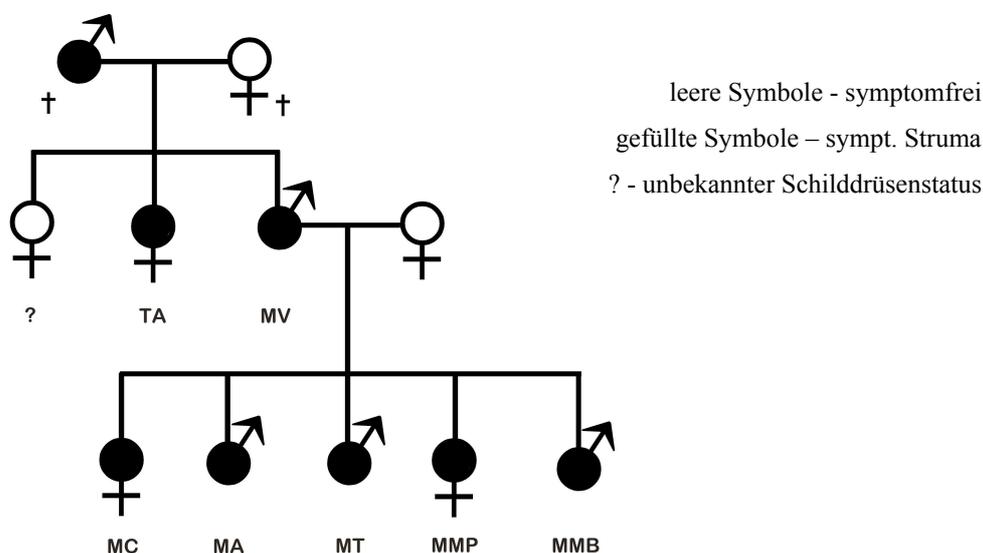


Abbildung 5: Stammbaum der Familie M

- Vater (MV): 61 Jahre, mit 50 Jahren Strumaresektion einer hyperthyreoten Knotenstruma, im folgenden Jahr bei Rezidiv Durchführung einer Radioiodtherapie
- Schwester des Vaters (TA): 57 Jahre, bekannte Struma, bislang nicht operiert
- Schwester (MC): 39 Jahre, dreimalige Strumaresektion wegen hyperthyreoter Knotenstruma, die sich bereits in der Pubertät entwickelte. Der Sohn dieser Patientin ist fraglich euthyreot.
- Bruder (MMB): 19 Jahre, einmalige Resektion einer Struma, die sich nach der Pubertät entwickelte

Nicht untersucht werden konnten die Mutter der Patientin, die symptomfrei ist, ebenso ihre verstorbene Großmutter väterlicherseits. Der verstorbene Großvater väterlicherseits, sowie zwei weitere Brüder (MA, 36 Jahre und MT, 34 Jahre) der Patientin zeigen/zeigten eine symptomatische Struma, die im Fall des Bruders MA zweimal operativ behandelt wurde (Strumaresektion beziehungsweise Strumektomie). Der Schilddrüsenstatus einer weiteren Tante der Patientin ist nicht bekannt. Allgemein ist zu bemerken, dass die weiblichen Angehörigen der Familie bereits in der Pubertät eine Struma entwickelten, die männlichen Familienmitglieder erst später und in geringerem Ausmaß.

- **Patienten SM und KR**

Bis auf das Alter (SM geb. 1986, KR geb. 1985) und den vom überweisenden Arzt geäußerten Verdacht auf Konversionshemmung bei milder Hypothyreose waren zum Zeitpunkt der Untersuchung von diesen Patienten keine weiteren Daten bekannt.

- **Patient FU**

Von diesem Patienten waren ebenfalls bis auf den Verdacht auf Deiodasedefekt bei Schilddrüsenfunktionsstörung keine Daten bekannt.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Chemikalien

- QIAamp Blood Kit,  
Taq DNA Polymerase,  
QIAquick PCR Purification Kit:  
QIAGEN (Hilden, Deutschland)
- Ultrapure dNTP Set,  
Oligonukleotid-Primer,  
Auto-Seq™ G-50:  
Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig, Deutschland)
- Nucleotrap®: Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
- DNA Sequencing Kit „BigDye Terminator Cycle Sequencing“,  
Template Suppression Reagent (TSR),  
Performance Optimized Polymere 6 (POP6):  
Perkin-Elmer Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland)
- Chemikalien der Firmen Baker (Griesheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Gibco (Praisley, Schottland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma (St. Louis, USA)

### 2.2.2 Geräte

- Thermocycler: Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research
- Sequenzer: ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer Applied Biosystems
- Rechner: IBM-kompatibler Personal Computer und Apple Computer
- Software: ABI Prism Collection Software  
Lasergen DNA-Star - SeqMan 4.00  
Microsoft Word 2000  
Corel Draw/Photopaint 7.0

Alle übrigen verwendeten Geräte wie Pipetten, Glaswaren, Zentrifugen und Elektrophorese-Zubehör entsprechen den üblichen Laborstandards.

## 2.3 Methoden

Die Ermittlung der Gensequenz der 5'DI erfolgt in mehreren Teilschritten: Zunächst gewinnt man aus peripheren kernhaltigen Blutzellen durch enzymatischen Verdau und Ethanol-fällung genomische DNA (gDNA). Mit Hilfe der PCR werden daraus die vier Exons der 5'DI amplifiziert, um von den jeweiligen Abschnitten der DNA eine ausreichende Anzahl an Kopien zu erhalten. Dies ist nötig, da die direkte Sequenzierung der aus dem Blut extrahierten gDNA wegen der zu geringen Ausbeute, die dabei erreicht wird, nicht möglich ist. Vor der Sequenzierung werden die PCR-Produkte analysiert und mit verschiedenen Methoden aufbereitet, um sie von Stoffen zu reinigen, die die Sequenzierungsreaktion beeinflussen könnten.

### 2.3.1 DNA-Extraktion aus Blutzellen

Die Extraktion der DNA der gesunden Probanden, sowie der untersuchten Patienten wurde mit „QIAamp Blood Kit“ der Firma QIAGEN vorgenommen. Der Kit basiert auf einer Ethanol-fällung der DNA nach enzymatischem Verdau von kernhaltigen peripheren Blutzellen und anschließender Reinigung an einer Silicat-Matrix. Diese bindet oder entlässt DNA je nach Salzkonzentration und pH-Wert der Lösung.

**Protokoll** (nach Herstellerangaben): 200µl Vollblut werden mit 25µl „QIAGEN-Protease“ und 200µl Lyse-Puffer („AL“) vermischt und bei 70°C für 10min inkubiert. Nach Hinzufügen von 210µl Ethanol (96-100%) gibt man den gesamten Ansatz auf „QIAamp-spin-columns“ und zentrifugiert 1min bei 8000rpm in die bereitgestellten 2ml-Sammelgefäße. Das Filtrat wird verworfen. Zweimal wäscht man die Säule mit 500µl Wasch-Puffer („AW“) durch Zentrifugieren bei 8000rpm für 1min beziehungsweise 13000rpm für 3min beim zweiten Mal. Die Eluation erfolgt mittels 200µl Wasser von 70°C und durch Zentrifugieren für 1min bei 8000rpm nach 1min Einwirkzeit.

Auf diese Weise werden aus 200µl Vollblut laut Herstellerangaben 6µg gDNA (also etwa 30ng pro µl Eluat) gewonnen.

### 2.3.2 Spezifische DNA-Amplifizierung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) ist eine von K. Mullis entwickelte, hochempfindliche Methode der selektiven DNA-Vervielfältigung. Sind die flankierenden Sequenzen des zu untersuchenden Genabschnitts (= Template) bekannt, ist es möglich, von diesem innerhalb kurzer Zeit nahezu beliebig viele Kopien herzustellen (nach Stryer L, 1996).

Benötigt werden hierzu zwei Primer (= Oligonukleotide von 20-30 Basen Länge, komplementär zu den flankierenden Sequenzen der zu untersuchenden DNA-Fragmente beziehungsweise deren Gegensträngen), die vier dNTPs, eine hitzestabile „Taq-DNA-Polymerase“ (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen oder rekombinant hergestellt),  $MgCl_2$  (für die Funktion der DNA-Polymerase unerlässlich) sowie Puffer zur Einstellung des pH-Optimums.

Eine PCR besteht aus etwa 30-40 Reaktionszyklen, die jeweils aus drei Schritten aufgebaut sind:

1. DNA-Denaturierung (Trennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge) durch Erwärmung auf  $94^{\circ}C$
2. „Annealing“ (Anlagerung) der Primer durch Abkühlung auf  $55-70^{\circ}C$
3. DNA-Synthese durch Verlängerung der Primer bei  $72^{\circ}C$

Vor dem 1. Schritt erfolgt eine initiale Denaturierung bei  $94^{\circ}C$ . Dem letzten Polymerisierungsschritt schließt sich eine ausgedehntere DNA-Synthesezeit und eventuell eine Kühlungsphase bei  $4^{\circ}C$  an.

Durch Wiederholung der einzelnen Schritte ist es möglich, den gewünschten Genabschnitt aus wenigen DNA-Molekülen exponentiell zu vermehren, da das Produkt eines Zyklus im darauffolgenden wieder als Matrize dient. Dadurch verdoppelt sich mit jedem Durchlauf die Anzahl der DNA-Kopien und folgt damit im Idealfall der Formel  $2^n$  ( $n$  = Anzahl der Zyklen).

Wichtige variable Größen der PCR sind:

- die Polymerisierungszeit, in der die DNA-Synthese stattfindet, und die von der Länge des zu amplifizierenden Genabschnitts abhängt (etwa 1000 Basen werden durch die DNA-Polymerase in 1min verknüpft).
- die Annealing-Temperatur ( $T_m$ ), die von der Gestaltung der Primer beeinflusst wird. Sie kann nach folgender Formel annähernd berechnet werden und ist in der Regel experimentell genauer zu bestimmen.

$$T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{T} + \text{A})$$

A,C,G,T = Anzahl der jeweiligen Basen im Primer

- die Wahl der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration im Reaktionsansatz (etwa 2-4mM), die ebenfalls von den gewählten Primern bestimmt wird.

Zur Amplifizierung der Exons des Gens der 5'DI wurde „Taq-DNA-Polymerase“ mit den entsprechenden Reaktionspuffern der Firma QIAGEN verwendet.

Die gewählten Primer binden in der Intronsequenz des Gens jeweils zwischen 15 und 55 Basen vor beziehungsweise nach den Exongrenzen (s. Anhang). Es handelt sich teilweise um modifizierte Primer nach Jakobs (Jakobs TC, o.J.):

Exon 1	
MW1M13	5' gta aaa cga cgg cca gtc <b>tgc cca tag aac tca gag c</b> 3'
MW1M13R	5' gga aac agc tat gac cat gtt <b>tga agc acc cct caa gtg t</b> 3'
Exon 2	
MW2M13	5' gta aaa cga cgg cca gtg <b>gtc tca gtt tgt gat ggt tg</b> 3'
MW2M13R	5' gga aac agc tat gac cat gga <b>ggt aga aga ggc aga gaa t</b> 3'
Exon 3	
MW3M13	5' gta aaa cga cgg cca gtg <b>tgt gct gtg tca atg gac tc</b> 3'
MW3M13R	5' gga aac agc tat gac cat gtg <b>caa agc ctt ctc ttt gcc c</b> 3'
Exon 4	
MW4M13	5' gta aaa cga cgg cca gta <b>caa gtt ggg aat gcc tga tt</b> 3
MW4M13R	5' gga agc agc tat gac cat ggg <b>tca cct aga att gag gta t</b> 3'
<b>fett</b> normal	= Bindungsstellen in der Intronsequenz = M13 bzw. M13-Rev-Sequenz

Alle Primer wurden so (um-) gestaltet, dass die vier „forward“-Primer an ihrem 5'-Ende die Sequenz des M13-Primers des E.coli-Phagen „M13“ enthalten, die „reverse“-Primer parallel dazu die Sequenz des M13-Reverse-Primers.

