

---

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt  
Ludwig-Maximilians-Universität  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

Vergleich von Thyroxin-bindendem Globulin verschiedener Spezies

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu  
München

Vorgelegt von  
Joerg Schelling  
aus  
Freiburg  
2002

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Gärtner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Hofmann  
Prof. Dr. W. Machleidt

Betreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. O. E. Janssen

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2002

---

Auszüge der Arbeit wurden 1998 als Vortrag auf dem IV. European Congress of Endocrinology in Sevilla, Spanien, unter dem Titel „Comparison of Thyroxin-binding globulin of different species“ vorgestellt.

Auszüge der Arbeit wurden 1998 als Poster unter dem selben Titel auf dem 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society in New Orleans, USA, vorgestellt.

---

Meinen geliebten Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<b>AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>2. EINFÜHRUNG</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Die Schilddrüse (Glandula Thyroidea)</b>	<b>13</b>
2.1.1 Die Schilddrüse beim Menschen	13
2.1.2 Die anatomischen Unterschiede der Schilddrüse bei anderen Säugetieren	14
<b>2.2 Das TBG (Thyroxin-bindendes Globulin)</b>	<b>18</b>
2.2.1 Physiologische Bedeutung des TBG	18
2.2.2 Die Konzentration von TBG im menschlichen Serum	20
2.2.3 Der Transport von Schilddrüsenhormonen im menschlichen Serum	21
2.2.4 Hormontransport bei anderen Spezies	22
2.2.5 TBG in verschiedenen Körperflüssigkeiten	24
2.2.6 Struktur des humanen TBG	25
2.2.7 Stabilität	25
<b>2.3 TBG und die Superfamilie der Serpine</b>	<b>26</b>
2.3.1 Überblick über die Serpine	26
2.3.2 Kristallstruktur der Serpine	27
<b>2.4 Bekannte Varianten von TBG</b>	<b>29</b>
2.4.1 Allgemeines	29
2.4.2 TBG-Varianten mit normalem Serumspiegel	30
2.4.3 TBG-Exzeß	32
2.4.4 Partielle Defizienz von TBG (TBG-PD)	32
2.4.5 Komplette Defizienz von TBG (TBG-CD)	34
<b>2.5 TBG bei verschiedenen Tierarten</b>	<b>34</b>
2.5.1 Charakterisierung animalischer TBG-Varianten	34
2.5.2 TBG beim Schwein	35
2.5.3 TBG bei der Ratte	35
2.5.4 TBG beim Schaf	35
<b>2.6 Ziele der vorliegenden Arbeit</b>	<b>36</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Überblick über die untersuchten Tierarten</b>	<b>37</b>
3.1.1 Ursäuger (auch Monotremata, Prototheria, Non-Theria, Kloakentiere)	40
3.1.2 Beuteltiere (auch Marsupialia, Methatheria)	41
3.1.3 Echte oder Höhere Säuger (auch Eutheria, Placenta-Tiere)	42
3.1.4 Systematik der Säugetiere (orientierender Überblick)	43
<b>3.2 Bindungstest</b>	<b>50</b>
3.2.1 Allgemeines	50
3.2.2 Überblick über alle untersuchten Tierarten	51
3.2.3 Bindungskapazität nach Ordnungen	53
3.2.4 Bindungskapazität der Fleischfresser und Pflanzenfresser	55
3.2.5 Entwicklungsgrad der Primaten	58

3.2.6 Geographische Auffälligkeiten	59
3.2.7 Tageszeit der Nahrungssuche und Aktivität	60
<b>3.3 Scatchard-Analyse</b>	<b>61</b>
<b>3.4 Hitzedenaturierung</b>	<b>63</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>69</b>
4.1 In Zukunft zu untersuchende Tierarten	69
4.2 Molekular genetisch zu untersuchende Tierarten	76
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>77</b>
<b>6. VERWENDETE GERÄTE, MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>78</b>
6.1 Geräte	78
6.2 Materialien	78
6.3 Methoden	79
6.3.1 T4-Bindungstest	79
6.3.2 Scatchard-Analyse der Bindungsaffinität von TBG	81
6.3.3 Hitzedenaturierung	83
6.4 Mehrsprachige Liste der untersuchten Tierarten	84
6.5 Beispieltabelle für die Berechnung der relativen T4-Bindung	85
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>86</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>106</b>
<b>9. LEBENSLAUF</b>	<b>107</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Formel von <math>T_4</math> (Thyroxin)</i> .....	18
Abbildung 2: <i>Funktionen der Serpine</i> .....	27
Abbildung 3: <i>Stammbaum des TBG</i> .....	36
Abbildung 4: <i>Tachyglossus aculeatus (Kurzschnabeligel)</i> .....	40
Abbildung 5: <i>Didelphis virgiana (Amerikanisches Opossum)</i> .....	41
Abbildung 6: <i>Felis lybica (Stammform der Hauskatze)</i> .....	42
Abbildung 7: <i>Macaca mulatta (Rhesusaffe)</i> .....	43
Abbildung 8: <i>Bindungskapazität verschiedener Tierarten</i> .....	52
Abbildung 9: <i>Bindungskapazität der reinen Fleischfresser</i> .....	56
Abbildung 10: <i>Bindungskapazität der Insekten- und Kleintierfresser</i> .....	56
Abbildung 11: <i>Bindungskapazität der reinen Pflanzenfresser</i> .....	57
Abbildung 12: <i>Stammbaum der Primaten</i> .....	58
Abbildung 13: <i>Bindungskapazität im Verhältnis zur Neencephalisation</i> .....	59
Abbildung 14: <i>Bindungskapazität von Tierarten aus Indien / SO-Asien</i> .....	60
Abbildung 15: <i>Scatchard der Haustierarten</i> .....	62
Abbildung 16: <i>Scatchard verschiedener Tiertarten</i> .....	62
Abbildung 17: <i>Hitzenaturierung des TBG bei 55°C (1)</i> .....	63
Abbildung 18: <i>Hitzenaturierung des TBG relativ zum Ausgangswert (1)</i> .....	64
Abbildung 19: <i>Hitzenaturierung des TBG bei 55°C (2)</i> .....	65
Abbildung 20: <i>Hitzenaturierung des TBG relativ zum Ausgangswert (2)</i> .....	65
Abbildung 21: <i>Hitzenaturierung des TBG bei 55°C (3)</i> .....	67
Abbildung 22: <i>Hitzenaturierung des TBG relativ zum Ausgangswert (3)</i> .....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Vergleich von TBG, TTR und Albumin</i> .....	22
Tabelle 2: <i>Systematik der Säugetiere</i> .....	48
Tabelle 3: <i>Progressionsindex bei verschiedenen Primaten</i> .....	49
Tabelle 4: <i>Bindungskapazität (Klassen)</i> .....	53
Tabelle 5: <i>Bindungskapazität nach Ordnungen (Überblick)</i> .....	54
Tabelle 6: <i>Mehrsprachige Liste der untersuchten Tierarten</i> .....	85
Tabelle 7: <i>Berechnung der relativen T4-Bindung</i> .....	85



## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AT	Alpha <sub>1</sub> -Antitrypsin
AT3	Antithrombin III
BP	Barbital Puffer
BSA	Bovines Serumalbumin
CBG	Corticosteroid-bindendes Hormon
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
°C	Grad Celsius
dest.	Destilliert
f	Femto
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
HWZ	Halbwertszeit
I	Stromstärke
IEF	Isoelektische Fokussierung
IP	Isoelektrischer Punkt
J	Jodid
K <sub>a</sub>	Bindungsaffinität
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LBST	Ligandenbindungsstelle
m	Milli
M	Molar
μ	Mikro
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
n	Nano

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Protease-Inhibitor
rT <sub>3</sub>	Reverses Trijodthyronin
t	Zeit
T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
T <sub>4</sub>	Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TBG-A	TBG-Aborigine
TBG-CD	TBG-Complete Deficiency
TBG-Ch	TBG-Chicago
TBG-F	TBG-Fast
TBG-G	TBG-Gary
TBG-H	TBG-Houston
TBG-M	TBG-Montreal
TBG-N	Natives TBG
TBG-PDJ	TBG-Partial Deficiency Japan
TBG-Q	TBG-Quebec
TBG-S	TBG-Slow
TBG-SD	TBG-San Diego
TPO	Schilddrüsenperoxidase
TRH	Thyreotropin-releasing Hormon
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
TT <sub>3</sub>	Gesamt-Trijodthyronin
TT <sub>4</sub>	Gesamt-Thyroxin
TTR	Transthyretin
U	Spannung
UV	Ultraviolett
VT	Volumenanteile
W	Watt

## 1. Einleitung

Diese Dissertation soll einen Überblick über die unterschiedlichen Eigenschaften des tierischen Thyroxin-bindenden Globulins in Hinblick auf Bindungsaffinität, Bindungskapazität, Hitzestabilität bei zahlreichen europäisch-regionalen und ausländischen Spezies der Klasse der Säugetiere schaffen. Sie soll Hinweise und Erkenntnisse in Bezug auf die phylogenetische Entwicklung des TBGs liefern und gegebenenfalls zu weiterführenden Untersuchungen in diesem Bereich anregen. Die Auswahl von geeigneten Spezies, die für eine molekulargenetische Analyse in Frage kommen könnten, soll durch diese Dissertation erleichtert werden.

Das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) ist im Normalfall das bedeutendste Transportprotein für Schilddrüsenhormone im Blut des Menschen und der meisten Säugetiere. Es zeichnet sich zum einen durch eine außerordentlich hohe Bindungsaffinität zu Thyroxin ( $T_4$ ) und Trijodthyronin ( $T_3$ ), zum anderen durch eine große Spezifität für diese Hormone aus.

Aufgrund der Homologie seiner Aminosäuresequenz gehört TBG zur Superfamilie Serpine (Serin-Protease-Inhibitoren). In Anlehnung an die Kristallstruktur des  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor ( $\alpha_1$ -PI), wird das den Serpinen eigene  $\alpha$ -barrel als Ligandenbindungsstelle des TBG angenommen. Eine exakte Charakterisierung der Eigenschaften des TBG würde die Aufklärung seiner Röntgenkristallstruktur erfordern. Dies ist bis heute nicht gelungen.

Die beim Menschen vorkommenden und ausführlich untersuchten TBG-Varianten sind mit einer einzigen Ausnahme durch eine Instabilität des Moleküls gekennzeichnet, so daß ihre Charakterisierung keine weiteren spezifischen Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus des Proteins erlaubt.

Eine erfolgversprechende und sinnvolle Alternative zu den bisher angewandten Verfahren stellt der Vergleich des menschlichen TBG mit dem anderer Säugetiere dar. Um einzelne TBG-Varianten bei anderen

Spezies genauer untersuchen zu können, muß zuerst ein Überblick über die laboranalytisch einfacher zu ermittelnden Eigenschaften wie Bindungsaffinität, Bindungsspezifität, Hitzestabilität und Verhalten im elektrischen Feld geschaffen werden. Anschließend kann dann die Sequenzierung des TBGs und der Vergleich mit den bereits bekannten Daten zu einer Vertiefung des Verständnisses der Struktur-Funktions-Korrelation führen. Bislang wurde das TBG von Ratte, Schaf, Schwein und Rind auch auf molekulargenetischer Ebene charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit werden jetzt zahlreiche andere und vor allem auch einige exotischere Spezies proteinbiochemisch analysiert, um auf der Grundlage der erhobenen Daten weitere Arten detaillierter zu untersuchen.

## 2. Einführung

### 2.1 Die Schilddrüse (*Glandula Thyroidea*)

#### 2.1.1 Die Schilddrüse beim Menschen

Die menschliche Schilddrüse ist ein prätracheal und präalaryngeal gelegenes Organ, welches annäherungsweise Schmetterlingsform hat. Die zwei ovalen länglichen Lappen, die über ein Verbindungsstück, den sogenannten Isthmus, zusammenhängen, erreichen physiologischerweise ein Gesamtgewicht von 17-19g bei der Frau und 23-27g beim Mann. Auf histologischer Ebene ist die Schilddrüse aus einzelnen Follikeln (funktionellen Einheiten) aufgebaut, die von einschichtigen Thyreozyten begrenzt werden. Im Lumen befindet sich das Kolloid, welches vor allem aus Thyreoglobulin besteht. Außerdem findet man noch die calcitoninbildenden C-Zellen, deren Funktion aber für diese Arbeit keine Bedeutung hat.