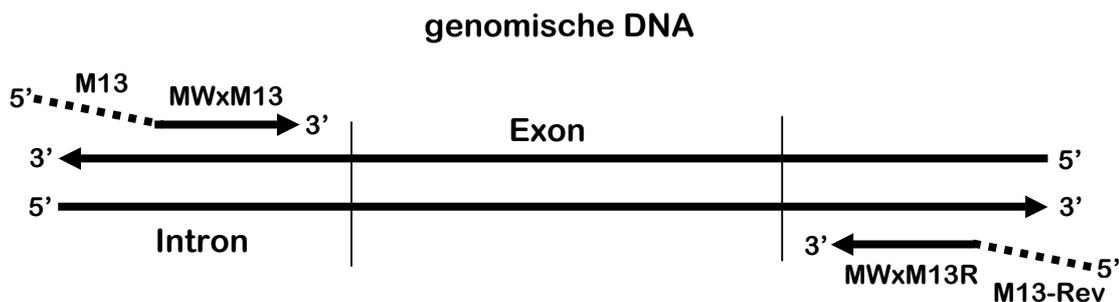


Abbildung 6: Bindung der PCR-Primer

Diese Veränderungen beeinflussen das Bindungsverhalten der Primer nicht, ermöglichen aber Vereinfachungen bei der anschließenden Sequenzierung, wie weiter unten genauer beschrieben wird.

**Protokoll** (nach Herstellerangaben): Für eine Reaktion werden im PCR-Reaktionsgefäß zusammengegeben:

	Volumen	Endkonzentration/Menge
dNTP (je 10mM)	1,0µl	200µM jedes NTPs
Primer 1 (5µM)	1,0µl	0,1µM
Primer 2 (5µM)	1,0µl	0,1µM
10x Puffer (enthält 15mM MgCl <sub>2</sub> )	5,0µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	variabel	1.5 – 4.0mM
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25µl	1,25U
Template	variabel	< 1µg
H <sub>2</sub> O	ad 50µl	

Die hier eingesetzte Menge von 300µg an Template entspricht 10µl des gDNA-Extrakts, der wie oben beschrieben mit „QIAamp Blood Kit“ gewonnen wurde. Die Programmierung des Thermocyclers lautet:

---

Schritt 1:	94°C	für 2min
Schritt 2:	94°C	für 15s
Schritt 3:	55-70°C	für 15s
Schritt 4:	72°C	für 2min
Schritt 5:	zu Schritt 2	30 - 45 mal
Schritt 6:	72°C	10min
Schritt 7:	4°C	bis zur Entnahme der Proben

Die Schritte 2 mit 4 repräsentieren dabei die eigentliche Amplifikationsphase und werden, je nach Beschaffenheit der untersuchten DNA-Fragment, 30-45 mal wiederholt.

### 2.3.3 Analyse und Reinigung der PCR-Produkte

- **Agarosegelelektrophorese**

Durch Elektrophorese in Agarosegel ist es möglich, DNA-Teilstücke aufgrund ihrer negativen Gesamtladung durch Gleichstrom aufzutrennen. Dabei wandern kleine DNA-Moleküle relativ weit, große relativ weniger weit von der Kathode zur Anode.

Wurde das Agarosegel zusätzlich mit Ethidiumbromid, das mit DNA interkaliert, gefärbt, sind die PCR-Produkte unter UV-Licht (312nm Wellenlänge) durch das Fluoreszenzverhalten des Farbstoffs als diskrete Banden sichtbar.

**Protokoll** (nach Sambrook J et al., 1989):

- TBE-Puffer (10x Stammlösung): 108g Trishydroxymethylaminomethan  
55g Borsäure  
7.9g EDTA  
destilliertes Wasser ad 1000ml

- Probenpuffer (6x): 0.25% Bromphenolblau  
30% Glycin  
destilliertes Wasser ad 100%
- Agarosegel: 1.5% Agarose werden in 0.5x TBE etwa 5min aufgekocht, zusammen mit Ethidiumbromid (in einer Endkonzentration von 500ng/ml) in den Elektrophorese-Schlitten mit Kamm geben und etwa 30min ausgehärtet.
- Elektrophorese: Nach Herausnehmen des Kamms gibt man drei Teile PCR-Produkt in einen Teil Probenpuffer in die Taschen des mit 0.5x TBE überschichteten Gels und trennt etwa 45min bei 80V auf. Unter UV-Licht werden die entstandenen Banden fotografisch festgehalten.

- **Reinigung von DNA aus einer Bande im Agarosegel**

Durch das folgende Verfahren ist es möglich, eine bestimmte Bande, und damit ein bestimmtes PCR-Produkt, von möglichen weiteren Banden oder Verunreinigungen zu trennen. Das Reinigungsprinzip besteht in der Bindung von DNA an eine Silicat-Matrix, wie sie im „Nucleotrap<sup>®</sup>-Kit“ der Firma Macherey-Nagel vorliegt.

Im Zusammenhang der Arbeit ist dieser Arbeitsschritt nötig, um sicherzustellen, dass aus unterschiedlich gereinigten PCR-Ansätzen auch wirklich das gewünschte PCR-Produkt (= die entsprechende Bande im Gel) und nicht eventuelle Nebenprodukte sequenziert werden. Sind die Ergebnisse der Sequenzierungen identisch, ist die Gewinnung und Reinigung der DNA-Fragmente aus Elektrophoresegel im weiteren nicht mehr nötig und kann durch ein weniger aufwendiges Verfahren erfolgen.

**Protokoll** (nach Herstellerangaben): Die PCR-Produkte trennt man zunächst durch Gel-Elektrophorese nach obigem Protokoll auf. Unter UV-Licht werden die gewünschten Banden mit einem Skalpell knapp ausgeschnitten, das Gel gewogen und pro 100mg Gel 300µl Salz-Puffer („NT1“) zugegeben. Der Ansatz wird mit 10µl Nucleotrap<sup>®</sup>-Suspension (= Silicat-Matrix) gemischt und 10min bei 50°C inkubiert, wobei man nach jeweils 2-3min durchmischt. Danach zentrifugiert man bei 14000rpm für 30s und verwirft den Überstand. In 500µl Wasch-Puffer („NT2“) resuspendiert man das Pellet, zentrifugiert erneut 30s lang bei 14000rpm und wiederholt diesen

Waschschritt nach Dekantieren des Überstandes. Ebenso verfährt man zweimal mit 500  $\mu$ l Wasch-Puffer „NT3“. Das entstandene Pellet lässt man 10-15min trocknen und löst es anschließend in 40  $\mu$ l Tris-HCl (pH 8.5). Nach 10min Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Zentrifugieren für 30s bei 14000rpm enthält der sich bildende Überstand die gereinigten DNA-Fragmente.

- **PCR-Purification-Kit**

Mit dem „QIAquick PCR-Purification-Kit“ steht ein weiteres, auf der Bindung an eine Silicat-Matrix basierendes Verfahren zur PCR-Produkt-Aufreinigung zur Verfügung.

**Protokoll** (nach Herstellerangaben): Fünf Volumenteile des Puffers „PB“ (enthält hohe Salzkonzentration) werden mit einem Volumenanteil des PCR-Produktes auf „QIAquick-spin-columns“ in einem 2ml-Sammelgefäß gegeben und 30-60s bei 14000rpm zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen, die Säule mit 750  $\mu$ l Wasch-Puffer „PE“ (enthält niedrige Salzkonzentration) beladen und zweimal für 30-60s bei 14000rpm zentrifugiert. In ein 1.5ml-Reaktionsgefäß eluiert man mit 40  $\mu$ l Tris-HCl (pH 8.5) durch 60s Zentrifugieren bei 14000rpm und erhält das gereinigte PCR-Produkt.

- **Sephadex G-50**

Durch Sephadex G-50, ein hydratisiertes Kohlehydratpolymer, ist es möglich, DNA aus PCR von Verunreinigungen durch dNTPs, Primer, Taq-Polymerase und andere Stoffen der PCR nach dem Prinzip der Gelfiltrationschromatographie zu reinigen. Es liegt in „AutoSeq™ G-50“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech in „MicroSpin™“-Säulen in wässriger Suspension vor.

**Protokoll** (nach Herstellerangaben): Das Sephadex wird durch Durchmischung resuspendiert, und nach Entfernen der Boden-Verschluss-Kappe die Säule in ein 2ml-Sammelgefäß gestellt. Bei 8000rpm zentrifugiert man 1min lang und entfernt dadurch den Konservierungspuffer. Die Säule wird in ein neues 1.5ml-Reaktionsgefäß gestellt, die Probe darauf gegeben und erneut 1min bei 8000rpm zentrifugiert. Das Filtrat enthält die gereinigten DNA-Teilstücke.

### 2.3.4 Sequenzierung eines DNA-Abschnittes

Um die Basenabfolge eines Gens oder DNA-Abschnittes zu ermitteln, wurde von F. Sanger die Methode des kontrollierten Kettenabbruchs entwickelt („Didesoxymethode“), die mittlerweile mehrere Veränderungen erfahren hat. Basis der in dieser Arbeit angewandten Modifikation ist ein mit der PCR vergleichbarer Reaktionsansatz, mit dem DNA-Einzelstrangkopien erzeugt werden. Er enthält das zu sequenzierende DNA-Teilstück, einen ihm komplementären Oligonukleotid-Primer, DNA-Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxyanaloga der Nucleosidtriphosphate (je ein Farbstoff für jede Base). Der Einbau eines solchen Analogons in die wachsende Kette bewirkt eine Blockade in der Synthese, da durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. So entstehen im Verlauf der Reaktion, die dem Aufbau nach einer PCR (mit Denaturierung, Annealing und Elongation) gleicht, DNA-Fragmente verschiedener Länge, die an ihrem 3'-Ende jeweils eine markierte Base enthalten. Diese Markierung kann mit Hilfe eines Lasers detektiert werden, wenn die entstandenen Oligonukleotide in einer Kapillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt werden. Man erhält dabei eine bestimmte Abfolge der vier Farben, wenn die Fragmente das Gel verlassen. Aus dieser Abfolge kann man direkt auf die Sequenz des kopierten Einzelstrangs schließen. In modernen Geräten mit angekoppeltem Rechner werden die Analyseschritte halbautomatisch ausgeführt (nach Stryer L, 1996).

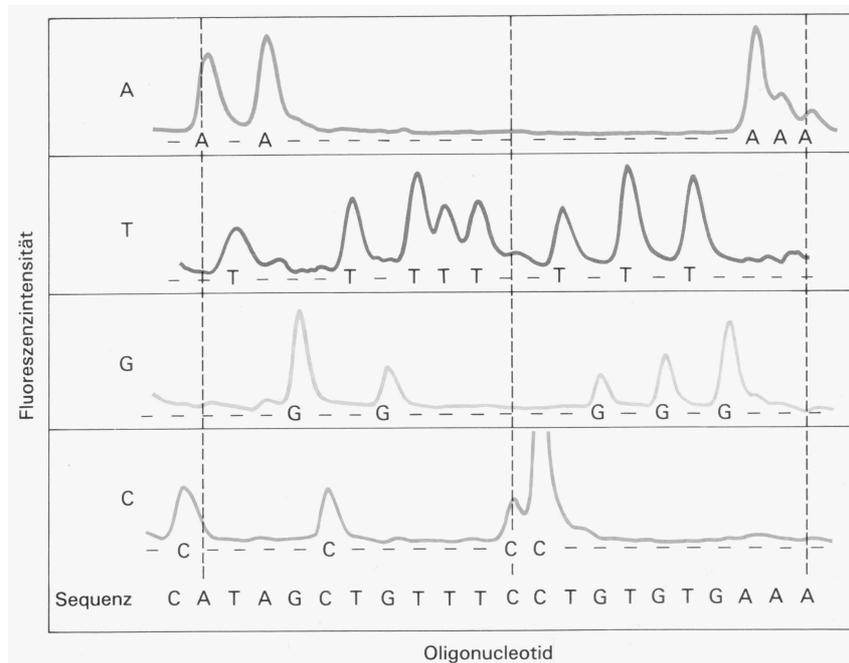


Abbildung 7: Fragmentlänge und abgeleitete Sequenz (nach Stryer L, 1996)

Durch die Wahl der PCR-Primer mit M13- beziehungsweise M13-Rev-Sequenzen an den 5'-Enden für die Amplifikation der gDNA-Abschnitte entstehen PCR-Produkte, die sich an ihren Enden in der Sequenz gleichen. Damit kann die Sequenzierung aller Exons mit zwei Primern durchgeführt werden:

„Forward“-Sequenzen mit M13-Primer und „Reverse“-Sequenzen mit M13-Rev-Primer.

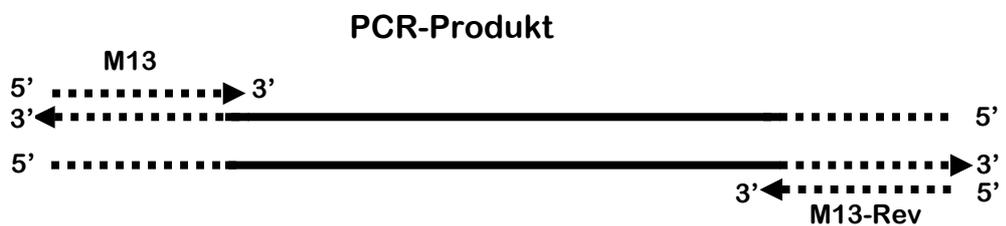


Abbildung 8: Bindung der Seq.-Primer

Die Sequenzierung der Exons des 5'DI-Gens erfolgt mit „BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit“ und anschließender Analyse mit dem „ABI Prism 310 Genetic Analyser“ der Firma Perkin-Elmer Applied Biosystems.

**Protokoll** (nach Herstellerangaben):

- Sequenzierungs-Reaktion: In ein PCR-Reaktionsgefäß gibt man pro Ansatz:

Terminator Ready Reaction Mix	8µl
Primer (5µM)	1µl
PCR-Produkt	200-400ng
H <sub>2</sub> O	ad 20µl

“Terminator Ready Reaction Mix” enthält „AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase“, dNTPs, fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide, MgCl<sub>2</sub> und die nötigen Puffer in fertig eingestellter Lösung.

Erfolgt die Amplifikation der gDNA nach dem oben beschriebenen Protokoll, entsprechen 200-400ng Template in der Sequenzierung etwa 5µl eines PCR-Produkts, das im Agarosegel eine deutlich sichtbare Bande ergibt.

Sequenzierungs-Primer sind:

M13	5´ gta aaa cga cgg cca gt 3´
M13-Rev	5´ gga agc agc tat gac cat g 3´

Die Programmierung des Thermocyclers lautet:

Schritt 1:	94°C	für 3min
Schritt 2:	94°C	für 30s
Schritt 3:	50°C	für 60s
Schritt 4:	60°C	für 2.5min
Schritt 5:	zu Schritt 2	24 mal
Schritt 6:	60°C	für 5min
Schritt 7:	4°C	bis zur Entnahme der Proben

- Reinigung der DNA-Fragmente: Die Produkte der Sequenzierung werden mit Sephadex G-50 nach oben aufgeführtem Protokoll (Kapitel 2.2.3) von überschüssigen Reagenzien (vor allem Farbstoffen) gereinigt.

- 
- Ethanol-fällung: Nach Zugabe von 60 µl H<sub>2</sub>O, 8.1 µl Natriumazetat (3M, pH 5.2) und 220 µl Ethanol (96-100%) stellt man die Probe 5min in ein Eisbad und zentrifugiert anschließend 10min bei 13000rpm. Der Überstand wird verworfen und nach etwa 10min Luft-Trocknung wird das Pellet in 500 µl Ethanol (70%) gelöst und erneut 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Alkohol wird wiederum dekantiert und die Probe in der Vakuum-Zentrifuge bei Raumtemperatur getrocknet.
  - Vorbereitung für die Analyse: Das entstandene Pellet löst man bei 94°C 2min in 25 µl „Template Supression Reagent (TSR)“ und gibt die Lösung in den bereitgestellten Probengefäßen in den „Genetic Analyser“. Dort erfolgt die Elektrophorese über „Performance Optimized Polymere 6 (POP6)“ als Gelmatrix.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Modifizierung des Verfahrens

#### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Ziel der Modifikationen ist es, die Reaktionsbedingungen der PCR möglichst so zu verändern, dass alle Exons des Gens der 5'DI unter den gleich Reaktionsbedingungen amplifiziert werden können.

In Bezug auf die eingesetzte Menge an gDNA erweist sich eine Gesamtmenge von 300ng als gut geeignet, um in der PCR brauchbare Ergebnisse (= deutlich sichtbare Banden im Agarosegel) zu erzielen. Diese Menge entspricht 10µl des gDNA-Extrakts, der aus Vollblut nach oben genanntem Protokoll mit „QIA-Blood Kit“ gewonnen wurde.

In dem von Jakobs (Jakobs TC, o.J.) entwickelten Protokoll lagen für die Primer folgende Reaktionsbedingungen vor:

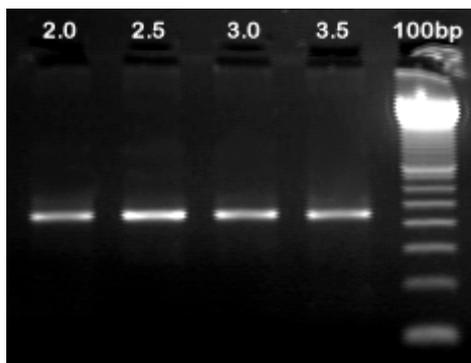
	Annealing-Temperatur	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration
<b>Exon 1</b>	66°C	2.25mM
<b>Exon 2</b>	61°C	2.25mM
<b>Exon 3</b>	63°C	2.00mM
<b>Exon 4</b>	63°C	3.75mM

Durch Variation in 1°C-Schritten zwischen 63°C und 65°C wurde zunächst diejenige Annealing-Temperatur bestimmt, bei der mit der angegebenen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration eine genügend große Ausbeute bei der Amplifikation aller Exons erreicht werden konnte. Dabei ergab sich 63°C als einzig geeignete Temperatur, bei allen anderen Variationen konnte kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden. Diese Temperatur

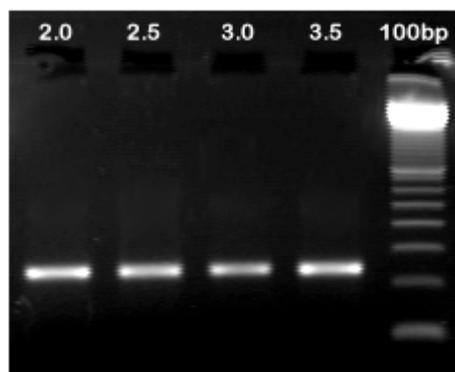
erwies sich auch für die vier modifizierten beziehungsweise neu gestalteten Primerpaare, die die M13- beziehungsweise M13-Rev-Sequenz enthalten und in ihrem Bindungsverhalten durch diese Modifikation nicht beeinflusst sind, als geeignet. Zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse wurde die ursprüngliche Anzahl der Reaktionszyklen von 30 auf 40 erhöht.

Zur Festlegung der für die verschiedenen Primer jeweils günstigsten  $MgCl_2$ -Konzentration wurde diese im Versuchsansatz zwischen 2.0 und 3.5 mM variiert, was zu folgendem Ergebnis führte:

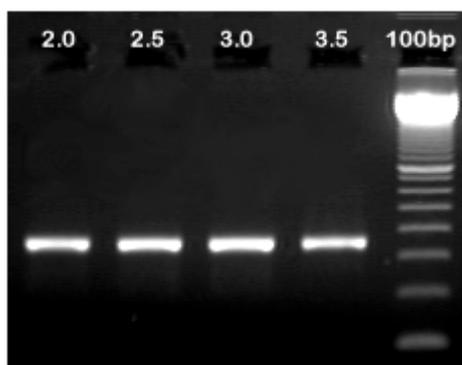
Exon 1



Exon 2



Exon 3



Exon 4

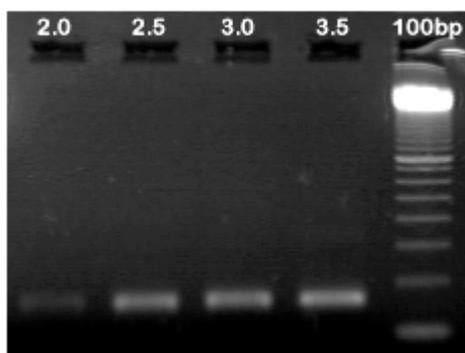


Abbildung 9a-d: je 5  $\mu$ l PCR-Produkt, 300ng gDNA Template, 40 PCR-Zyklen, 63°C Annealing-Temp., 1  $\mu$ l Probenpuffer, 1.5% Agarosegel in 0.5x TBE, 500ng/ml Ethidiumbromid, c[ $MgCl_2$ ] in mM

Es zeigt sich, dass die vier Exons bei unterschiedlichen  $MgCl_2$ -Konzentrationen amplifiziert werden können. Im Bereich zwischen 2.0 und 3.5mM erhält man für jedes Exon eine gewisse Ausbeute in der PCR, die sich in einer mehr oder weniger deutlichen Bande im Agarosegel widerspiegelt.