Die herausragende endokrine Funktion dieses Organs ist die Produktion und Speicherung der beiden Hormone Thyroxin ( $T_4 = L_{3,5,3',5'}$ -Tetraiodthyronin) und Trijodthyronin ( $T_3 = L_{-3,5,3'}$ -Trijodthyronin). Diese sind für einen normalen Ablauf der physiologischen Vorgänge im Organismus erforderlich, wobei sie in der Regel katabole Stoffwechselprozesse in Gang setzen. Sie spielen des weiteren eine wichtige Rolle in der Wachstumsphase des Körpers und bei der Gehirnreifung. Insgesamt sind sie am Kohlenhydrat-, Eiweiß-, Fett- und Mineralstoffwechsel des menschlichen Körpers beteiligt und spielen zudem eine Rolle bei Vorgängen im zentralen Nervensystem und in der Muskulatur. In der Schilddrüse ist bei normaler Funktion ein Hormonvorrat für etwa zwei Monate vorhanden.

### 2.1.2 Die anatomischen Unterschiede der Schilddrüse bei anderen Säugetieren

Die Schilddrüse entsteht bei allen Säugetieren aus einer unpaaren und einer paarigen Ausstülpung des Epithels der Backenhöhle. Die unpaare, mediane Anlage entwickelt sich als eine Epithelausstülpung der Schlundwand in der Gegend des zweiten und dritten Schlundbogens. Diese Ausstülpung ist entweder kompakt oder hohl.

Sie wird dann zu einem mit einer Höhle versehenen Bläschen, welches später seinen Hohlraum wieder einbüsst. Auf späterer Stufe steht die Anlage nur durch ein schwaches Epithelialband mit dem Pharynx in Verbindung, das auch später meist verschwindet. Der untere Teil der Anlage teilt sich bald in zwei mehr oder minder deutlich getrennte Lappen. Die paarigen, lateralen Schilddrüsenanlagen kommen von dem Epithel der vierten Schlundspalte her. Sie schnüren sich als rundliche Bläschen ab und kommen unmittelbar an der Seite des Kehlkopfeinganges zu liegen.

Bei der Katze entwickelt sich die definitive Schilddrüse ausschließlich aus der medianen Anlage. Aus den Befunden beim Schnabeligel (*Tachyglossus*) ergibt sich, dass sie zwar zuerst dieser Spalte angeschlossen sind, dass sie aber, bevor sie sich vom Mutterboden ablösen, von dieser Spalte auf die seitliche Schlundwand abrücken. Das ganze Organ wird von einer bindegewebigen Kapsel umgeben. Während in Bezug auf den allgemeinen Bau der fertigen Schilddrüse beim Menschen und Tier keine generellen Unterschiede bestehen, mag hier das Vorkommen von quergestreiften Muskelfasern in der Schilddrüse hervorgehoben werden. Während diese Muskelfasern beim Menschen und wohl auch beim Hunde ein nur gelegentliches Vorkommniß sind, findet man sie beim Kaninchen konstant. Hier entspringt ein Muskel von der lateralen Fläche des Ringknorpels und

zieht lateral- und dorsalwärts an die mediale Fläche der Schilddrüse, wo er am Bindegewebe zwischen den Schilddrüsenbläschen ansetzt.

Bezüglich des topographischen Verhaltens, der Gestalt, Grösse u. s. w. der Schilddrüse ist folgendes anzumerken: Der Isthmus ist meist weniger entwickelt als beim Menschen, kann sogar fehlen. Der Schwund des anfangs wohl besser entwickelten Isthmus ist bei einigen Wiederkäuern, bei Pferd und Schaf im fortgeschrittenen Alter zu beobachten. Von den seitlichen Drüsenkörpern (oder Lappen) sind die oralen Enden meist stärker ausgebildet als die kaudalen.

Bisweilen, nämlich bei Gürteltier (*Dasypus*), Maus, Katze und Mensch sitzt dem Isthmus ein kopfwärts verlaufender *Processus pyramidalis* auf. Am häufigsten findet man diesen jedoch bei Esel und Maultier.

Was das Volumen der Schilddrüse betrifft, so ist dieses wohl im Verhältnis zur Grösse des Tieres am geringsten bei den Känguruhs; klein auch bei den Lemuren und dem Pferd. Am relativ grössten ist sie bei den Fleischfressern. Größe und Gewicht variieren aber nicht nur tierartlich sondern auch individuell je nach Alter und Geschlecht, klimatischen Verhältnissen und Jahreszeit, beträchtlich. So werden bei Hund, Rind, Schaf und Pferd für schwere Rassen niedrigere Schilddrüsen Gewichte angegeben als für leichte und bei Höhenrindern ist das relative Schilddrüsen gewicht größer als beim sogenannten Niederungsvieh.

Obwohl die Angaben über Geschlechtsunterschiede der Schilddrüsen gewichte nicht einheitlich sind, darf wohl festgehalten werden, daß weibliche Tiere, vor allem, wenn sie bereits mehrmals trächtig gewesen sind, schwerere Schilddrüsen besitzen als männliche, und dass sich auch Kastraten (Ochse, Wallach o.ä.) anscheinend durch ein erhöhtes Drüsen gewicht auszeichnen.

Ferner scheint bei den Säugetieren das Schilddrüsen gewicht bis zu einem mittleren Alter zuzunehmen, um dann bei alten Tieren allmählich wieder abzusinken und schließlich sind auch jahreszeitliche Schwankungen des

Schilddrüsenorgane zu beobachten, wobei es im Herbst und Winter in der Regel zu einer Gewichtserhöhung kommt.

Betreffs des Verhaltens der Schilddrüse bei den einzelnen Ordnungen mag im einzelnen an besonderen Auffälligkeiten Folgendes bemerkt werden.

*Kloakentiere (Monotremata):* Beim Schnabeligel (*Tachyglossus*) vereinigen sich der mediane Schilddrüsenteil und die paarigen seitlichen Körper niemals mit einander. Letztere liegen mehr kopfwärts, weit von der Hauptdrüse getrennt. Durch dieses Selbständigbleiben der Schilddrüsentheile nähert sich der Schnabeligel anatomisch den niederen Wirbeltieren. Untersuchungen ergaben weiterhin, dass der Schnabeligel hinsichtlich der medianen Schilddrüse einen sehr primitiven Zustand darstellt, da bei allen Säugetieren die Schilddrüse nur in embryonaler Zeit eine so tiefe Lage wie bei diesem Tier erkennen lässt.

*Beuteltiere (Marsupialia):* Bei der sehr kleinen Schilddrüse des Riesenkänguruhs (*Macropus giganteus*) ist der Isthmus durch ein Drüsenkörperchen von Stecknadelkopfgrosse, das mit der Kapsel der seitlichen Drüsenlappen verbunden ist, repräsentiert. Bei den Moschusrattenkänguruhs (*Hypsiprymnus*) ist meist ein Lobus pyramidalis vorhanden, der von einem der seitlichen Lappen ausgeht.

*Zahnlose (Edentata):* Beim Faultier (*Bradypus*) besteht die Drüse aus einem kleinen medialen und zwei grösseren lateralen Lappen, die ganz von einander getrennt sind. Gelegentlich findet sich ein Isthmus und ein Lobus pyramidalis beim Gürteltier (*Dasypus*). Bei einigen Zahnlosen wiederum sind zwei Lappen der Drüse nicht zu erkennen, da sie sich vor der Luftröhre von einer Seite auf die andere erstreckt. Bei einigen Untergattungen der Faultiere (*Bradypus*) liegt die Schilddrüse sehr tief und wird vom Manubrium sterni bedeckt.

*Insektenfresser (Insectivora):* An der stark verlängerten Drüse einiger Insektenfresser findet sich ein „*Musculus levator thyreoideae*“. Es setzt sich nämlich ein Teil der median gelegenen Fasern des *M. thyreoideoideus*



über die Insertionsteile der übrigen Muskelfasern hinaus fort, um in die Kapsel des Drüsenlappens im hinteren oberen Bezirk auszustrahlen. Ein Teil der den *M. levator thyreoideae* bildenden Fasern nimmt seinen Ursprung aber auch da, wo der *M. sternothyreoideus* an deren Schildknorpel ansetzt. Der Schilddrüsenmuskel wird als ein Differenzierungsprodukt dieser ursprünglich einen Muskel bildenden Muskelteile angesehen.

*Fledertiere (Chiroptera)*: Wenn überhaupt ein Isthmus vorhanden ist, dann sehr schwach.

*Raubtiere (Carnivora)*: Die Lappen sind hier meist rundlich bis gestreckt oval.

*Unpaarhufer (Perissodactyla)*: Die Seitenlappen haben beim Pferd die Gestalt einer Pflaume oder Kastanie, und in der Regel sind beide Lappen nur durch einen dünnen bindegewebigen Strang verbunden.

*Paarhufer (Artiodactyla)*: Beim Flusspferd (Hippopotamus) liegt die Drüse weit distalwärts (im Bereich des 9.-14. Trachealringes), unmittelbar vor der Brustapertur. Bei der Mehrzahl der Wiederkäuer ist ein Isthmus an der stets gut entwickelten Drüse vorhanden.

*Primaten (Primates)*: Für die Affen ist charakteristisch, dass beide Lappen, meist dünn und weit von einander entfernt, seitlich die untere Partie des Larynx und das obere Ende der Trachea bedecken. Der Isthmus ist dünner und länger als beim nahe verwandten Menschen und verbindet beide Lappen in der Mitte oder am unteren Ende. Es wurde auch ein doppelter Isthmus bei manchen Altweltaffen, insbesondere bei den Pavianen beobachtet.

## 2.2 Das TBG (Thyroxin-bindendes Globulin)

Das TBG bindet Thyroxin ( $T_4$ ) und Trijodthyronin ( $T_3$ ) sowohl mit hoher Affinität als auch Spezifität. Aus diesem Grund ist es zur Untersuchung der Interaktion zwischen einem Transportprotein und seinem physiologischen Liganden hervorragend geeignet.

Mit dem  $T_4$ -Bindungstest kann man das Vorhandensein von TBG im Serum überprüfen und die Konzentration, sowie die Bindungsaffinität der Ligandenbindung, sind mit einem Scatchard einfach und zuverlässig zu bestimmen.

Die Stabilität, mit der die Funktion aufrechterhalten wird, läßt sich durch die Hitzedenaturierung des Proteins und anschließende Bestimmung der residualen  $T_4$ -Bindungskapazität ebenfalls gut ermitteln.

Als problematisch erweist sich allerdings das Verständnis der Struktur im Vergleich zur Funktion. Obwohl die Aminosäuresequenz des humanen TBG seit längerem bekannt ist (Flink, Bailey *et al.* 1986), gelang eine Kristallisierung des Moleküls zur Aufklärung seiner Tertiärstruktur trotz intensiver Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen bislang noch nicht.

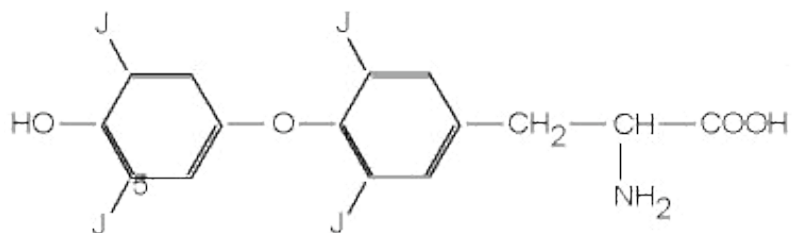


Abbildung 1: Formel von  $T_4$  (Thyroxin)

### 2.2.1 Physiologische Bedeutung des TBG

Nach derzeitigem Kenntnisstand kann man dem TBG drei Hauptaufgaben zusprechen: Die Speicherung, die homogene Verteilung und den Transport von Schilddrüsenhormonen.