Als „Kompromiss“ aus den Ergebnissen wurde deshalb eine Konzentration von 3.0mM im PCR-Ansatz gewählt, die geeignet ist, alle Exons in ausreichender Menge zu vervielfältigen:

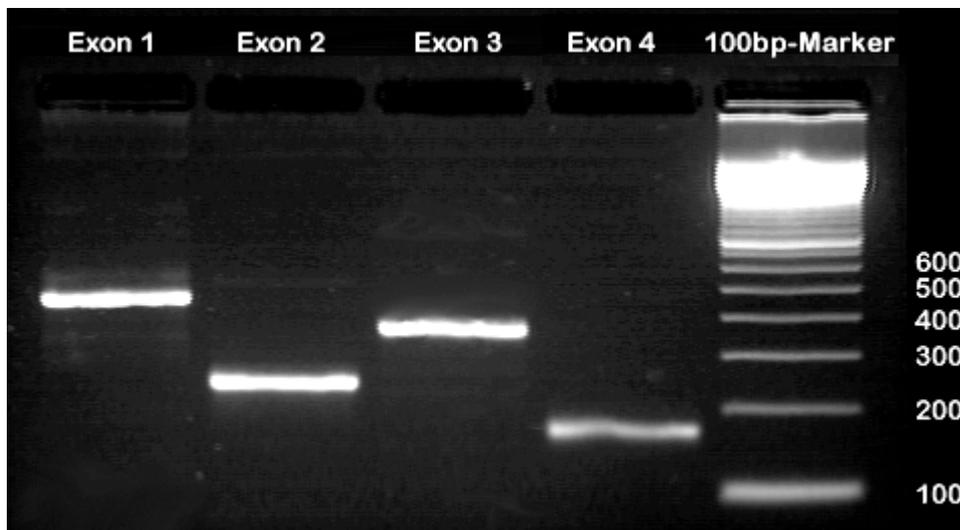


Abbildung 10: 10  $\mu$ l PCR-Produkt, 300ng gDNA Template, 40 PCR-Zyklen, 63°C Annealing-Temp., 2  $\mu$ l Probenpuffer, 1.5% Agarosegel in 0.5x TBE, 500ng/ml Ethidiumbromid

Mit den angegebenen PCR-Primern können also die vier Exons des Gens der 5' DI unter folgenden Reaktionsbedingungen aus einer gemeinsamen Stammlösung vervielfältigt werden, was eine schnelle und eventuell routinemäßige Vorgehensweise erlaubt:

Template:	300ng gDNA
$MgCl_2$ -Konzentration:	3.0mM
Annealing-Temperatur:	63°C
Anzahl der PCR-Zyklen:	40



Durch die Sequenzierung der beiden komplementären Stränge der jeweiligen Exons können verfahrensbedingte Fehler ausgeglichen werden, die möglicherweise bei der Analyse im Sequenzer auftreten. Insbesondere gilt dies für die ersten 20 Nukleotide. Hier und in den anderen Abschnitten dient die zweifache Sequenzierung als Kontrolle beziehungsweise Bestätigung des jeweiligen Gegenstrangs. Die Fehlbestimmungen am Beginn der Exon-Sequenz können jedoch durch die Wahl der „MW-M13-Primer“ in der PCR weitgehend vermieden werden, da die ersten Basen die hier nicht relevanten Intronsequenzen beschreiben (siehe Bindungsstellen der Primer im Anhang). Im Anschluss an die eigentliche Analyse werden die Ergebnisse mit dem Programm „Lasergen DNA-Star - SeqMan 4.00“ am Rechner mit der Referenzsequenz verglichen. Dabei ergibt sich, wiederum am Beispiel des Exons 4, folgendes Bild:

*Abbildung 13: Vergleich der Sequenzen mit „Seq-Man 4.00“*

Beim Vergleich der unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden für die PCR-Produkte zeigt sich, dass die Art der Reinigung keinen Einfluss auf das Ergebnis der Sequenzierung hat:

Durch Reinigung der DNA aus Agarosegel-Banden und anschließende Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass die erhaltenen Banden tatsächlich den gewünschten PCR-Produkten entsprechen. Reinigt man die PCR-Produkte nach den anderen genannten Methoden, erhält man in der Sequenzierung identische Ergebnisse. Damit kann der aufwendige Schritt der Reinigung aus dem Agarosegel entfallen. Während der PCR entstehen offenbar keine Nebenprodukte, die die Sequenzierung beeinträchtigen und damit eine Aufreinigung der einzelnen Banden aus dem Agarosegel nötig machen würden. Da im Zuge der Vereinfachung die Reinigungsmethode mit Sephadex G-50 die größten Vorteile in der Handhabung bietet, wurde sie für alle Proben verwandt.

## 3.2 Ergebnisse der Sequenzierung

### 3.2.1 Gesunde Probanden

Beim Vergleich der Sequenzen der 5'DI-Exons von freiwilligen, gesunden Probanden findet sich keine Abweichung von den von Hall veröffentlichten Ergebnissen (Hall R, 1999). Die bekannte Sequenz konnte somit bestätigt werden.

### 3.2.2 Patienten

Die Untersuchung der Patienten-DNA kommt zu folgendem Ergebnis:

- Patient SM

Im translatierten Bereich des Gens der 5'DI können keine Veränderungen festgestellt werden.

- Patient KR

Bei diesem Patienten finden sich ebenfalls keine Veränderungen im translatierten Bereich des 5'DI-Gens.

- Patient FU

Auch bei diesem Patienten entspricht die Sequenz des translatierten Bereichs der 5'DI der von gesunden Probanden.

- Patientin SH

Die Exons 2, 3 und 4 zeigen keine Abweichung von der bekannten Sequenz.

Im Exon 1 in Codon 13 findet sich jedoch eine Punktmutation von CTC nach CTT.

Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Leucin, was die Abweichung zu einem stummen Polymorphismus werden lässt. In der Auswertung ergeben sich entweder „T“ oder gleich starke peaks für „T“ und „C“ (beziehungsweise „A“ und „G“ im Gegenstrang), was auf Heterozygotie hinweist:

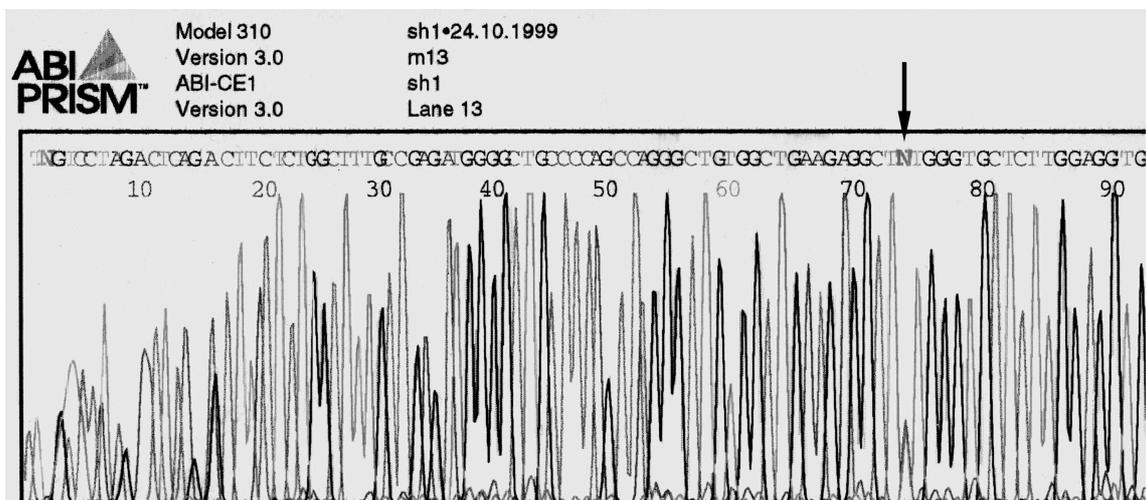


Abbildung 14: Sequenz mit M13-Primer

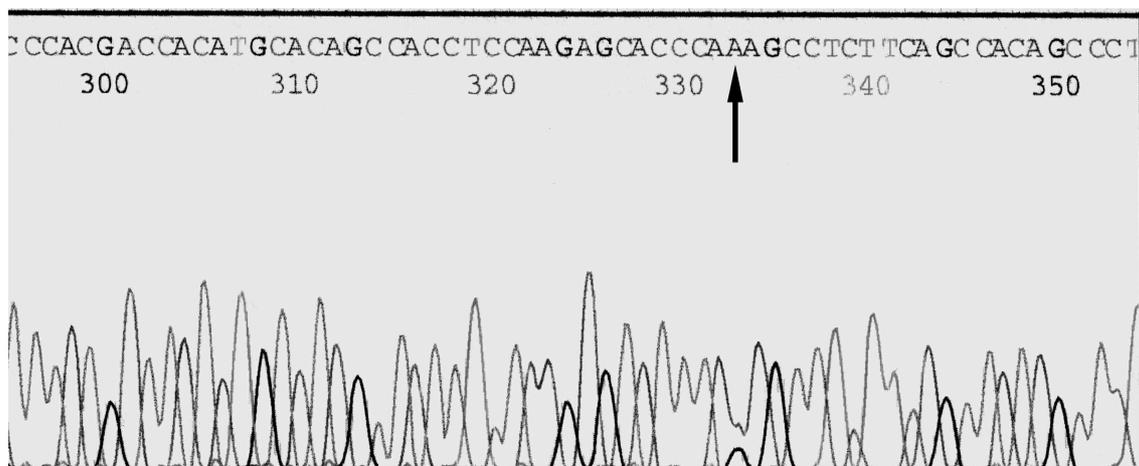


Abbildung 15: Sequenz des Gegenstrangs mit M13-Rev-Primer

- Familie M

Bei allen untersuchten Familienmitgliedern kann keine Veränderung in den Exons 2, 3 und 4 festgestellt werden.

Die Personen MMP, MMB, TA und MV zeigen jedoch eine Punktmutation im Codon 108 des Exons 1: Es lautet bei ihnen TGA anstatt TGG im Wildtyp. Dadurch entsteht an dieser Stelle aus dem Tryptophan-Codon ein Stop-Signal beziehungsweise die Information für den Einbau von Selenocystein. Das Bandenmuster weist auch hier auf Heterozygotie hin:

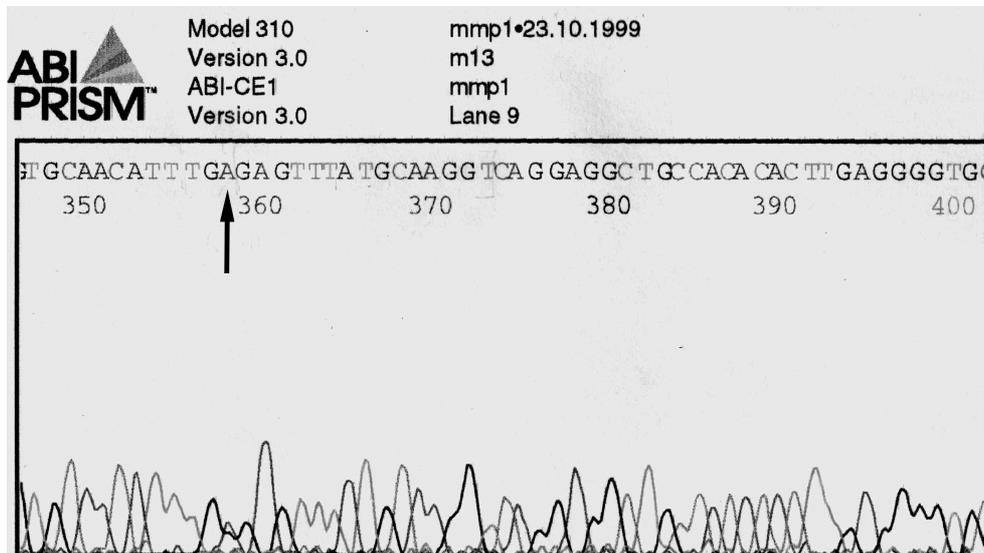


Abbildung 16: Sequenz mit M13-Primer

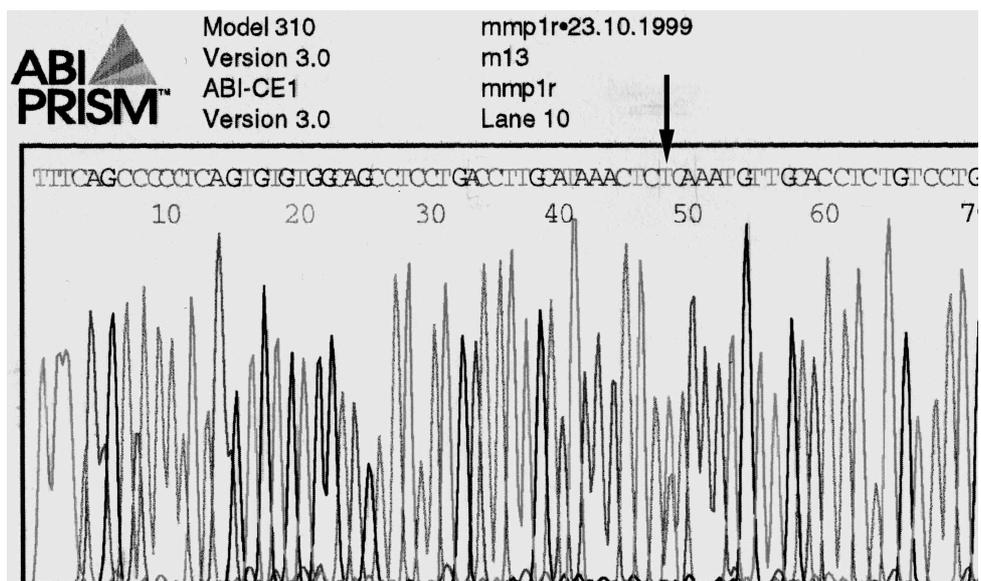


Abbildung 17: Sequenz des Gegenstrangs mit M13-Rev-Primer

Bei der Untersuchung der Schwester MC kann diese Abweichung nicht nachgewiesen werden. Hier entsprechen alle vier Exons dem Wildtyp.

## 4 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die bekannten Verfahren der PCR und der Gensequenzierung für den translatierten Bereich des 5'DI-Gens modifiziert und stark vereinfacht. Es steht nun ein Versuchsprotokoll zur Verfügung, nach dem alle Exons des Gens unter einheitlichen Bedingungen amplifiziert und sequenziert werden können. Damit ist es möglich, mit molekularbiologischen Standardverfahren und ohne weitere invasive Methoden aus Blut gewonnene DNA im Hinblick auf das Gen der 5'DI zu untersuchen. Ein Verdacht auf eine Veränderung des Gens und damit der Aktivität der 5'DI, die sich klinisch in einem erhöhten Verhältnis von  $T_4$  zu  $T_3$  und einer Vermehrung des  $rT_3$  in der Zirkulation äußert, kann dadurch mit einfachen Mitteln auf molekularer Ebene bestätigt oder widerlegt werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte erstmals eine potentiell relevante Mutation des 5'DI-Gens beim Menschen beschrieben werden.

Bei den untersuchten Familienmitgliedern der Familie M (außer bei Schwester MC) entsteht durch die Punktmutation im Exon 1 im Codon 108 der mRNA ein neues Stop-Codon UGA anstatt UGG für Tryptophan im Wildtyp. Bricht die Translation an dieser Stelle ab, kann davon ausgegangen werden, dass das entstandene Protein keine Funktion mehr hat. Es ist dann nur etwa halb so groß wie die ursprüngliche 5'DI und enthält nicht die für die Reaktion als essentiell beschriebenen Aminosäuren des aktiven Zentrums. Eine genauere Untersuchung der Aktivität dieses Proteins ist in diesem Fall wohl nicht nötig.

Würde sich die Mutation auf beiden Allelen des 5'DI-Genes finden, könnte wahrscheinlich von einem völligen Verlust der 5'DI-Aktivität ausgegangen werden. Da die Mutation allerdings heterozygot auftritt, stellt sich die Frage, ob dieser Funktionsverlust durch den Erhalt eines gesunden Allels und damit eine normale Expression der 5'DI teilweise oder komplett ausgeglichen werden kann.

Auf der Ebene des Proteins kommt die Tatsache hinzu, dass die 5'DI als ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut ist. Treffen durch Transkription der unterschiedlichen Allele eine wildtypische und eine veränderte Untereinheit aufeinander, bleibt zu klären, ob das defekte Monomer die gesamte Funktion der 5'DI verändern oder aufheben und damit über die normale Untereinheit dominieren würde („dominant negativer Effekt“, wie beispielsweise bei Veränderungen im Schilddrüsenhormon-Rezeptor bekannt). Voraussetzung dafür wäre aber, dass die Fähigkeit zur Dimerisation zweier derart verschiedener Untereinheiten bestehen bliebe. Eine vergleichbare Situation fand sich bei Experimenten mit p27-Untereinheiten, die am N-terminalen Membrananker verändert worden waren. Wurden diese Untereinheiten mit wildtypischen Monomeren zusammengebracht, dimerisierten sie zwar in der Plasmamembran, es entstand aber ein „Hybrid-Enzym“, das nur noch 25% der ursprünglichen Reaktionsgeschwindigkeit aufwies (Leonhard JL et al., 2001).

Um diese Fragen im vorliegenden Fall zu klären, wären Messungen des 5'DI-Gehalts beziehungsweise ihrer Aktivität aus Gewebeproben beispielsweise der Leber oder Niere nötig.

Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus der Doppelfunktion des durch die Mutation entstandenen Codons UGA. Es liefert neben dem Stop-Signal auch die Information für den Einbau von Selenocystein in die wachsende Aminosäurekette. Mit Hilfe des SECIS-Elements, das im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA zu finden ist, könnte ein modifiziertes Protein entstehen, das anstatt Tryptophan an der Stelle 108 die seltene Aminosäure Selenocystein enthält. Ist das SECIS-Element für dieses Codon funktionell wirksam, würde die Translation an der genannten Stelle bei ausreichender Selenversorgung nicht abbrechen. Da die 5'DI in der Selenhierarchie innerhalb der Zelle auf einem der oberen Plätze rangiert, scheint das Angebot des Spurenelements bei sonst normalem Selenstatus der Patienten (gemessen über die GPx als funktionellen Parameter) bei der Expression nicht der limitierende Faktor zu sein. Ob das neu entstandene Protein 5'DI-Aktivität aufweist, ist jedoch fraglich. Der Aminosäureaustausch hätte möglicherweise Einfluss auf die dreidimensionale Konformation des Proteins und bewirkte wahrscheinlich eine Veränderung, wenn nicht

den Verlust der Aktivität. Im Falle einer Translation mit einem Einbau von SeCys in die Aminosäurekette wären mehrere inner- und intermolekulare Verbindungen zu dem schon vorhandenen SeCys oder zu anderen Cystein-Resten der gleichen oder anderen Untereinheit denkbar, die jeweils verschiedene Einflüsse auf die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der 5'DI haben könnten.

Zusätzlich zu den genannten Messungen aus Gewebeproben sollte das so veränderte Protein in Zellkultur unter variiertem Selenangebot exprimiert werden, um seine Eigenschaften genauer zu beschreiben. Auch bei dieser Deutung der Mutation als ein Codon für SeCys bleibt allerdings die Frage offen, ob die Heterozygotie der Mutation den Defekt *in vivo* abschwächen oder völlig kompensieren könnte.

Eine ähnliche Untersuchung wurde bereits beim Isoenzym 5'DII, das in seinem aktiven Zentrum zu 80% mit dem der 5'DI identisch ist, vorgenommen:

Mutationen, die den Austausch des C-terminalen SeCys gegen Cystein oder ein Stop-Codon (TAA) bewirkten, hatten zwar einen Einfluss auf den Einbau von <sup>75</sup>Se, nicht jedoch auf die biochemischen Eigenschaften des Enzyms. Daraus wurde geschlossen, dass nur das N-terminale SeCys bei der Deiodierung eine Rolle spielt und weder das C-terminale SeCys noch die letzten sieben, bei der TAA-Mutation deletierten, Aminosäuren daran beteiligt sind (Salvatore D et al., 1999).

Da jedoch bei der hier vorliegenden 5'DI-Variante durch einen Stop der Translation etwa die Hälfte der Aminosäurekette verloren gehen würde, sind diese Ergebnisse wohl nicht ohne weiteres übertragbar.

Im Laufe der Untersuchungen wurde bei der Patientin MMP eine Veränderung im Gen des T<sub>3</sub>-Rezeptors □ bekannt. Sie befindet sich im Exon 9 und besteht in einem heterozygoten Basenaustausch von C zu T an der Stelle 1297 (C1297T, entspricht einem Aminosäureaustausch Arginin 338 □ Tryptophan). Neben den Veränderungen der 5'DI ist damit weiterhin zu diskutieren, inwieweit diese Mutation zur Gesamtsituation der Patientin beiträgt. Die bei ihr vorliegende Abweichung wurde bereits bei anderen Patienten mit hypophysärer Resistenz gegen Schilddrüsenhormone

beschrieben. Sie äußert sich in erhöhten Spiegel an freien Schilddrüsenhormonen, gestörter TSH-Sekretion und verminderter Antwort der Gewebe auf  $T_3$ , wie es auch bei der untersuchten Patientin der Fall ist. Bei anderen Formen der Schilddrüsenhormon-Resistenz (beispielsweise K443E) hat die heterozygote Mutation einen sogenannten „dominant-negativen Effekt“: Die veränderten Proteine werden weniger translatiert, haben aber die Fähigkeit zu Dimerisation und Bindung an DNA nicht verloren. Sie hemmen dadurch die Funktion der noch erhaltenen wildtypischen Form (Übersicht in: Chatterjee VK, Beck-Peccoz P, 1994). Dies ist allerdings bei der hier vorliegenden Mutation offenbar nur in recht mildem Umfang gegeben (Sasaki S et al., 1995). In Verbindung mit einem Defekt der 5' DI könnte jedoch eine gegenseitige Verstärkung oder Potenzierung der Störungen auftreten (i.e. geringe Bildungsrate beziehungsweise Aktivierung bei verminderter Wirkung der Schilddrüsenhormone). Es ist daher zu empfehlen, auch die übrigen Familienmitglieder auf Mutationen im Gen des  $T_3$ -Rezeptors □ zu untersuchen.

Wegen des Fehlens der Mutation im Gen der 5' DI der Indexpatientin MC kann ihr klinisches Erscheinungsbild ohne weitere Angaben nicht schlüssig erklärt werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich keine Veränderung im translatierten Bereich des Gens der 5' DI. Die Störungen im Schilddrüsenhormonhaushalt sind daher eventuell auch auf die angesprochene Mutation im Gen des  $T_3$ -Rezeptors □ oder auf andere Defekte zurückzuführen, wie unten weiter ausgeführt wird. Weiterhin sollte eine Probenverwechslung ausgeschlossen und eventuell eine zweite Sequenzierung aus einer unabhängigen DNA-Probe vorgenommen werden.