Außerhalb der Schilddrüse stellt TBG den wichtigsten Speicher von Schilddrüsenhormonen dar (Robbins, Cheng *et al.* 1978). Die Qualität des extrathyreoidalen Speichers zeigt sich vor allem an der Serumhalbwertszeit von T<sub>4</sub>-beladenem TBG, die unter normalen Bedingungen bei etwa 5 Tagen liegt, wohingegen das freie T<sub>4</sub> (fT<sub>4</sub>) mit einer Halbwertszeit von wenigen Stunden viel rascher aufgebraucht wird (Hocman 1981).

Weitere Schlüsse auf diese Funktion lässt die Quantität der Hormonspeicherung zu: das Verhältnis von Gesamt-T<sub>4</sub> (Total T<sub>4</sub>, TT<sub>4</sub>) zu fT<sub>4</sub> liegt im normalen Serum beim Menschen bei etwa 100 nmol/l : 30 pmol/l. Entfernt man nun das TBG aus dem Serum, so fällt dieser Quotient auf ein Drittel seines Ausgangswertes ab. Das Fehlen von Transthyretin (TTR) oder Albumin zeigt im Gegensatz dazu nur einen kleinen Effekt (Robbins 1996). Den selben Mechanismus findet man auch beim TT<sub>3</sub> und fT<sub>3</sub>. Hier ist jedoch der Quotient mit 2 nmol/l : 8 pmol/l deutlich kleiner, so dass die Annahme nahe liegt, diese Funktion diene wohl eher der schnellen Hormonlieferung als der langdauernden Speicherung (Robbins 1996).

Nur unter *in vitro* Bedingungen wurde zudem noch gezeigt, daß T<sub>4</sub> in einer wäßrigen Lösung ohne mögliche Bindungsproteine deutlich rascher zerfällt (Tata 1960) und TBG durch die T<sub>4</sub>-Bindung stabilisiert wird (Grimaldi, Edelhoch *et al.* 1982).

Erwähnenswert ist zudem die Pufferfunktion des Proteins: TBG besitzt mit einer Dissoziationskonstanten von 10<sup>-10</sup> mol/l zwar nicht den gleichen Wert wie die Konzentration des fT<sub>4</sub> im Serum (3 x 10<sup>-11</sup> mol/l), kommt ihm aber von allen Bindungsproteinen am nächsten (Robbins 1996). Insgesamt sind also die Speicherung und die schnelle Rekrutierbarkeit der Schilddrüsenhormone die Hauptaufgaben des TBG.

Eine zweite Funktion besteht in der gleichmäßigen Verteilung von Schilddrüsenhormon unter den Zellen eines bestimmten Gewebes. Studien an Rattenleberpräparaten zeigen, daß in der Abwesenheit Thyroxinbindender Proteine T<sub>4</sub> in den ersten Leberzellen, mit denen es Kontakt

bekommt, akkumuliert und dann die anderen Zellen nicht mehr erreicht. Eine sinnvolle Umverteilung findet nicht statt (Mendel, Weisinger *et al.* 1987). Durch Zusatz von TBG, TTR oder Albumin wird die T<sub>4</sub>-Distribution im Lebegewebe homogen.

Als drittes ist der zielgerichtete Transport von Schilddrüsenhormonen zu nennen. Unter physiologischen Bedingungen ist zwar die hepatische Aufnahmerate von T<sub>4</sub> bei Perfusion mit an Trägerprotein gebundenem T<sub>4</sub> derjenigen sehr ähnlich, die bei spontaner Dissoziation vom Carrier entsteht (Mendel, Weisinger *et al.* 1987), aber für ein weiteres Mitglied der Serpin-Familie, das Corticosteroid-bindende Globulin (CBG), wurden Hinweise auf eine gezielte Abgabe von Cortisol in entzündetes Gewebe gefunden. Nach Verdauung von CBG mit humaner Leukozytenelastase, läßt sich eine Konformationsänderung des Trägerproteins feststellen, die zu einer auf ein Zehntel des Ausgangswertes reduzierten Bindungsaffinität für Cortisol führt (Pemberton, Stein *et al.* 1988). Die Affinität von TBG zu T<sub>4</sub> sinkt in Gegenwart von Leukozytenelastase ebenfalls (Golcher und Janssen 1999). Das bedeutet, dass TBG also scheinbar gezielt T<sub>4</sub> und T<sub>3</sub> zur Steigerung des Grundumsatzes in entzündlich verändertes Gewebe abgeben kann.

### 2.2.2 Die Konzentration von TBG im menschlichen Serum

Die TBG-Konzentration im menschlichen Serum liegt beim gesunden Menschen zwischen 1,1 und 2,2 mg/dl. Die bekannteste Ausnahme beim Gesunden stellt natürlich die Schwangerschaft dar, während dieser sich die Konzentration von TBG im mütterlichen Serum verdreifacht (Ain, Refetoff *et al.* 1988). Dieser Konzentrationsanstieg ist für die Versorgung des Fetus mit mütterlichem Schilddrüsenhormon ein wichtiger Faktor (Ekins, Sinha *et al.* 1994). Die Plazentagängigkeit von T<sub>4</sub> gilt gemeinhin als gesichert (Ekins, Sinha *et al.* 1994). Es ist allgemein bekannt, dass eine Schilddrüsenhormon-Unterversorgung des Embryo in wichtigen Phasen der Gehirnentwicklung, zu schwersten Stoffwechselstörungen führen kann,

deren klinisches Korrelat als Kretinismus bekannt ist (Ekins, Sinha *et al.* 1994). Auch für den störungsfreien Verlauf einer Schwangerschaft ist TBG wohl bedeutsam: in einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, daß bei Frauen, die eine Fehlgeburt erlitten, der Anstieg des TBG vor allem zu Beginn der Gravidität signifikant vermindert war (Skjoldbrand, Brundin *et al.* 1986).

Der physiologische Mechanismus des TBG-Konzentrationsanstiegs in der Schwangerschaft läßt sich interessanterweise auch bei einigen Tieren nachweisen. Zumindest bei verschiedenen Säugetieren ist die Entwicklung von Verhaltensstörungen, vermutlich als Pendant zum Kretinismus gesichert (Ekins, Sinha *et al.* 1994). Ein deutliches Absinken des TBG-Spiegels ist bei einer Synthesestörung durch chronische Leberschädigung, starkem Proteinverlust und bei einer Therapie mit Androgenen oder Glucocorticoiden zu beobachten (Refetoff und Larsen 1989).

### 2.2.3 Der Transport von Schilddrüsenhormonen im menschlichen Serum

TBG stellt neben TTR und Albumin das wichtigste Transportprotein für Schilddrüsenhormone im menschlichen Blut dar (Gershengorn, Cheng *et al.* 1977; Seo, Sueda *et al.* 1983; Bartalena 1990). Außerordentlich hoch ist seine Bindungsaffinität zu den Schilddrüsenhormonen mit einer Affinitätskonstante von etwa  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  zu  $T_4$  und  $4,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  zu  $T_3$  (Nilsson und Peterson 1975). Obwohl die Plasmakonzentration durchschnittlich nur 1,5 mg/dl beträgt, bindet es bis zu 75% der zirkulierenden  $T_4$ - und etwa 70% der  $T_3$ -Gesamthormonmenge (Oppenheimer 1968; Robbins 1996). Es besitzt eine Ligandenbindungsstelle, an die  $T_4$  nonkovalent und reversibel mit einer Halbwertszeit von 39 sec gebunden wird (Robbins 1996). Auch  $T_3$  wird auf diese Weise gebunden, die Halbwertszeit seiner Bindung ist mit etwa 4 sec aber deutlich kürzer und Hauptursache der geringeren Affinität (Robbins 1996).

Weitere Transportproteine sind das Transthyretin (TTR) und das Albumin. TTR bindet dabei 15% des  $T_4$  und fast gar kein  $T_3$ , Albumin entsprechend 20% der  $T_4$ -Menge und wohl das restliche  $T_3$  (Robbins 1996). Der Anteil an  $fT_4$  und  $fT_3$  im menschlichem Normalserum liegt bei 0,3% bzw. 0,03%, nur dieser Teil ist metabolisch wirksam (Mendel 1988). Eine Übersicht über die Charakteristika von TBG, TTR und Albumin gibt Tab. 1.

	TBG	TTR	Albumin
<b>Affinitätskonstante</b>			
$K_a T_4 (M^{-1})$	$1 \times 10^{10}$	LBST 1: $7 \times 10^7$ LBST 2: $6,7 \times 10^5$	LBST 1: $7 \times 10^5$ LBST 2-6: $4,8 \times 10^4$
$K_a T_3 (M^{-1})$	$4,5 \times 10^8$	LBST 1: $1,4 \times 10^7$ LBST 2: $5,5 \times 10^5$	LBST 1: $1 \times 10^5$ LBST 2-6: $6,9 \times 10^3$
<b>Dissoziationskonstante</b>			
$K_d T_4 (sec^{-1})$	0,018	0,094	unbekannt
$K_d T_3 (sec^{-1})$	0,16	0,69	unbekannt
<b>Konzentration (Mittelwerte)</b>			
mg/dl	1,5	25	4200
$\mu mol/l$	0,27	4,6	640
<b>Hormonverteilung (%)</b>			
$T_4$	70	10	20
$T_3$	80	10	10
<b>Bindungskapazität für <math>T_4</math></b>			
mg/dl	20	230	$>10^6$
<b>Eliminationshalbwertszeit (Plasma)</b>			
Tage	5	1-2	13

**Tabelle 1: Vergleich von TBG, TTR und Albumin**

*LBST=Ligandenbindungsstelle (modifiziert nach Robbins 1996)*

#### 2.2.4 Hormontransport bei anderen Spezies

Bei den untersuchten Spezies, die einen Schilddrüsenhormonregelkreis besitzen, wurden bei der überwiegenden Mehrzahl auch Schilddrüsenhormon-transportierende Proteine nachgewiesen. Die Aufgabe dieser spezifischen Proteine ist nicht vollständig geklärt. Die schlechte Löslichkeit

von  $T_4$  in Wasser kann jedoch hierfür nicht alleine verantwortlich sein. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 liegt das Löslichkeitsmaximum von  $T_4$  in Wasser bei  $2 \mu\text{M}$ . Die Serumkonzentration von  $fT_4$  liegt bei den meisten untersuchten Spezies jedoch im Bereich von etwa  $24 \text{ pM}$  (Richardson, Bradley *et al.* 1994). Aus diesem Grund kommen diesen Trägerproteinen wohl ähnliche Aufgaben zu, wie für den Menschen in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

Bei den höheren Säugetieren Mensch, den meisten Affenarten, Pferd, Ziege, Schaf, Kaninchen, Rind, Schwein, Ratte und Maus bindet Thyroxin an Albumin und TTR und mit Ausnahme der erwachsenen Ratte auch an ein spezifisches Thyroxin-bindendes Protein (TBP) (Davis, Laird *et al.* 1974; Larsson, Pettersson *et al.* 1985; Seo, Ando *et al.* 1989; Richardson, Bradley *et al.* 1994). Die bislang vollständig charakterisierten TBPs von Schaf (Tsykin und Schreiber 1993), Ratte (Imamura, Mori *et al.* 1991) und Schwein (Lahner, Janssen *et al.* 1998) sowie das nur proteinbiochemisch charakterisierte Mäuse-TBP (Vranckx, Savu *et al.* 1990) und Fledermaus-TBP (Kwieceński, Damassa *et al.* 1991) zeigen eine Homologie zum humanen TBG-Molekül.

Interessant ist die TBG-Synthese bei Ratten, die diese nach Bedarf regulieren können (Emerson, Seiler *et al.* 1993). Im Genom findet sich ein TBG-Gen, dessen Translationsprodukt eine etwa 76%-ige Homologie zum humanen TBG zeigt (Imamura, Mori *et al.* 1991). Dieses TBG wird unmittelbar postpartal mit einem Gipfel am 15. Tag nach der Geburt synthetisiert. Im Erwachsenenalter ist das Gen supprimiert, im Senium jedoch (ab etwa dem 300. Tag) wieder exprimiert. Dieser Mechanismus korreliert mit der funktionellen  $T_4$ -Konzentration im Serum: unmittelbar nach der Geburt ist die  $T_4$ -Produktion noch niedrig. Im Alter dagegen scheint die Wirkung der Schilddrüsenhormone nachzulassen (Savu, Vranckx *et al.* 1991).

Mindestens eine Fledermausart scheint ihre TBG-Synthese wechselnden Verhältnissen wie Winterschlaf oder Schwangerschaft anpassen zu können und so ihren  $fT_4$ -Serumspiegel mitregulieren zu können (Kwieceński, Damassa *et al.* 1991). Bei Vögeln finden sich zwei Schilddrüsenhormon-Transportproteine: Albumin und TTR (Schreiber und Richardson 1997). Hühner scheinen noch ein drittes  $T_4$ -bindendes Protein zu besitzen, das annähernd gleiches Molekulargewicht, ähnliches Verhalten in der Serumelektrophorese und ähnliche  $T_4$ -Bindungsaffinität wie humanes TBG zeigt und ebenfalls ein Glykoprotein ist (Bhat und Cama 1978).

Bei den Reptilien ist Albumin der wesentliche  $T_4$ -Transporter und auch die untersuchten Amphibien und Fische besitzen lediglich Albumin als  $T_4$ -Transportprotein. (Schreiber und Richardson 1997).

Zusammenfassend erscheint Albumin als das unter allen Spezies am weitesten verbreitete und daher phylogenetisch älteste  $T_4$ -bindende Protein. TTR findet sich bei den meisten Säugetieren und den untersuchten Vogelarten. Die Bedeutung der Phylogenese verschiedener  $T_4$ -bindender Proteine dürfte zum einen in der Sicherung einer homogenen  $T_4$ -Verteilung in Organgeweben liegen, die sich in ihrem Aufbau entwicklungs geschichtlich zunehmend differenziert haben. Zum anderen bietet die Redundanz mehrerer Schilddrüsenhormontransportsysteme einen Selektionsvorteil, da bei Ausfall eines Systems die regelrechte  $T_4$ -Verteilung und -Speicherung noch immer gewährleistet ist (Mendel, Cavalieri *et al.* 1989).

### 2.2.5 TBG in verschiedenen Körperflüssigkeiten

In allen Körperflüssigkeiten lässt sich TBG in geringen Mengen nachweisen. So ist es im Liquor und in Gelenk- und Amnionflüssigkeit nachweisbar. Neben der funktionellen, nativen Form (nTBG) gibt es eine denaturierte Form (dn TBG), die kein  $T_4$  zu binden vermag und beim Gesunden in sehr geringer Konzentration im Serum vorkommt



(nTBG:dnTBG = 250:1) (Refetoff 1989). Die Formen lassen sich durch spezifische Antikörper voneinander unterscheiden (Refetoff 1989).

### 2.2.6 Struktur des humanen TBG

Ein Polypeptid aus 415 Aminosäuren, von denen die ersten 20 das Signalpeptid darstellen und nach Beendigung der Translation abgespalten werden, stellt das primäre Translationsprodukt des TBG dar (Flink, Bailey *et al.* 1986). Das fertige Molekül besteht nach Passage durch die Zellorganellen aus 395 Residuen, die ein Molekulargewicht von 44 kDa besitzen. An die ersten vier der fünf potentiellen Glykosilierungsstellen sind N-glykosidisch Kohlenhydratgruppen gebunden, die damit zu einem Gesamtgewicht von 54 kDa führen (Gershengorn, Cheng *et al.* 1977; Zinn, Marshall *et al.* 1978). Der Kohlenhydratanteil des TBG scheint für die korrekte Faltung und Sekretion des Moleküls (Murata, Magner *et al.* 1986), sein Verhalten bei der Isoelektrischen Fokussierung (Gärtner, Henze *et al.* 1981) und die Serum-Clearance durch die Leber (Ain, Yuichi *et al.* 1987) verantwortlich zu sein.

### 2.2.7 Stabilität

Ein wichtiges Kriterium bei der Klassifikation einzelner TBG-Varianten ist die Stabilität des Proteins. Diese wird entweder durch Denaturierung durch Säuren oder Laugen oder mittels Hitzedenaturierung bestimmt. Das humane TBG bleibt im Serum im Vergleich zu anderen Plasmaproteinen relativ stabil, wird jedoch bei Temperaturen über etwa 55°C und bei einem pH < 4,0 irreversibel inaktiviert (Marshall und Pensky 1971; Grimaldi, Edelhoch *et al.* 1982; Refetoff, Yoshiharu *et al.* 1984). Die Halbwertszeit der Denaturierung des normalen TBG beträgt bei 55°C etwa 55 min und bei 60°C etwa 7 min (Takemura *et al.* 1971; Refetoff, Fang *et al.* 1975). Bei der Denaturierung verliert das TBG-Molekül seine Fähigkeit Schilddrüsenhormone zu binden. Wenn die T<sub>4</sub>-Bindungsstelle besetzt ist, ist

die Stabilität des Moleküls signifikant erhöht, wobei offensichtlich eine leichte Konformationsänderung stattfindet (Grimaldi, Edelhoch *et al.* 1982).

## **2.3 TBG und die Superfamilie der Serpine**

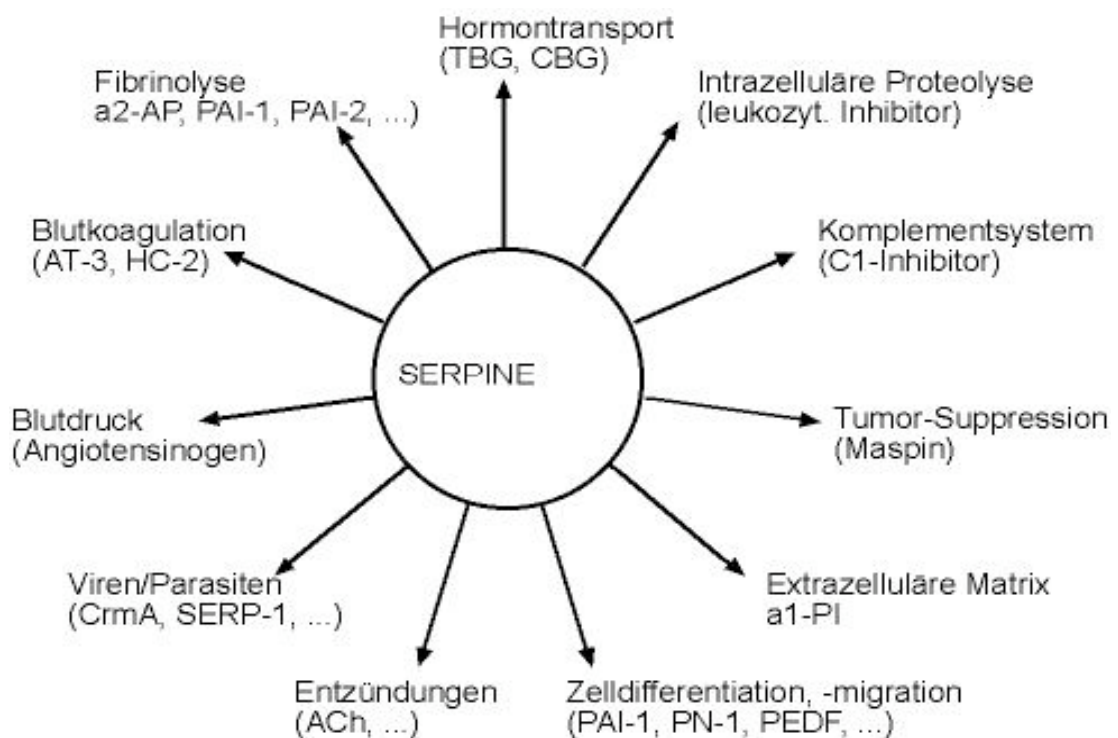
### 2.3.1 Überblick über die Serpine

Auf Aminosäureebene findet man einen hohen Grad an Homologie des TBGs zu  $\alpha_1$ -PI (etwa 40%, früher wurde das Protein als  $\alpha_1$ -Antitrypsin bezeichnet) und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT, 40%) (Flink, Bailey *et al.* 1986). Auch zum CBG besteht eine gewisse Strukturverwandschaft von nahezu 40% (Hammond, Smith *et al.* 1987). Diese und etwa 140 weitere Proteine gehören zur Familie der Serpine (Huber und Carrell 1989).

Die Funktionen der einzelnen Proteine dieser Familie sind jedoch sehr unterschiedlich. Archetyp der Serpine ist der  $\alpha_1$ -PI. Die divergente Entwicklung über einen Zeitraum von 600 Mio. Jahren ist noch nicht sicher geklärt. Der größte Teil der Serpine, wie  $\alpha_1$ -PI, sind irreversible, nicht-kompetitive Inhibitoren, da sie durch sterische Hinderung den Zugang der Substrate zum katalytischen Zentrum der Proteinasen versperren. Ein anderer Teil, wie zum Beispiel Angiotensinogen (AGT) und Ovalbumin oder Hormontransportproteine wie TBG und CBG sind Homologe ohne Inhibitor-Funktion, d.h. sie sind zwar Substrate von Serin-Proteasen, inhibieren diese aber nicht, da sie sich nach der Verdauung durch die Proteasen wieder von ihnen abspalten.

Die allen Serpinen gemeinsame Tertiärstruktur besteht aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen (sA - sC), die von 8 bzw. 9  $\beta$ -Helices (hA - hH/hI) umgeben sind (Loebermann, Tokuoka *et al.* 1984; Baumann, Huber *et al.* 1991). Die Interaktion zwischen Serinproteasen und ihren Inhibitoren folgt einem Standardmechanismus.

Eine Gemeinsamkeit findet man bei allen der Serpine: Jeder Vertreter dieser Superfamilie besitzt eine mobile exponierte Bindungsschleife ähnlicher Konformation. Die Elastase schneidet die Schleife am Met<sup>358</sup> des  $\alpha_1$ -PI. Es öffnen sich die beiden Enden der Schleife und bilden eine Tasche, die komplementär zum reaktiven Zentrum der Elastase oder Protease ist und diese nonkovalent bindet. Dadurch wird diese inhibiert und es wird eine Konformationsänderung des Serpins bewirkt. Es geht von einem gespannten in einen relaxierten Zustand über, wodurch die Stabilität erhöht wird (S-R-Transition). Auch für TBG und CBG, die ebenfalls von leukozytärer Elastase geschnitten werden, scheinen diese Konformationsänderungen funktionell bedeutsam (Pemberton, Stein *et al.* 1988).