Keinen Einfluss auf die Funktion der 5' DI hat die Abweichung von der bisher bekannten Sequenz im Exon 1, die bei der Patientin SH gefunden wurde. Die heterozygote Punktmutation im Codon 13 von CTC zu CTT zieht keinen Aminosäureaustausch nach sich. Beide Triplets kodieren für die Aminosäure Leucin. Mit diesem Ergebnis wird gezeigt, dass offenbar stumme Polymorphismen im translatierten Bereich des Gen der 5' DI auftreten. Ähnliches konnte schon bei der oben vorgestellten Patientin im Promotorbereich des Gens beschrieben werden. Der

Basenaustausch hatte auch hier keinen Einfluss auf die Expression der 5'DI (Toyoda N et al., 1996).

Neben einem genetischen Defekt der 5'DI könnte bei dieser Patientin aber auch ihre weitere Anamnese eine Rolle spielen. Der Anteil, den die Niere zur gesamten 5'DI-Aktivität in der Peripherie liefert, ist bei ihr durch den Funktionsverlust der Niere im Vergleich zum Gesunden wahrscheinlich vermindert. Da dieser Anteil aber auch im Normalfall nur gering ist, kann dadurch die Symptomatik der Patientin wohl nicht völlig erklärt werden.

Sowohl für die Patienten MC, SH, KR, SM und FU, die keine Abweichung im untersuchten Teil des Gens der 5'DI zeigen, als auch für alle anderen Patienten kommen aber auch andere Veränderungen im Schilddrüsenhormonstoffwechsel für die Erklärung ihrer Symptomatik in Frage:

In Bezug auf die 5'DI sind dies Veränderungen außerhalb des translatierten Bereichs, beispielsweise im Promotor, wie sie beim Mausstamm C3H/He bekannt sind. Der verminderte Gehalt an mRNA und die reduzierte Expression der p27-Untereinheit gegenüber dem Vergleichsstamm C57 liefern hier die Erklärung für die um etwa 90% herabgesetzte Leber-5'DI-Aktivität und könnten auch die Symptomatik der Patienten begründen.

Ebenso ist ein Defekt im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA in Betracht zu ziehen. Ein funktionsunfähiges SECIS-Element ließe die Translation am Codon 126 vorzeitig abbrechen und damit ein höchstwahrscheinlich inaktives Protein (-bruchstück) entstehen.

Von Interesse wären auch Störungen der posttranskriptionellen Veränderung der RNA, insbesondere beim Spleißen, wie sie bei Veränderungen im Intron/Exon-Übergangsbereich auftreten könnten. Mit der hier angewandten Methode konnte dieser Bereich des 5'DI-Gens aufgrund der Wahl der PCR-Primer jedoch nicht hinreichend untersucht werden.

Generelle Defizite in der Synthese der Selenoproteine sind bei den Patienten sehr unwahrscheinlich, da sie weitreichende Folgen in anderen wichtigen Enzymsystemen wie der GPx nach sich ziehen würden, die nicht ohne weiteres zu kompensieren wären.

Unabhängig von der Deiodaseaktivität ist auch eine Transportstörung der Schilddrüsenhormone in Leber und Niere denkbar, wie sie bei einer Patientin mit klinisch ähnlicher Erscheinung wie die der hier untersuchte Patientin SH beschrieben wurde (Hennemann G et al., 1993). Eine verminderte zelluläre Aufnahme von  $T_4$  und  $rT_3$ , die auch für das low- $T_3$ -syndrome diskutiert wird, hat auf den Metabolismus der Hormone ähnliche Auswirkungen wie eine unzureichende Konversion durch die 5'DI. Selbst bei normaler Aktivität der 5'DI ist dann eine Aktivierung von  $T_4$  zu  $T_3$  oder der Abbau von  $rT_3$  nicht in ausreichender Menge möglich.

Schließlich bleibt zu klären, ob die beiden anderen Isoformen der Deiodase (5'DII und 5D) in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Abweichungen in der Aktivität der 5'DII könnten beispielsweise mit einer gestörten feed-back-Regulation in der Hypophyse einhergehen und zur veränderten Situation im Schilddrüsenhormonhaushalt der Patienten beitragen.

Für die Patienten KR und SM ergaben sich im Laufe der Arbeit neue Ergebnisse aus weitergehenden Untersuchungen: Im Gen des Schilddrüsen-Transkriptions-Faktors-1 (TTF-1) auf Chromosom 14 zeigen die Patienten in einen Fall eine heterozygote Punktmutation, im anderen eine Deletion (del(14)(11.2;13.3)). Beide Veränderungen wurden als Funktionsverlust gedeutet, der die Klinik der Patienten mit kongenitaler Hypothyreose, mentaler Retardierung, Bewegungsstörungen und Lungenaffektion hinreichend erklären soll (Grüters A, 2000). Dies ist aus der Funktion von TTF-1 ersichtlich, der unter anderem für die Entwicklung und regelrechte Funktion der Lunge (beispielsweise in der Produktion von Surfactant) und der Schilddrüse (unter anderem durch Regulation der 5'DII-Expression) eine wichtige Rolle spielt (Gereben B et al., 2001). Eine andere Deletion des Gens wurde bereits bei einem Patienten mit neonataler Schilddrüsen-Fehlfunktion und Atemnotsyndrom nachgewiesen und für die Symptomatik verantwortlich gemacht (Devriendt K et al., 1998).

## 5 Zusammenfassung

Durch ihre Aufgaben im Metabolismus der Schilddrüsenhormone kommt der Enzymfamilie der Deiodasen im feinregulierten Zusammenspiel der Aktivierung und Inaktivierung dieser signalgebenden Stoffe eine zentrale Rolle zu.

Störungen in diesem System ziehen weitreichende Folgen auf der Ebene der Entwicklung und Steuerung des gesamten Organismus nach sich.

Verminderte Aktivität der 5'DI, sei sie durch unzureichende Expression des Gens oder posttranskriptionelle Fehlsteuerung bedingt, geht dabei mit einer sogenannten „Konversionshemmung“ einher, die sich in erhöhten T<sub>4</sub>- und rT<sub>3</sub>-Spiegeln bei vermindertem Plasma-T<sub>3</sub>-Gehalt äußert. Diese Konstellation wird in Tiermodellen, bei denen ein 5'DI-Defekt auf molekularer Ebene bekannt ist, beobachtet. Ein derartiger Defekt ist jedoch beim Menschen bislang nicht festgestellt worden.

Eine routinemäßige Untersuchung des 5'DI-Gens von Patienten, bei denen ein Enzymdefekt die Ursache ihrer Symptomatik sein könnte, ist mit Hilfe des hier aufgeführten Verfahrens unter einfachen Bedingungen möglich.

In dieser Arbeit wird neben der Beschreibung eines stummen Polymorphismus im Exon 1 erstmals eine potentiell relevante Veränderung im translatierten Bereich des 5'DI-Gens beschrieben. Ausgewählte Patienten, deren Symptome den Verdacht auf eine Konversionshemmung aufkommen lassen, sind (bei sonst unveränderter Exonstruktur) heterozygot für eine Punktmutation im Codon 108 im Exon 1. Durch den Austausch von G durch A ergibt sich bei ihnen aus dem Codon UGG für die Aminosäure Tryptophan das Stop- beziehungsweise SeCys-Codon UGA. Im ersten Fall entsteht dadurch ein etwa um die Hälfte verkürztes und damit wohl funktionsunfähiges Protein, im zweiten ein in Konformation und Aktivität sicherlich beeinträchtigtes Enzym, vorausgesetzt, das im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA befindliche SECIS-Element ist für dieses UGA-Codon wirksam. Bei beiden Varianten ist jedoch zu klären, ob der Defekt durch das zweite wildtypische Allel teilweise oder völlig kompensiert werden kann, wozu Untersuchungen von Gewebeproben aus Leber und Niere beziehungsweise die Expression des veränderten Gens in Zellkultur erforderlich wären.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Abe T, Kakyo M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert SC, Matsuno S, Kondo H, Yawo H: Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurochlorate and comparison with oatp2. *J Biol Chem* 273, 22395-22401, 1998
- [2] Araki O, Murakami M, Morimura T, Kamiya Y, Hosoi Y, Mori M: Assignment of type II iodothyronine deiodinase gene (dio2) to human chromosome band 14q24.2-q24.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 84, 73-74, 1999
- [3] Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ: Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* 272, 537-540, 1990
- [4] Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ: Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and the thyroid hormone deiodinases. *Am J Clin Nutr Suppl* 57, 236S-239S, 1993
- [5] Bartalena L, Bogazzi F, Brogioni S, Grasso L, Martino E: Role of cytokines in the pathogenesis of the euthyroid sick syndrome. *Eur J Endocrinol* 138, 603-614, 1998
- [6] Bates JM, St.Germain DL, Galton VA: Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140, 844-851, 1999
- [7] Baur A, Bauer K, Jarry H, Köhrle J: Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'-deiodinase type I and type II. *J Endocrinol* 167, 505-515, 2000
- [8] Baur A, Köhrle J: Type I deiodinase is stimulated by iodothyronines and involved in thyroid hormone metabolism in human somatomammotroph GX cells. *Eur J Endocrinol* 140, 367-370, 1999
- [9] Beckett GJ, MacDougall DA, Nicol F, Arthur R: Inhibition of type I and type II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. *Biochem J* 259, 887-892, 1989

- 
- [10] Beckett GJ, Nicol F, Rae PWH, Beech S, Gou Y, Arthur JR: Effects of combined iodine and selenium deficiency on thyroid hormone metabolism in rats. *Am J Clin Nutr Suppl* 57, 240S-243S, 1993
- [11] Behne D, Kyriakopoulos A: Effects of dietary selenium on the tissue concentrations of type I iodothyronine 5'-deiodinase and other selenoproteins. *Am J Clin Nutr Suppl* 57, 310S-312S, 1993
- [12] Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE: Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 311, 425-430, 1995
- [13] Berry MJ, Banu L, Chen Y, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR: Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353, 273-276, 1991a
- [14] Berry MJ, Banu L, Larsen PR: Type I deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349, 438-440, 1991b
- [15] Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR: Selenocysteine confers to the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 266, 14155-14158, 1991c
- [16] Berry MJ, Larsen PR: Molecular cloning of the selenocysteine-containing enzyme type I deiodinase. *Am J Clin Nutr Suppl* 57, 249S-255S, 1993
- [17] Berry MJ, Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR: Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. *Endocrinology* 131, 1848-1852, 1992a
- [18] Berry MJ: Identification of essential histidine residues in rat type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 267, 18055-18059, 1992b
- [19] Braverman LE, Ingbar SH, Sterling K: Conversion of thyroxine (T<sub>4</sub>) to triiodothyronine (T<sub>3</sub>) in athyreotic human subjects. *J Clin Invest* 49, 855-864, 1970
- [20] Buettner C, Harney JW, Larsen PR: The 3'-untranslated region of human type II iodothyronine deiodinase mRNA contains a functional selenocysteine insertion sequence element. *J Biol Chem* 273, 33374-33378, 1998