**Abbildung 2: Funktionen der Serpine**

*Überblick (modifiziert nach Lahner 2000)*

### 2.3.2 Kristallstruktur der Serpine

In den vergangenen Jahren sind die Kristallstrukturen einer Reihe von Serpinen aufgeklärt worden:  $\square_1$ -PI (Löbermann, Tokuoka *et al.* 1984; Engh, Löbermann *et al.* 1989; Elliott, Lomas *et al.* 1996), ACT (Baumann, Huber *et al.* 1991), Ovalbumin (Stein, Leslie *et al.* 1990) und Plakalbumin (Wright, Quian *et al.* 1990). Da sich das Strukturmodell des  $\square_1$ -PI bekanntermaßen auch auf andere Serpine übertragen läßt, war seine Aufklärung von besonderem Interesse. Zunächst konnte jedoch nur die im aktiven Zentrum proteolytisch gespaltene (inaktive) Form des  $\square_1$ -PI kristallisiert werden, bei der das N-terminale Met<sup>358</sup> vom C-terminalen Ser<sup>359</sup> getrennt an den entgegengesetzten Enden des Moleküls zu liegen kommt. Im aktiven inhibitorischen Protein sind diese Aminosäuren jedoch kovalent aneinander gebunden. Die Spaltung der Peptidbrücke bewirkt daher eine Strukturveränderung. Der Vergleich von Ovalbumin mit seiner proteolytisch gespaltenen Form Plakalbumin läßt ein Strukturmodell des nativen  $\square_1$ -PI zu. Nimmt man den Strang s4A aus der  $\square$ -Faltblattstruktur sA heraus, so wird die kovalente Bindung zwischen den AS 358 und 359 im aktiven inhibitorischen Molekül ermöglicht. Gleichzeitig kann der Strang s4A an der Oberfläche des Moleküls eine Schleife bilden. Sein Fehlen im  $\square$ -Faltblatt sA hat wahrscheinlich einen etwas instabileren Zustand des ungeschnittenen  $\square_1$ -PI zur Folge, da er den zentralen Strang in der Faltblattstruktur darstellt. Gleichzeitig wird auch die Helixstruktur F durch den fehlenden Strang beeinflußt (Loebermann, Tokuoka *et al.* 1984). Dieses Strukturmodell wurde experimentell bestätigt (Schulze, Baumann *et al.* 1990; Baumann, Huber *et al.* 1991; Schulze, Huber *et al.* 1994). Inzwischen konnte neben der gespaltenen inaktiven Form auch die Struktur des nativen  $\square_1$ -PI Moleküls bestimmt werden (Elliott, Lomas *et al.* 1996).

Bisher konnte die Kristallstruktur der Transportproteine TBG und CBG nicht aufgeklärt werden. Die Sequenzhomologie der Serpine (Huber und Carrell 1989; Baumann, Huber *et al.* 1991) ermöglicht jedoch die

Vorhersage der Tertiärstruktur des TBG und CBG anhand des Strukturmodells von  $\alpha_1$ -PI und ACT durch den Vergleich der Primärstrukturen (Blundell, Sibanda *et al.* 1987).

## **2.4 Bekannte Varianten von TBG**

### 2.4.1 Allgemeines

Zu Beginn der 60er Jahre wurde der erste erbliche TBG-Defekt beschrieben (Beierwaltes und Robbins 1959). Bis zum heutigen Tag wurden dann eine Reihe weiterer TBG-Varianten nachgewiesen (Nicoloff, Dowling *et al.* 1964; Marshall, Levy *et al.* 1966; Nikolai und Seal 1966; Refetoff und Selenkow 1968; Moloshok, Hsu *et al.* 1969; Nusynowitz, Clark *et al.* 1971; Refetoff, Robin *et al.* 1972; Burr, Ramsden *et al.* 1980; Janssen, Takeda *et al.* 1991; Janssen, Kambe *et al.* 1992; Janssen, Chen *et al.* 1993; Janssen, Büttner *et al.* 1994; Janssen, Chen *et al.* 1995). Die Varianten kann man abhängig von der TBG-Konzentration im Serum in drei Hauptgruppen einteilen: Exzeß, Mangel (partial deficiency, TBG-PD) und komplette Defizienz (complete deficiency, TBG-CD). Bei der kompletten Defizienz liegen die TBG-Werte im Serum unter der Nachweisgrenze, bei der partiellen Defizienz ist entweder die Konzentration oder die Bindungsaffinität für T<sub>4</sub> oder beides vermindert und beim TBG-Exzeß liegt die Serumkonzentration bei unveränderter Affinität bei dem zwei- bis fünffachen.

Zum derzeitigen Stand der Forschung sind 15 TBG-Defekte proteinbiochemisch und molekularbiologisch charakterisiert. Keine der bisher untersuchten natürlichen Varianten scheint eine bedeutsame klinische Relevanz zu haben.

Zur Typisierung von TBG-Varianten eignen sich folgende Untersuchungen:

1. Serumkonzentration
2. Anteil des denaturierten TBGs im Serum
3. Hitzestabilität
4. Bindungsaffinität für T<sub>4</sub>
5. Banden in der isoelektrischen Fokussierung

Die Serumkonzentration beim Menschen ist mittels eines RIA zu bestimmen. Die verwendeten AK sind für die untersuchten Tierarten aber nicht spezifisch. Aus diesem Grund führt man einen T<sub>4</sub>-Bindungstest durch. Durch die Zugabe von Barbiturat Puffer werden die Bindungsstellen des Albumin und Transthyretin abgesättigt. Der T<sub>4</sub>-Bindungstest misst damit nur das TBG.

Das **native TBG** (TBG-N) liegt in einer Konzentration von etwa 0,27 µmol/l im Serum vor. Der Anteil des denaturierten TBG ist mit weniger als 1% anzusetzen. Die Bindungsaffinität für T<sub>4</sub> beträgt  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  (Robbins 1996). Die Halbwertszeit der Denaturierung normalen TBGs beträgt bei 55°C ca. eine Stunde und bei 60°C noch 7 Minuten (Refetoff 1975). Die Isoelektrischen Punkte liegen zwischen den pH Werten 4,3 und 4,5 (Gärtner und Henze 1981).

Nachfolgend sollen die bekannten Variationen kurz beschrieben werden.

#### 2.4.2 TBG-Varianten mit normalem Serumspiegel

Es wurden bis zum heutigen Tag vier TBG-Varianten charakterisiert, die normale TBG-Serumspiegel aufweisen. Ihre spezifischen Eigenschaften betreffen also entweder das Verhalten in der IEF, die Hitzestabilität oder die Bindungsaffinität. Diese Varianten sind schwer zu charakterisieren, da sie klinisch nicht auffällig sind und die Variationsträger keine sonst messbaren Unterschiede aufzeigen.

Das schon länger bekannte **TBG-Chicago** (TBG-Ch) zeichnet sich durch eine isolierte erhöhte Hitze- und Säurestabilität aus (Takamatsu und Refetoff 1986). Die Halbwertszeit bei 55°C ist von 55 auf 190 Minuten verlängert. Es bestehen keine weiteren Unterschiede zum TBG-N. Molekulare Basis dieses Defekts ist die Substitution des Tyrosin<sup>309</sup> durch Phenylalanin (Janssen, Chen *et al.* 1995). Diese beiden AS unterscheiden sich nur durch eine Hydroxylgruppe, die Tyrosin hydrophiler macht als Phenylalanin. Es wird gemäß dem  $\alpha_1$ -PI Modell vermutet, daß durch diesen AS-Austausch eine Lücke entsteht, wodurch sich  $\alpha$ -Helices enger zusammenlagern können und so das Molekül stabilisiert wird.

In den späten achtziger Jahren wurde bei den Inuit (Eskimos) eine TBG-Variante mit beschleunigter Wanderungsgeschwindigkeit in der IEF beschrieben, das **TBG-Fast** (TBG-F). Diese Variante wird wohl X-chromosomal vererbt (Refetoff 1989).

Genauer wurde das **TBG-San Diego** (TBG-SD) untersucht. Dieses zeigt eine gegenüber dem TBG-N um etwa die Hälfte reduzierte Bindungsaffinität sowie eine verminderte Hitzestabilität mit einer Halbwertszeit von 28 min bei 56°C. Molekulare Basis ist der Austausch von Serin<sup>23</sup> durch Threonin. (Bertenshaw, Sarne *et al.* 1992). Der ebenfalls vorhandene Polymorphismus Leucin<sup>283</sup>-> Phenylalanin ist bei verschiedenen TBGs bekannt und hat keinen Einfluß auf die Hitzestabilität oder Bindungsaffinität (Astner, Treske *et al.* 1997).

Zuletzt zu erwähnen ist das **TBG-Houston** (TBG-H), welches einen isolierten Bindungsdefekt aufweist. Die anderen funktionellen Parameter, insbesondere die Hitzestabilität, sind im Vergleich zum TBG-N nicht verändert. Dies ist vor allem deshalb interessant, da die gefundene Mutation bei dieser Variante exakt der des TBG-SD entspricht (Ser23Thr, Polymorphismus Leu283Phe) (Astner, Treske *et al.* 1997).

### 2.4.3 TBG-Exzeß

Bei Hyperöstrogenämie sowie bei schweren Lebererkrankungen (verminderte hepatische Clearance) findet man erhöhte TBG-Werte im Serum. Vererbte TBG-Exzesse unterscheiden sich davon durch einen bedeutend ausgeprägteren Konzentrationsanstieg des TBG im Serum (Burr, Ramsden *et al.* 1980). Ihre Prävalenz wird auf etwa 1:25.000 geschätzt (Refetoff 1989). Der angenommene X-chromosomale Erbgang steht in Übereinkunft mit der Lokalisation des TBG-Gens auf dem X-Chromosom. Da das Molekül die gleiche Bindungsaffinität wie Wildtyp-TBG aufweist, werden als Ätiologie des Bildes von TBG-Exzeß Mutationen in der Promotor-Region des Gens postuliert (Refetoff 1989).

### 2.4.4 Partielle Defizienz von TBG (TBG-PD)

Der TBG-Mangel ist durch eine Verminderung der Serumkonzentration charakterisiert. Folgende Varianten sind bekannt: TBG-Slow (TBG-S), TBG-Gary (TBG-G), TBG-Quebec (TBG-Q), TBG-Montreal (TBG-M), TBG-Aborigine (TBG-A) und TBG-Partial Deficiency Japan (TBG-PDJ).

Alle diese Varianten haben zusätzlich eine reduzierte T<sub>4</sub>-Bindungsaffinität (Murata, Refetoff *et al.* 1985; Sarne, Refetoff *et al.* 1989). Die Varianten TBG-M, TBG-Q und TBG-G zeigen eine erhöhte Fraktion der denaturierten Form des TBG (dn TBG) (Murata, Takamatsu *et al.* 1986; Takamatsu, Refetoff *et al.* 1987).

Die einzelnen Varianten seien hier nur kurz beschrieben:

Das **TBG-S** kommt mit einer relativ hohen Prävalenz von 5 bis 10% in der schwarzen Bevölkerung vor. Es ist durch Verschiebung der Banden zum negativen Pol bei der IEF charakterisiert (Takamatsu, Ando *et al.* 1986). Ursache hierfür ist die Substitution der normalen Asparaginsäure<sup>171</sup> durch reines Asparagin aufgrund einer Punktmutation. Der Verlust der negativen



Ladung bewirkt die verlangsamte elektrophoretische Beweglichkeit (Waltz, Pullman *et al.* 1990).

Für das **TBG-G** ist eine ausgeprägte Abnahme des nativen TBG (nTBG) auf ungefähr 1,5% der normalen Serumkonzentration charakteristisch. Seine denaturierte Form (dnTBG) ist parallel dazu im Serum erhöht. Durch die Substitution von Isoleucin<sup>96</sup> mit Asparagin entsteht eine neue Glykosylierungsstelle, die unter *in vitro*-Bedingungen tatsächlich benutzt wird (Mori, Seino *et al.* 1989). Die zusätzliche Zuckerkette führt zum vermehrten intrazellulären Abbau und zu verminderter Sekretion des mutierten TBG (Kambe, Seo *et al.* 1992).

**TBG-M** und das **TBG-Q** weisen ebenfalls erhöhte Spiegel an dnTBG auf. Die meßbare Bindungsaffinität ist auf nur 70% des Normalwertes reduziert, die Hitzestabilität ist deutlich vermindert. Bei der Quebec-Variante ist das Histidin<sup>331</sup> mit einem Tyrosin substituiert, d.h. eine basische AS mit einer Aromatischen, wodurch es zu Veränderungen der Tertiärstruktur kommt. Bei der TBG-M Form ist Alanin an Position 113 gegen Prolin ausgetauscht (Janssen und Refetoff 1992). Diese Mutation kann die Tertiärstruktur verändern und so die Stabilität schwächen, da Prolin als heterozyklische AS einen Knick in der betroffenen  $\alpha$ -Helix bewirkt (Liebhaber und Kan 1983; Usala, Tennyson *et al.* 1990).

Das **TBG-A** ist bei den australischen Ureinwohnern mit einer Allelfrequenz von 0,58 weit verbreitet. Es stellt ebenfalls ein hitzelabiles Molekül mit verminderter Bindungsaffinität dar. Die Halbwertszeit ist von den normalen 55 min bei 55°C auf 20 min reduziert, die Bindungsaffinität beträgt in etwa die Hälfte der Normalen (Refetoff und Murata 1985). Die Substitution des Alanin<sup>191</sup> durch Threonin im Bereich der Ligandenbindungsstelle ist die Ursache für dieses veränderte Verhalten. Beim Bindungsvorgang reagiert das 5'-Jodatome des T<sub>4</sub> mit dem hydrophoben Alanin und der Austausch mit einer polaren AS führt so zu einer Affinitätsänderung (Murata, Refetoff *et al.* 1985; Jarvis, Munro *et al.* 1992).

Beim seltenen **TBG-PDJ** mit verminderter Hitzestabilität und reduzierter Serumkonzentration ist das Prolin<sup>363</sup> gegen Leucin ausgetauscht (Miura, Mori *et al.* 1993). Damit fehlt die Bruchstelle bei dem normalerweise stattfindenden Einbau der heterozyklischen AS Prolin in eine  $\alpha$ -Helix (Miura, Mori *et al.* 1994). Die Tertiärstruktur ist entsprechend verändert.

#### 2.4.5 Komplette Defizienz von TBG (TBG-CD)

Die übliche Nachweisgrenze von TBG unter Verwendung spezieller Immunoassays liegt bei 0,5  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , was etwa 0,03% der normalen Serumkonzentration entspricht (Refetoff, Yoshiharu *et al.* 1984). Der vollständige TBG-Verlust ist hierbei durch nicht messbare TBG-Werte im Serum hemizygot betroffener Männer charakterisiert. Bei einer molekularbiologischen Analyse dieser TBG-Varianten findet man Deletionen oder Insertionen im TBG-Gen, die zu frame-shift Mutationen führen. Darüberhinaus zeigen sich auch einzelne Punktmutationen. Eine nachgewiesene Frame-shift Mutation betrifft das TBG-CD6 sowie das TBG-CD Japan1 und 2 (Yamamori, Mori *et al.* 1991). Punktmutationen sind für die fehlenden Serumspiegel von TBG-CD5 (Mori, Refetoff *et al.* 1988) und TBG-CD Buffalo (Carvalho, Weiss *et al.* 1998) verantwortlich.

### **2.5 TBG bei verschiedenen Tierarten**

#### 2.5.1 Charakterisierung animalischer TBG-Varianten

Da es die Aufgabe dieser Arbeit ist, ein breites Spektrum an tierischen Bindungsproteinen für Schilddrüsenhormone zu charakterisieren, soll hier nur kurz auf die bislang untersuchten Tierarten eingegangen werden. Bei allen untersuchten Wirbeltieren lassen sich Bindungsproteine im Serum nachweisen. Ein dem TBG vergleichbares Transportprotein wird bei vielen Herbivoren, jedoch nur wenigen Carnivoren gefunden (Refetoff, Robin *et*

*al.* 1970; Larsson, Pettersson *et al.* 1985; Seo, Ando *et al.* 1989; Richardson, Bradley *et al.* 1994;) Molekulargenetische und proteinbiochemische Charakterisierungen liegen von den TBGs der Spezies Schwein, Ratte und Schaf vor. Ihr gemeinsames funktionelles Merkmal ist die im Vergleich zum humanen TBG teilweise deutlich reduzierte Hitzestabilität.

### 2.5.2 TBG beim Schwein

Die codierende Region der TBG-DNA des Schweins besteht aus 1263 Nukleotiden, die für 420 AS codieren. Ausgehend von einem Sequenzhomologievergleich mit anderen Serpinen ist ein Signalpeptid mit einer Länge von 23 AS zu erwarten (Lahner, Janssen *et al.* 1998). Zum sezernierten humanen TBG besteht eine Homologie von 85% auf Nukleotidebene und 83% auf AS-Ebene.

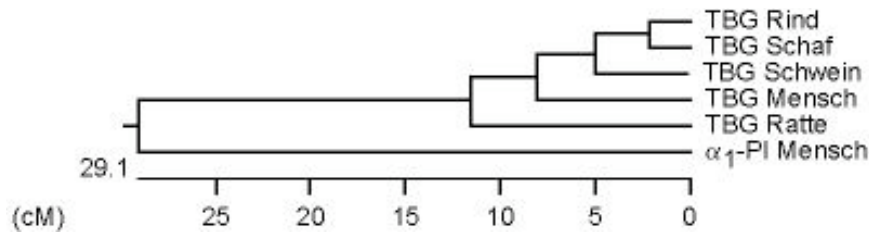
### 2.5.3 TBG bei der Ratte

Das sezernierte Ratten-TBG besteht aus 398 Aminosäuren. Der Sequenzvergleich mit humanem TBG zeigt einen Homologiegrad von 81% auf Nukleotidebene und 76% auf AS-Ebene in Bezug auf die codierende Region. Am NH<sub>2</sub>-Terminus sind im Vergleich zum menschlichen TBG drei AS eingefügt (Imamura, Mori *et al.* 1991).

### 2.5.4 TBG beim Schaf

Die TBG-cDNA des Schafes weist eine Länge von 1379 bp auf und wird durch 16 Poly-A-Reste verlängert. Die codierende Region besteht aus 1236 bp, wobei das Startcodon 64 bp vom 5'-Ende entfernt liegt. Das Stopcodon befindet sich in Position 1300-1302. Das fertige Translationsprodukt besteht aus 412 Aminosäureresten, von denen die ersten 16 als Signalpeptid abgespalten werden. Das Schafs-TBG wird nur in der Leber exprimiert

(Tsykin und Schreiber 1993). Die Homologie zum humanen reifen TBG auf Ebene der Nukleotide beträgt 85%, auf AS-Ebene noch 82%.



**Abbildung 3: Stammbaum des TBG**

(nach Lahner 2000)

## **2.6 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Wie bereits in der Einleitung formuliert, soll es Ziel dieser Arbeit sein, möglichst viele verschiedene TBG unterschiedlichster Säugetierarten auf seine Bindungskapazität, Bindungsaffinität und Hitzestabilität hin zu untersuchen und deren Eigenschaften mit denen des menschlichen TBG zu vergleichen. Auf diese Weise können neue Erkenntnisse über die entwicklungsgeschichtliche Verteilung des TBG innerhalb der Säugetiere und der verschiedenen Ordnungen erlangt werden. Zudem soll diese Arbeit diejenigen Tierarten und Ordnungen innerhalb der Klasse der Säugetiere herausfiltern, die für weitergehende molekularbiologische Untersuchungen geeignet erscheinen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Überblick über die untersuchten Tierarten

Um die Ergebnisse der Arbeit besser interpretieren zu können, muß man sich mit der Systematik der untersuchten Tierarten und ihren Verwandtschaftsbeziehungen vertraut machen. Leider sind die historischen (lateinischen), angelsächsisch-amerikanischen und deutschen Systematiken nicht immer übereinstimmend. In dieser Arbeit wird die deutsche Taxonomie nach D. Starck (Stark, Kaesner *et al.* 1995) verwendet.

Zur Einordnung der bekannten Tierarten wird in den neueren Werken der deutschen systematischen und speziellen Zoologie hierbei weiterhin ein hierarchisches System verwendet, welches absteigend folgende Bezeichnungen unterscheidet (in *kursiver Schrift* die Bezeichnung zu der die Säugetiere gezählt werden):

- a. **Abteilung: *Bilateria***
- aa. **Unterabteilung: *Neumundtiere (Deuterostomia)***
- b. **Stamm: *Chorda- oder Rückenseitentiere (Chordata)***
- bb. **Unterstamm: *Wirbeltiere (Vertebrata)***
- bbb. **Überklasse: *Kiefertiere (Gnathostomata)***
- c. **Grad: *Vierbeiner (Tetrapoda)***

Ab der folgenden Bezeichnung wird die Hierarchie erst für diese Arbeit relevant:

- d. **Klasse: *Säugetiere (Mammalia)* = Classis**
- dd. **Überordnung oder Unterklasse = Superordo / Subclassis**
- e. **Ordnung = Ordo**
- ee. **Teilordnung = Infraordo**

- eee. Unterordnung oder Überfamilie = Subordo / Superfamilia**
- f. Familie = Familia**
- ff. Unterfamilie = Subfamilia**
- g. Gattung = Genus**
- h. Art = Species**
- hh. Unterart = Subspecies**

Ein etwas ausführlicheres Beispiel soll dies verdeutlichen: Die Art „Eisbär“ (Ursus maritimus oder Thalarctos), Teil der Gattung der Braunbären (Ursus arctos) gehört der Unterfamilie der Bären oder Großbären (Ursinae) und der Familie der Bärenartigen (Ursidae) an. Die als nächstes übergeordnete Überfamilie der Bärentiere (Arctoidea) wird der Unterordnung der Landraubtiere (Fissipedia) zugerechnet. Diese wiederum ist Teil der Ordnung der Raubtiere (Carnivora), die zur Klasse der Säugetiere (Mammalia) gehört..

Unter der Kategorie Animalia werden alle Tiere zusammengefasst und dann in ihre Abteilungen, Stämme und dann weiter in ihre Klassen aufgeteilt. Oftmals sind Gattung und Familie und sogar Art ein- und dieselbe, vor allem, wenn eine einzelne Tierart isoliert vorkommt.

In dieser Arbeit sollen uns die Bezeichnungen oberhalb der Klasse nicht weiter beschäftigen. Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere gehören nämlich sämtlich der Klasse der Säugetiere an, die aus verschiedenen Ordnungen besteht. Zu den Säugetieren hier noch einige einführende Worte:

Die Säugetiere sind warmblütige, wenigstens embryonal behaarte Wirbeltiere. Sie haben meist vier Gliedmaßen, wobei es entweder vier Beine mit Füßen oder zwei Beine und zwei Arme mit Händen sein können. Sie haben ein Herz, das in zwei Vorkammern und zwei Herzkammern geteilt ist. Sie gebären in der Regel lebende Junge, die sie aus Milchdrüsen ernähren. Warmblütigkeit bedeutet nicht, dass die Körpertemperatur immer

gleichbleibend hoch ist. Sowohl Kloaken-, Flatter-, Faul- und Gürteltiere, Ameisenbären, Insektenfresser, Halbaffen und Klippschliefer ändern ihre Körpertemperatur z.T. erheblich, wie auch Winter- und Trockenzeitschläfer. Embryonal behaart heißt, dass manche wildlebende Säugetierarten erwachsen fast oder ganz unbehaart sind (Wale, Seekühe, Nashörner, Elefanten, Flusspferde, Hirscheber, Nacktmull, einige Flattertierarten u.a.). Es gibt auch haarlose Haustierarten (z.B. Schweine, Nackthunde).

Man findet auch Säugetiere, die nicht vier Gliedmaßen haben. Bei den Walen und Seekühen sind Becken und Hintergliedmaßen stark verkümmert und äußerlich nicht mehr sichtbar. Auch gebären nicht alle Säugetiere lebendige Junge, den die Kloakentiere legen Eier und ernähren ihre daraus schlüpfenden Jungen aus zitzenlosen Milchdrüsen.

Die Säugetiere besitzen auch noch andere Merkmale, die sie von den anderen Wirbeltieren unterscheiden. So trägt z.B. der Schädel für den ersten Halswirbel einen doppelten Gelenkhöcker. Im Innenohr befinden sich immer 3 Gehörknöchelchen.

Die Zahl der Halswirbel beträgt nur sieben (Ausnahme: Faultiere mit 6-9 und Seekühe mit z.T. 6), Nebenrippen fehlen. Brust- und Bauchhöhle sind durch das Zwerchfell vollständig voneinander getrennt.