- [21] Bunevičius R, Kažanavičius G, Žalinekavičius R, Prange AJ: Effects of thyroxine as compared with thyroxine plus triiodothyronine in patients with hypothyroidism. *N Engl J Med* 340, 424-429, 1999
- [22] Chatterjee VK, Beck-Peccoz P: Hormone-nuclear receptor interactions in health and disease. Thyroid hormone resistance. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8, 267-283, 1994
- [23] Chomard P, Beltramo JL, Ben Cheikh R, Autissier N: Changes in thyroid hormone and thyrotrophin in the serum and thyroid glands of developing genetically obese male and female Zucker rats. *J Endocrinol* 142, 317-324, 1994
- [24] Contempré B, Duale NL, Dumont JE, Ngo B, Diplock AT, Vanderpas J: Effect of selenium supplementation on thyroid hormone metabolism in an iodine and selenium deficient population. *Clin Endocrinol* 36, 579-583, 1992
- [25] Contempré B, Dumont JE, Ngo B, Thilly CH, Diplock AT, Vanderpas J: Effect of selenium supplementation in hypothyroid subjects of an iodine and selenium deficient area: Possible danger of indiscriminate supplementation of iodine-deficient subjects with selenium. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 213-215, 1991
- [26] Contempré B, LeMoine O, Dumont JE, Deneff JF, Many MC: Selenium deficiency and thyroid fibrosis. A key role for macrophages and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ). *Mol Cell Endocrinol* 124, 7-15, 1996
- [27] Corvilian B, Contempré B, Longombré AO, Goyens P, Gervy-Decoster C, Lamy F, Vanderpas JB, Dumont JE: Selenium and the thyroid: how the relationship was established. *Am J Clin Nutr Suppl* 57, 244S-248S, 1993
- [28] Croteau W, Bodwell JE, Richardson JM, St.Germain DL: Conserved cysteines in the type 1 deiodinase selenoprotein are not essential for catalytic activity. *J Biol Chem* 273, 25230-25236, 1998
- [29] Darras VM, Hume R, Visser TJ: Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. *Mol Cell Endocrinol* 151, 37-47, 1999
- [30] Davies PH, Sheppard MC, Franklyn JA: Inflammatory cytokines and type I 5'-deiodinase expression in rat  $\beta_1$  liver cells. *Mol Cell Endocrinol* 129, 191-198, 1997

- [31] DePalo D, Kinlaw WB, Zhao C, Engelberg-Kulka H, St.Germain DL: Effect of selenium deficiency on type I 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 269, 16223-16228, 1994
- [32] Devriendt K, Vanhole C, Matthijs G, Zegher F de: Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med* 338, 1317-1318, 1998
- [33] Dickson RC, Tomlinson RH: Selenium in blood and human tissues. *Clin Chim Acta* 16, 311-321, 1967
- [34] Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F, Obregón MJ, Morreale de Escobar G: Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology* 137, 2490-2502, 1996
- [35] Fekkes D, Overmeeren-Kaptein E van, Docter R, Hennemann G, Visser TJ: Location of rat liver iodothyronine deiodinating enzyme in the endoplasmatic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 587, 12-19, 1979
- [36] Fleischhauer K, Groscurth P: Schilddrüse. In Drenkhahn D, Zenker W (Hrsg.): Benninghoff. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Band 2. 15. Auflage. 189-197, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 1993
- [37] Gereben B, Salvatore D, Harney JW, Tu HM, Larsen PR: The human, but not rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *Mol Endocrinol* 15, 112-124, 2001
- [38] Grüters A: Molecular mechanisms of congenital hypothyroidism. 11th International Congress of Endocrinology, Abstract 246, 2000
- [39] Hall R: Human DNA sequence from clone 167A19 on chromosome 1p32-33. Direct submission to Sanger Center, 1999
- [40] Hennemann G, Vos RA, Jong M de, Krenning EP, Docter R : Decreased peripheral 3,5,3'-triiodothyronine (T<sub>3</sub>) production from thyroxine (T<sub>4</sub>): a syndrome of impaired thyroid hormone activation due to transport inhibition of T<sub>4</sub>- into T<sub>3</sub>-producing tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1431-1435, 1993

- [41] Hernández A, Lyon GJ, Schneider MJ, St. Germain DL: Isolation and characterization of the mouse gene for type 3 iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 140, 124-130, 1999
- [42] Hernández A, Park JP, Lyon GJ, Mohandas TK, St. Germain DL: Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (dio3) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1. *Genomics* 53, 119-121, 1998
- [43] Hillgartner FB, Romsos DR: Impaired transport of thyroid hormones into livers of obese (ob/ob) mice. *Am J Physiol* 255, E54-E58, 1988
- [44] Hillgartner FB, Romsos DR: Regulation of iodothyronine 5'-deiodination in lean and obese (ob/ob) mice. *Am J Physiol* 249, E209-218, 1985
- [45] Holben DH, Smith AM: The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J Am Diet Assoc* 99, 836-843, 1999
- [46] Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich PW, Fishman SJ, Larsen PR: Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N Engl J Med* 343, 185-189, 2000
- [47] Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser R, Schmid M, Köhrle J: Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. *Genomics* 42, 361-363, 1997a
- [48] Jakobs TC, Schmutzler C, Meissner J, Köhrle J: The promotor of the human type I 5'-deiodinase gene. Mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element. *Eur J Biochem* 247, 288-297, 1997b
- [49] Jakobs TC: SSCP-Analysis of type I 5'-deiodinase exons. Unveröffentlichte Arbeit, o.J.
- [50] Janssen OE: Resistenz gegen Schilddrüsenhormone. *Internist* 39, 613-618, 1998
- [51] Kaminski T, Köhrle J, Ködding R, Hesch RD: Autoregulation of 3,3',5'-triiodothyronine production by rat liver microsomes. *Acta Endocrinol* 98, 240-245, 1981
- [52] Kaplan MM, Young JB: Abnormal thyroid hormone deiodination in tissues of ob/ob and db/db obese mice. *Endocrinology* 120, 886-893, 1987
- [53] Kates AL, Himms-Hagen J: Defective regulation of thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissues of ob/ob mice. *Am J Physiol* 258, E7-E15, 1990

- [54] Katzeff HL, Selgrad C: Impaired peripheral thyroid hormone metabolism in genetic obesity. *Endocrinology* 132, 989-995, 1993
- [55] Kleinhaus N, Faber J, Kahana L, Schneer J, Scheinfeld M: Euthyroid hyperthyroxinemia due to a generalized 5'-deiodinase defect. *J Clin Endocrinol Metab* 66, 684-688, 1988
- [56] Köhrle J, Jakobs TC, Schmutzler C: Genetics of iodothyronine deiodinase isoenzymes (Abstract). *Thyroid* 7, 687, 1997
- [57] Köhrle J, Schomburg L, Drescher S, Fekete E, Bauer K: Rapid stimulation of type I 5'-deiodinase in rat pituitaries by 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Mol Cell Endocrinol* 108, 17-21, 1995
- [58] Köhrle J: Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* 151, 103-119, 1999a
- [59] Köhrle J: The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie* 81, 527-533, 1999b
- [60] Köhrle J: Thyroid hormone deiodinases – a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med Austriaca* 23, 17-30, 1996
- [61] Köhrle J: Thyroid hormone deiodination in target tissues – a regulatory role for the trace element selenium? *Exp Clin Endocrinol* 102, 63-89, 1994
- [62] Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Amburgger P, Grüters A: Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism. *Horm Res* 53, 12-18, 2000
- [63] Lang F: Hormone. In: Silbernagl S, Lang F: *Taschenatlas der Pathophysiologie*. 280-285, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1998
- [64] Langsteger W: Diagnosis of thyroid hormone transport protein anomalies: An overview. *Acta Med Austriaca* 23, 31-40, 1996
- [65] Lee WS, Berry MJ, Hediger MA, Larsen PR: The type I iodothyronine 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid is located to the S3 segment of the rat kidney proximal tubule. *Endocrinology* 132, 2136-2140, 1993
- [66] Leonard DM, Stachelek SJ, Safran M, Farwell AP, Kowalik TF, Leonard JL: Cloning, expression, and functional characterization of the substrate binding subunit of rat type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 275, 25194-25201, 2000

- [67] Leonard JL, Ekenbarger DM, Frank SJ, Farwell AP, Köhrle J: Localization of type I iodothyronine 5'-deiodinase to the basolateral plasma membrane in renal cortical epithelial cells. *J Biol Chem* 226, 11262-11269, 1991
- [68] Leonhard JL, Visser TJ, Leonhardt DM: Characterization of the subunit structure of the catalytically active type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 276, 2600-2607, 2001
- [69] Maia AL, Berry MJ, Sabbag R, Harney JW, Laresen PR: Structural and functional differences in the *dio1* gene in mice with inherited type 1 deiodinase deficiency. *Mol Endocrinol* 9, 969-980, 1995a
- [70] Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Laresen PR: Effect of 3,5,3'-Triiodothyronine ( $T_3$ ) administration on *dio1* gene expression and  $T_3$  metabolism in normal and type I deiodinase-deficient mice. *Endocrinology* 136, 4842-4849, 1995b
- [71] Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL, Larsen PR: Cloning and in vitro expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 1133-1139, 1992
- [72] McIver B, Gorman CA: Euthyroid sick syndrome: An overview. *Thyroid* 7, 125-130, 1997
- [73] Moreno M, Berry MJ, Horst C, Thoma R, Goglia F, Harney JW, Larsen PR, Visser TJ: Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS-Lett* 344, 143-146, 1994
- [74] Neumann F, Schenck B, Schleusener H, Schweikert HU: Schilddrüsenhormone und Thyreostatika. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.): *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie*. 7. Auflage. 624-633, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1998
- [75] Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Calvo R, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G: Outer ring iodothyronine deiodinase and thyroid hormone economy: Response to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* 129, 2663-2673, 1991
- [76] Oertel M, Gross M, Rokos H, Köhrle J: Selenium-dependent regulation of type I 5'-deiodinase expression. *Am J Clin Nutr Suppl* 57, 313S-314S, 1993

- [77] Reinhardt W, Mann K: „Non-Thyroidal Illness“ oder Syndrom veränderter Schilddrüsenhormonparameter bei Patienten mit nichtthyreoidalen Erkrankungen. *Med Klin* 93, 662-668, 1998
- [78] Richard K, Hume R, Kaptein E, Sanders JP, Torr H van, Herder WW de, Hollander JC den, Krenning EP, Visser JT: Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2868-2874, 1998
- [79] Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED: Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodine in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141, 839-845, 2000
- [80] Safran M, Farwell AP, Leonard JL: Evidence that type II 5'-deiodinase is not a selenoprotein. *J Biol Chem* 266, 13477-13480, 1991
- [81] Salvatore D, Harney JW, Larsen PR: Mutation of the Secys residue 266 in type 2 selenodeiodinase alters <sup>75</sup>Se incorporation without affecting its biochemical properties. *Biochimie* 81, 535-538, 1999
- [82] Salvatore D, Low SC, Berry M, Maia AL, Harney JW, Croteau W, St.Germain DL, Larsen PR: Type 3 iodothyronine deiodinase: Cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest*, 96, 2421-2430, 1995
- [83] Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR: Type II iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 98, 962-968, 1996
- [84] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989
- [85] Sasaki S, Nakamura H, Tagami T, Miyoshi Y, Nakao K: Functional properties of a mutant T<sub>3</sub> receptor beta (R338W) identified in a subject with pituitary resistance to thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 30, 109-117, 1995
- [86] Schilling JU, Zimmermann T, Albrecht S, Zwipp H, Saeger HD: Low-T<sub>3</sub>-Syndrom bei Polytraumapatienten – Phänomen oder wichtiger pathogenetischer Faktor? *Med Klin* 94, 66-69, 1999
- [87] Schmutzler C, Köhrle J: Implications of the molecular characterization of the sodium-iodine symporter (NIS). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106, S1-S10, 1998