Das Haarkleid ist ein einzigartiges Merkmal der Säugetiere. Es dient der Wärmedämmung, d.h. dem Erhalten einer gegenüber der Umgebungstemperatur erhöhten und gleichbleibenden Körpertemperatur. Damit war das Fell eine der Grundvoraussetzungen dafür, dass sich die Säugetiere über die ganze Erde, auch in die gemäßigten und polaren Breiten in die höchsten Gebirgsregionen ausbreiten konnten. Das Fell der Säugetiere wird meistens aus 4 übereinandergestufteten Haarformen aufgebaut: Sinnes-, Leit-, Grannen- und Wollhaare. Eine nähere Beschreibung dieser Haarformen würde hier zu weit führen.

Zu den Säugetieren gehören drei Unterklassen: die Ursäuger, die Beuteltiere oder Mittelsäuger und die Echten oder Höheren Säuger. Es leben heute etwa 4150 Säugetierarten, die in 23 Ordnungen aufgeteilt werden.

Zu den drei wichtigen Unterklassen lässt sich im Kurzen folgendes sagen:

### 3.1.1 Ursäuger (auch Monotremata, Prototheria, Non-Theria, Kloakentiere)



**Abbildung 4: *Tachyglossus aculeatus* (Kurzchnabeligel)**

Die Ursäuger entstanden wohl schon vor 220 Millionen Jahren. Fossil sind sie aber erst aus der Eiszeit nachgewiesen.

Die einzige Ordnung, die Kloakentiere, sind eierlegendende, behaarte oder bestachelte Vierfüßer. Sie haben eine Gesamtlänge von rund 40-80 cm und eine Körperhöhe von 15-40 cm.

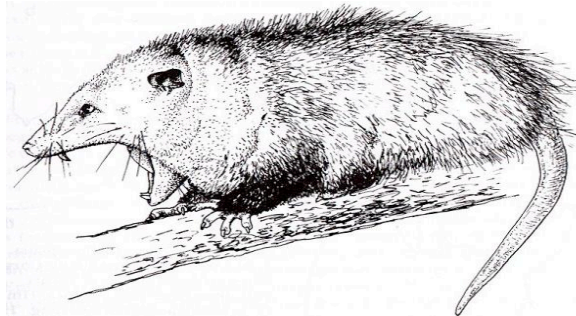
Im Schädel-, Schultergürtel- und Beckengürtelbau sind kriechtierartige Merkmale. Harnleiter, Geschlechtsdrüsen und Enddarm münden gemeinsam in der Kloake, genau wie bei den Vögeln. Entweder fehlen die Zähne oder sie gehen früh verloren. Schnabelartige Hornscheiden umhüllen dafür die Kiefer.

Der weibliche Geschlechtskanal hat noch keine eigentliche Gebärmutter. Das Weibchen hat keine Zitzen, sondern Milchfelder, von denen die Jungen die Milch ablecken.

Sie kommen in Australasien (Tasmanien, Australien, Neuguinea, Celebes) vor und sind Kleintierfresser.



### 3.1.2 Beuteltiere (auch Marsupialia, Methatheria)



**Abbildung 5: *Didelphis virginiana* (Amerikanisches Opossum)**

Entstanden sind die Beuteltiere vor etwa 100 Millionen Jahren. Gestalt und Größe sind sehr verschieden. Der Körperbau kann maulwurfähnlich plump oder schlank und hochbeinig sein. Die Kopf-Rumpf-Länge kann zwischen 4,5 cm und 160 cm und das Gewicht zwischen 5 g und 67 kg liegen. Der Schwanz ist im allgemeinen lang und bei manchen Gruppen als Greiforgan ausgebildet. Die Behaarung ist meist dicht und einheitlich. Am Schambein setzt ein paariger Beutelknochen auf, der bei beiden Geschlechtern zu finden ist, auch bei den beutellosen Arten. Die Weibchen haben 2-25 Zitzen, die in einem gut und vollständig entwickelten Beutel vorliegen.

Es gibt aber nicht nur die bekannten „hüpfenden und springenden“ Arten, sondern auch noch vierfüßig laufende, kletternde, gleitfliegende, grabende und schwimmende Arten.

Die Nase ist das wichtigste Sinnesorgan der Beuteltiere. Jedoch ist auch das Gehör, sowie der Tastsinn gut entwickelt. Zahlreiche, gut funktionsfähige Tasthaare findet man vor allem an der Oberlippe, am Kinn, an den Wangen und in der Augenbrauengegend, manchmal auch an den Handgelenken.

Ursprünglich waren die Gebärmutter und Scheide wohl ganz zweigeteilt. Bei den heutigen Arten sind sie verschmolzen. Der Hodensack liegt vor dem Penis. Bis auf eine Art, dem Langnasenbeutel, entwickeln sich die

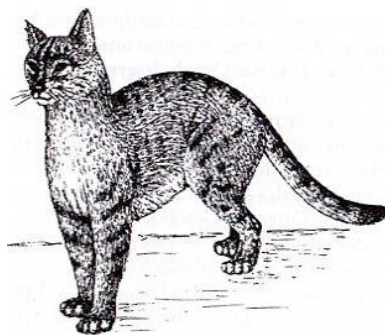
Keimlinge ohne Plazenta. Sie werden nach 8-42 Tagen Tragzeit sehr klein und larvenhaft geboren.

Die heutigen Tiere leben vom südlichen Kanada über Nord-, Mittel und Südamerika bis nach Südargentinien und Patagonien. In Australien bewohnen sie Tasmanien, Australien und Neuguinea, Celebes, Halmahera, den Bismarckarchipel und die Salomonen.

Bei den Beuteltieren findet man Fleisch-, Pflanzen- und Allesfresser.

Je nach Art kommen 1 bis 11 Junge zur Welt. Die Tragzeit liegt zwischen 8 und 42 Tagen. Bei der Geburt sind die Jungen zwischen 0,5 und 3 cm lang und sehr gering entwickelt. Sie wandern sofort in den Beutel und saugen sich an einer Zitze fest. Die Zitze schwillt nun knopfartig an, bis sie den Mundraum ausfüllt. Gleichzeitig verwachsen die Mundränder, so dass das Neugeborene druckknopfartig mit der Mutter verbunden ist. Bei Arten, die keinen Beutel haben, ist dies der einzige Halt der Jungen. Man unterscheidet 5 Ordnungen, 9 Familien, 72 Gattungen und 237 recente Arten. Bis zu der Ausrottung durch den Menschen gab es bis zu 16 Familien mit 149 Gattungen.

### 3.1.3 Echte oder Höhere Säuger (auch Eutheria, Placenta-Tiere)



**Abbildung 6: *Felis lybica* (Stammform der Hauskatze)**

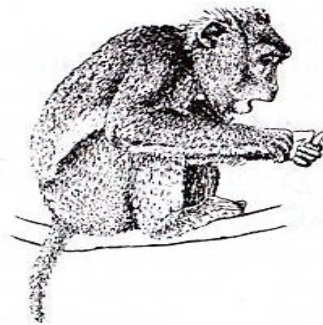
Diese wichtigste Unterklasse entstand vor 70-100 Millionen Jahren. Die Gestalt ist sehr unterschiedlich. Von "normal gebauten" Vierfüßern bis zu

hochspezialisierten Hüpfern, Springern, Rennern, Hanglern, Kletterern, Schwimmern, Gräbern, Wühlern, Schlüpfern, Gleit- und Schlagfliegern usw. mit verkümmerten oder verstärkten Vorder- oder Hintergliedmaßen. Die Größen variieren von 1 cm Körperhöhe, 7,5 cm Länge und 1,75 g Gewicht bis über 5 m Körperhöhe, 30 m Länge und 135 t Gewicht. Das Haarkleid ist sehr unterschiedlich und kann bis auf spärliche Reste zurückgebildet sein.

Die Jungen werden über eine Plazenta ernährt und wachsen in einer Gebärmutter heran, werden dann als unvollkommene Lager- oder Tragjunge oder als seh-, hör- und gehfähige Lauf- oder Schwimmjunge geboren und saugen Milch aus Zitzen. Die Weibchen haben 2-22 Zitzen. Der Penis ist oft mit einem Knochen verstärkt und fast immer vor dem Hoden gelegen.

Von 28 Ordnungen leben am Ende des 20 Jahrhunderts noch 15. Es gibt 113 Familien, 938 Gattungen und rund 4000 Arten.

### 3.1.4 Systematik der Säugetiere (orientierender Überblick)



**Abbildung 7: *Macaca mulatta* (Rhesusaffe)**

Im Folgenden nun eine Übersicht der Systematik der Säugetiere, in der die in dieser Arbeit untersuchten Arten bereits vermerkt sind und durch dicke Lettern markiert wurden. Die Ordnung erfolgt wiederum nach der neuesten Einteilung der deutschen zoologischen Forschung.

Klasse: Säugetiere

Unterklasse: Ursäuger (Prototheria oder Non-Theria)

Ordnung: Kloakentiere oder Eierlegende Säugetiere (Monotremata)  
 Familie: Ameisenigel oder Schnabeligel (Tachyglossidae)  
 Gattung: Kurzschnabeligel (Tachyglossus)  
**Art: Ameisenigel / Echidna (Tachyglossus aculeatus)**

Unterklasse: Beuteltiere oder Mittelsäuger (Metatheria)

Ordnung: Marsupialia (Beuteltiere)  
 Überfamilie: Rattenbeutler (Didelphoidea)  
 Familie: Beutleratten (Didelphidae)  
 Gattung: Opossums (Didelphis)  
**Art: Amerikanisches Opossum (Didelphis virginiana)**

Überfamilie: Raubbeutler (Dasyuroidea)  
 Familie: Beutleräuber (Dasyuridae)  
 Unterfamilie: Beutelmäuse (Phascogalinae)  
 Gattung: Spitzbeutelmause (Antechinus)  
**Art: Spitzbeutelmaus (Antechinus stuartii)**

Gattung: Schmalfußbeutelmause (Sminthopsis)  
**Art: Schmalfußbeutelmaus (Sminthopsis macroura)**

Überfamilie: Dachsbetler (Perameloidea)  
 Familie: Beuteldachse oder Bandikuts (Peramelidae)  
 Unterfamilie: Nasenbeutler (Peramelinae)  
 Gattung: Stachelnasenbeutler (Echymipera)  
**Art: Flachstachelnasenbeutler (Echymipera kalubu)**

Überfamilie: Zehenbeutler (Phalangeroidea)  
 Familie: Kängurus oder Springbeutler (Macropodidae)  
 Unterfamilie: eigentliche Kängurus (Macropodinae)  
 Gattung: Kurzschwanzkängurus oder Quokkas (Setonix)  
**Art: Kurzschwanzkänguru / Quokka (Setonix brachyurus)**

Gattung: Pademelons oder Filander (Thylogale)  
**Art: Filander (Thylogale billardieri)**

Gattung: Typische Kängurus (Macropus)  
**Art: Sumpfwallabie (Macropus eugenii)<sup>1</sup>**

Unterklasse: Echte oder Höhere Säuger (Eutheria)

Ordnung: Primaten oder Herrentiere (Primates)

Teilordnung: Primaten mit Nasenspiegel (Strepsirhini)

<sup>1</sup> Anm.: Die kleineren Kängurus wurden früher (fälschlicherweise) der Gattung der Wallabies zugeordnet. Im englischen Sprachgebrauch werden weiterhin „Kangaroos“ und „Wallabies“ als große und kleine Arten unterschieden. Es gibt aber nur eine Wallabieart: Wallabia bicolor.