- [88] Schoemakers CHH, Pigmans IGAJ, Poland A, Visser TJ: Impairment of the selenoenzyme type I iodothyronine deiodinase in C3H/He mice. *Endocrinology* 132, 357-361, 1993
- [89] Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J: Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 791-798, 1994
- [90] Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karnishki LP: The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodine transport protein. *Nat Genet* 21, 440-443, 1999
- [91] St.Germain DL, Galton VA: The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7, 655-668, 1997
- [92] Stryer L: *Biochemie*. Aus dem Engl. übers. von Stoll G, Pfeiffer B, Guglielmi J. 4. Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
- [93] Toyoda N, Berry MJ, Harney JW, Larsen PR: Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem* 270, 12310-12310, 1995
- [94] Toyoda N, Kleinhaus N, Larsen PR: The structure of the coding and 5'-flanking region of the type 1 iodothyronine deiodinase (dio1) gene is normal in a patient with suspected congenital dio1 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2121-2124, 1996
- [95] Toyoda N, Nishikawa M, Horimoto M, Yoshikawa N, Mori Y, Yoshimura M, Masaki H, Tanaka K, Inada M: Synergistic effect of thyroid hormone and thyrotropin on iodothyronine 5'-deiodinase in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* 127, 1199-1205, 1990
- [96] Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondou A, Ogawa Y, Yonemoto T, Yoshimura M, Masaki H, Inada M: Thyrotropine and triiodothyronine regulate iodothyronine 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* 131, 389-394, 1992
- [97] Vanderpas JB, Contempré B, Duale NL, Deckx H, Ngo B, Longombré AO, Thilly CH, Diplock AT, Dumont JE: Selenium deficiency mitigates hypothyroxinemia in iodine-deficient subjects. *Am J Clin Nutr Suppl* 57, 271S-275S, 1993

- 
- [98] Voigt K: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-System: Stimulation des Stoffwechsels und des Wachstums durch Schilddrüsenhormone. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.): Lehrbuch der Physiologie. 2. Auflage. 470-477, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1996
- [99] Vos RA, Jong M de, Bernard BF, Docter R, Krenning EP, Hennemann G: Impaired thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine handling by rat hepatocytes in the presence of serum of patients with nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2364-2370, 1995
- [100] Watson AY, Leonard JL, Radie KA, Mellen SA, Murphy RA: Alterations in the pituitary-thyroid axis 5'-deiodinase activity in mice with muscular dystrophy. *Endocrinology* 116, 2201-2208, 1985
- [101] Young RA, Fang SL, Prosky J, Braverman LE: Hepatic conversion of thyroxine to triiodothyronine in obese and lean Zucker rats. *Life Sci* 34, 1783-1790, 1984

## 7 Anhang

Referenz für die Gen- und Aminosäure-Sequenz der 5' DI ist die Veröffentlichung von Hall (Hall R, 1999).

### 7.1 Gensequenz der Typ I-5'-Deiodase

Exon 1, flankierende Intronbereiche und Bindungsstellen der PCR-Primer
<p>agaatctctcaaaagctcaggcaaagaattggaaatgataatgattaaaacagacctt  gtgcacctgggttaggaatcttctatctcatgacagaaaggcaaacatcttctgacctga  ctccttcccctgacctgggggttggtgctcctaccctgcaccttcattcagctccgcc  agtgttgccctggctgcagcctc <b><u>tctgccaatagaactcagagc</u></b>ttactctggctttgcc  gagatggggctgccccagccagggctgtggctgaagaggtctgggtgctcttggaggt  <b>ggctgtgcatgtggctgtgggtaaagtgcttctgatattgtttccagacagagtcaagc</b>  <b>ggaacatcctggcca tgggcgagaagacgggtatgaccaggaacccccatttcagccac</b>  <b>gacaactggataccaacctttttcagcaccagatattctggttcgtcttgaaggtccg</b>  <b>ttggcagcgacttagaggacacgactgagctagggggtctggcccaactgccgggtgg</b>  <b>tccgcctctcaggacagaggtgcaacatttgggagtttatgcaaggtcaggaggctgcc</b>  ac <b><u>acacttgaggggtgcttgaaa</u></b>tagcagtggttagagggggatgaagagatgggttgg  aagtctgaattctcctactacttttctgctccttttggacctcttctgctcttct  gcttctgaaactagaacttcttgtggattgtttctctaagtaacatcaccaccttccc</p>
Exon 2, flankierende Intronbereiche und Bindungsstellen der PCR-Primer
<p>gtgcctaggaccatcctggggtgggggtagggggaaataaaaataacagaattgaac  ataggagtgaaaatggtgcttgtaaaagaaagctgtgtgtag <b><u>ggctcagtttgtgatg</u></b>  <b><u>gttg</u></b>ttgctgtttcaggt <b>aataggccactgggtgctgaattttggaagttgtacctgacc</b>  <b>ttcatttatgttcaaatttgaccagttcaagaggttattgaagactttagttccatag</b>  <b>cagattttcttgctcatttacattgaagaagcacatgcatcaggtacagaaag <u>attctct</u></b>  <b><u>gcctctctacctc</u></b>ttcccactgtcttttctctctccttttccccaggeccccatctca  aggttgggaggtggaaggaggaagaggaggggagaggggaaagagccactattcactgag</p>

Exon 3, flankierende Intronbereiche und Bindungsstellen der PCR-Primer	
<p>aaaccaggccaaatcattgccaaagggctcctctgagaacctcagttaaaagtgaggggc  tatttagtctgcaggaagt<u>gtgtgctgtgtcaatgggactc</u>gggtgcctggcctttctct  ttagatggctgggcttttaagaacaacatggacatcagaaatcaccagaaccttcagg  <b>atgcctgcaggcagccatctactgctggccaggagccccagtgcctgtggtggtg</b>  <b>gacaccatgcagaaccagagcagccagctctacgcagcactgcctgagaggctctacat</b>  <b>aatccaggagggcaggatcctctacaagg</b>gtggtgacctggggacagggggccaggagg  ggcaaaggggcccaggaggggcaa<u>gggcaaagagaaggctttgca</u>tcaagcagaactgg  attcaatcaccaccagccacttaccagccatgtgacctgggagtgctttcactt</p>	
Exon 4, flankierende Intronbereiche und Bindungsstellen der PCR-Primer	
<p>tgatggctcctacacagacatcatttgaccacctcttgcaactaacctccagacctaca  tgttccttacaacttgaaatcctt<u>acaagttgggaatgcctgatt</u>cgtttctcttgca  <b>ggtaaatctggcccttggaactacaaccagaggaagttcgtgctggttctggaaaagc</b>  <b>tccacagt</b>taatctggacag<u>atacctcaattctaggtgacc</u>aacgggagggcttctcaa  ggcttagctctccctgagaccagctggcttttacccttgacctgtgtccctagctgaa  ttagctcagattttctgatctaagcaacaactccagctgaggaatgcaggcca</p>	
<b>fett</b> normal <u><b>fett-unterstrichen</b></u>	= translatierter Bereich = Introns beziehungsweise untranslatierter Bereich = Bindungsstellen der PCR-Primer

## 7.2 Aminosäuresequenz der Typ I-5'-Deiodase

Exon 1
M G L P Q P G L W L K R L W V L L E V A V H V V V G K V L L I L F P D R V K R N I L A M G E K T G M T R N P H F S H D N W I P T F F S T Q Y F W F V L K V R W Q R L E D T T E L G G L A P N C P V V R L S G Q R C N I W E F M Q G
Exon 2
N R P L V L N F G S C T S e C P S F M F K F D Q F K R L I E D F S S I A D F L V I Y I E E A H A S D
Exon 3
G W A F K N N M D I R N H Q N L Q D R L Q A A H L L L A R S P Q C P V V V D T M Q N Q S S Q L Y A A L P E R L Y I I Q E G R I L Y K
Exon 4
G K S G P W N Y N P E E V R A V L E K L H S

## **Danksagung**

Folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt mein besonderer Dank:

- Meinem Doktorvater, Prof. Dr. J. Köhrle, für die Überlassung des Themas und die Freiheit bei der Ausgestaltung und der zeitlichen Einteilung
- Meiner Betreuerin, PD Dr. C. Schmutzler, für die hervorragende theoretische und praktische Begleitung in allen Phasen der Arbeit
- Den Ärzt/Innen Prof. A. Grütters-Kieslich, Prof. M. Derwahl und Dr. R. Finke für das Überlassen von DNA-Proben der beschriebenen Patienten
- Meinen Kommilitonen und Freunden S. Hoffmann und M. Georgi für das kritische Durchsehen der Arbeit
- Dem Team der Klinischen Forschergruppe an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg für viele praktische Ratschläge und Hilfestellungen
- Last not least: Meiner Frau Judith für ihre Hilfe in jeder Beziehung

Ohne die freundliche Mithilfe dieser Personen wäre die Durchführung der Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Michael Wohlleben  
geb. am 17.11.1975 in Würzburg  
verheiratet

### Ausbildung

1982-1986 Grundschule, Würzburg-Lengfeld  
1986-1995 Friedrich-König-Gymnasium, Würzburg  
1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg,  
Stipendiat nach Bayer. Begabtenförderungsgesetz  
1998-2003 Promotion an der Medizinischen Poliklinik der Universität  
Würzburg, Prof. Dr. J. Köhrle; Thema: „Sequenzanalyse des humanen  
5´-Deiodase (Typ I)-Gens bei Patienten mit  
Schilddrüsenfunktionsstörungen“  
2002-2003 Praktisches Jahr:  
Missionsärztliche Klinik Würzburg, Innere Medizin  
Kantonsspital Münsterlingen (Thurgau/Schweiz), Chirurgie und Urologie  
Universitätsklinik Würzburg, Pädiatrie  
Seit 7/2003 Arzt im Praktikum, Universitätskinderklinik, Würzburg

### Praktische Tätigkeiten

1995-1996 Zivildienst im St.-Josefs-Stift für behinderte Menschen, Eisingen  
1996 Pflegepraktikum in der Mönchberg-Klinik, Würzburg (Pädiatrie)  
1999 Famulatur in Allgemeinmedizinischer Praxis, Würzburg  
2000 Famulatur in der Mainklinik, Ochsenfurt (Chirurgie)  
Famulatur in der Mönchberg-Klinik, Würzburg (Pädiatrie)  
2001 Famulatur im Lutheran Hospital Machame, Tanzania  
(Gynäkologie, Pädiatrie)

### Zusatzqualifikationen / sonstige Interessen

Zusatzkurse in Ethik in der Medizin, Tropenmedizin, Chirurgie, Anatomie, und  
„medical english“  
Kenntnisse in PC-Text- und Grafikverarbeitung, sowie Internet-Anwendungen  
Seit 1986 Engagement in der Katholischen Kirche, v.a. moderne geistliche Musik  
und Jugendarbeit  
Seit 1996 ehrenamtliche Mitarbeit im St.-Josefs-Stift für behinderte Menschen,  
Eisingen  
Seit 1999 Mitglied im Leitungsteam der kath. Laiengemeinschaft Jedidja, Würzburg