Zwischenordnung: Halbaffen (Prosimiae) <sup>2</sup>

Überfamilie: Lemurenaffen (Lemuroidea)

Familie: Lemurenartige (Lemuridae)

Gattung : Lemuren (Lemur)

**Art: Katta (Lemur catta)**

Teilordnung: Primaten ohne Nasenspiegel (Haplorhini)

Unterordnung: Neuweltaffen oder Breitnasen (Platyrrhina)

Zwischenordnung: Affen (Simiae oder Anthroidea)

Überfamilie: Plattnasen (Ceboidea)

Familie: Krallenäffchen (Callitrichidae)

Gattung: Weißbüschelaffen (Callithrix)

**Art: Weißbüschelaffe (Callithrix jacchus)**

Familie: Kapuzinerartige (Cebidae)

Unterfamilie: Totenkopffaffen (Saimirinae)

Gattung: Totenkopffaffen (Saimiri)

**Art: Totenkopffaffe (Saimiri sciureus)**

Unterfamilie: Klammer- und Wollaffen (Atelinae)

Gattung: Ateles (Klammeraffe)

**Art: Schwarzer Klammeraffe (Ateles fusciceps)**

Unterordnung: Altweltaffen oder Schmalnasen (Catarrhini)

Zwischenordnung: Affen (Simiae oder Anthroidea)

Überfamilie: Hundsaffen oder Tieraffen (Cercopithecoidea)

Familie: Hundsaffen (Cercopithecidae)

Unterfamilie: Pavianartige (Papioninae)

Gattung: Makaken (Macaca)

**Art: Rhesusaffe (Macaca mulatta)**

**Art: Schweinsaffe (Macaca nemestrina)**

Gattung: Steppenpaviane (Papio)

**Art: Mantelpavian (Papio hamadryas)**

Gattung: Waldpaviane oder Mandrillartige (Mandrillus)

**Art: Mandrill (Mandrillus Sphinx)**

Gattung: Mangaben (Cercocebus)

**Art: Goldbauchmangabe (Cercocebus agilis)**

Unterfamilie: Meerkatzenartige (Cercopithecinae)

Gattung: Meerkatzen (Cercopithecus)

**Art: Brazza-Meerkatze (Cercopithecus neglectus)**

Familie: Schlankaffen oder Blätteraffen (Colobidae)

Gattung: Languren oder asiatische Colobiden (Pygathrix oder Presbytis)

**Art: Kappenlangur (Trachypithecus obscurus)**

<sup>2</sup> Anm.: Es gibt hier eine „doppelte Buchführung“: Menschenaffen und Menschen sind zwar Catarrhinae, aber keine Simiae. Die Bezeichnungen für die sogenannten Zwischenordnungen haben historischen Wert, sind aber taxonomisch unbedeutend. Es gibt auch Haplorhini, die zu den Prosimiae gezählt werden. Mit den Begriffen „Affe“ und „Halbaffe“ werden nur Entwicklungsstufen unterschieden. „Menschen“ sind die dritte Entwicklungsstufe, zu der auch die „Menschenaffen“ gezählt werden.

Überfamilie: Gibbonartige (Hylobatidae)  
 Familie: Gibbons oder „kleine Menschenaffen“ (Hylobatinae)  
 Gattung: Siamangs (Hylobates)  
**Art: Siamang (Hylobates syndactylus)**

Gattung: Kleine Gibbons (Hylobates)  
**Art: Weißhandgibbon (Hylobates lar)**

Zwischenordnung: Menschenartige (Hominoidea)  
 Überfamilie: Menschenartige (Hominoidea)  
 Familie: Menschenaffen (Pongidae oder Anthropomorpha)  
 Gattung: Orang-Utan (Pongo)  
**Art: Orang-Utan (Pongo pygmaeus abelii)**

Gattung: Schimpanse (Pan)  
**Art: Schimpanse (Pan troglodytes)**

Familie: Menschen (Hominidae)  
 Gattung: Mensch (Homo sapiens)  
**Art: Mensch (Homo sapiens sapiens)**

Ordnung: Nagetiere (Rodentia)  
 Unterordnung: Mäuseverwandte (Myomorpha)  
 Überfamilie: Mäuseartige (Muroidea)  
 Familie: Echte Mäuse (Muridae)  
 Unterfamilie: Echte Mäuse oder Altweltmäuse (Murinae)  
 Gattung: Hausmäuse (Mus)  
**Art: Hausmaus (Mus musculus domesticus)**

Gattung: Ratten (Rattus)  
**Art: Wanderratte (Rattus norvegicus)**

Ordnung: Hasentiere (Lagomorpha)  
 Familie: Echte Hasen (Leporidae)  
 Gattung: Kaninchen (Oryctolagus )  
**Art: Hauskaninchen (Oryctolagus cuniculus domesticus)**

Ordnung: Raubtiere (Carnivora)  
 Unterordnung: Landraubtiere (Fissipedia)  
 Überfamilie: Bärenartige (Arctoidea)  
 Familie: Bärenartige (Ursidae)  
 Unterfamilie: Großbären oder echte Bären (Ursinae)  
 Gattung: Braunbären (Ursus arctos)  
**Art: Europäischer Braunbär (Ursus arctos arctos)**

Überfamilie: Hundetiere (Cynoidea oder Canoidea)  
 Familie: Hundartige (Canidae)  
 Gattung: Hund (Canis)  
**Art: Wolf (Canis lupus)**

**Art: Haushund (Canis lupus familiaris)**

Überfamilie: Katzentiere (Herpestoidea oder Feloidea oder Ailurioidea)  
 Familie: Katzenartige (Felidae)  
 Unterfamilie: Gepardenartige (Acinonychidae)  
 Gattung: Geparden (Acinonyx)  
**Art: Gepard oder Jagdleopard (Acinonyx jubatus)**

Unterfamilie: Großkatzen (Pantherinae)  
 Gattung: Panther (Panthera)  
**Art: Sibirischer Tiger (Panthera tigris altaica)**

Unterfamilie: Kleinkatzen (Felinae)  
 Gattung: Katzen (Felis)  
**Art: Hauskatze (Felis libyca catus)**

Ordnung: Rüsseltiere (Proboscidea)  
 Familie: Elefanten (Elephantoidea oder Eplephantidae)  
 Gattung: Asiatischer Elefant (Elephas)  
**Art: Indischer Elefant (Elephas maximus)**

Ordnung: Unpaarhufer (Perissodactyla)  
 Unterordnung: Pferdeartige (Hippomorpha)  
 Familie: Pferde (Equidae)  
 Gattung: Pferd (Equus)

**Art: Hauspferd (Equus przewalski caballus)<sup>3</sup>**

**Art: Tarpan oder Przewalski-Pferd (Equus przewalski)<sup>4</sup>**

Untergattung: Esel (Asinus)

**Art: Somalischer Wildesel (Equus africanus somalicus)**

Ordnung: Paarhufer, Spreizzeher oder Spalthufer (Artiodactyla oder Paraxonia)

Teilordnung: Schweineverwandte oder Nichtwiederkäuer (Suina oder Suiformes)  
 Zwischenordnung: Nichtwiederkäuer (Nonruminantia)<sup>5</sup>  
 Familie: Echte Schweine (Suidae)  
 Gattung: Schweine (Sus)  
**Art: Hauschwein (Sus scrofa domestica)**

Teilordnung: Stirnwaffenträger (Pecora)  
 Zwischenordnung: Wiederkäuer (Ruminantia)

Unterordnung: Geweihträger (Eupecora)  
 Familie: Hirsche (Cervidae)  
 Unterfamilie: Echte Hirsche (Cervinae)  
 Gattung: Hirsche (Cervus)  
**Art: Axishirsch (Cervus axis oder Axis axis)**

Unterfamilie: Elchhirsche (Alcinae)  
 Gattung: Elche (Alces)  
**Art: Nordelch oder Elch (Alces alces)**

Familie: Hornträger (Bovidae)  
 Unterfamilie: Echte Rinder (Bovinae)  
 Gattung: Rinder (Bos)

<sup>3</sup> Dies ist die korrekte Bezeichnung für das Hauspferd auf Grund seiner Abstammung vom Wildpferd. Oft schreibt man aber auch nur „Equus caballus“.

<sup>4</sup> Eventuell handelt es sich beim mongolischen Wildpferd (Equus przewalski) und beim russischen Tarpan (Equus gmelini) um zwei verschiedene Arten.

<sup>5</sup> Die Einteilung in Ruminantia und Nonruminantia ist ebenfalls nur von historischer Bedeutung und taxonomisch sinnlos.

**Art: Dahomey-Rind (*Bos primigenius dahomey*)**

**Art: Hausrind (*Bos primigenius taurus*)**

Unterfamilie: Gazellenartige (Antilopinae oder Gazellinae)

Gattung: Springböcke (*Antidorcas*)

**Art: Springbock (*Antidorcas marsupialis*)**

Gattung: Antilopen (Antilope)

**Art: Hirschziegentilope (*Antilope cervicapra*)**

Unterfamilie: Ziegenartige (Caprinae)

Gattung: Ziegen (*Capra*)

**Art: Hausziege (*Capra aegagrus hircus*)**

**Art: Zwergziege (*Capra pygmi*)**

Gattung: Schafe (*Ovis*)

**Art: Hausschaf (*Ovis ammon aries*)**

**Tabelle 2: Systematik der Säugetiere**

Bei den Primaten wird seit einigen Jahren zusätzlich, in Bezug auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems, ein sogenannter „Progressionsindex“ verwendet (Stephan 1969). Dieser Index macht den Ablauf der progressiven Neencephalisation und die damit verbundene Zunahme von Integrations- und Assoziationsfeldern (sekundären Hirnfeldern) anschaulich. Diese Felder treten bei den höheren Primaten, im Vergleich zu den basalen Projektionsarealen bei einfacheren Primaten, vermehrt auf.

Zur Ermittlung dieses Index werden spezielle Meßmethoden verwendet, deren Beschreibung aber nicht Teil dieser Arbeit sein kann. Die Werte sind auf den Index eines basalen Insektivoren (=1) bezogen. Bemerkenswert ist der große Sprung von den Menschenaffen zum Menschen selbst.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Index</i>	<i>In dieser Arbeit untersucht</i>
Wieselmakis	10	-
Halbmakis	12	-
Lemuren	17,5-23,2	Lemur
Tarsier	21,5	-



Brüllaffen	20,8	-
Krallenaffen	26,3-29,5	Weißbüschelaffe
Nachtaffe	34	-
Schlankaffen	40	Kappenlangur
Meerkatzen	55	Brazza-Meerkatze
Kapuzineraffen	60	Totenkopffaffe
Makaken	75	Rhesusaffe, Schweinsaffe, Mantelpavian, Mandrill, Goldbauchmangabe
Klammeraffen	79	Schwarzer Klammeraffe
Gibbons	80	Weihandgibbon, Siamang
Orang-Utans	83	Orang-Utan
Schimpanzen	84	Schimpanse
Mensch	214	Mensch

**Tabelle 3: *Progressionsindex bei verschiedenen Primaten***  
*modifiziert nach H. Stephan (1969)*

## **3.2 Bindungstest**

### 3.2.1 Allgemeines

Um einen Überblick über die untersuchten Serumproben zu erhalten und um diejenigen Säugetiere herauszufiltern, die für weiterführende Untersuchungen geeignet erschienen, wurde zuerst ein Bindungstest (siehe 6.3.1.) durchgeführt. Alle vorhandenen Proben wurden dabei mindestens dreimal getestet, wobei alle Bindungstests unter gleichen Bedingungen mit denselben Materialien, Geräten und Methoden durchgeführt wurden. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde bei jedem Testlauf menschliches Vergleichsserum mitgetestet. Dazu wurden Proben von zwei bereits genauestens untersuchten gesunden Menschen mit normalem und niedrigem TBG-Spiegel (TBG-PD) verwendet.

Bei der Auswertung der Testreihen wurde auch das Verhältnis der gewonnenen Resultate der menschlichen Vergleichsproben überprüft, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu festigen. Vereinzelt wurden zusätzliche Bindungstests notwendig, um Fleischfresser und Pflanzenfresser oder Primaten und andere Säugetiere nochmals direkt zu vergleichen.

Die Ergebnisse der zahlreichen Testreihen wurden gesammelt und in eine Tabelle übertragen. Aus den Resultaten wurde ein Durchschnittswert im Prozentrang ermittelt, der sich am gesunden Menschen orientiert. Als Vergleichsperson wurde hierbei, wie bereits oben erwähnt, ein gesunder, männlicher Proband mit normalem TBG-Spiegel verwendet, der auch bei allen anderen Untersuchungen des Labors als Vergleich herangezogen wurde. Das TBG dieses Probanden ist laborchemisch und molekulargenetisch bereits seit Jahren analysiert und charakterisiert worden.

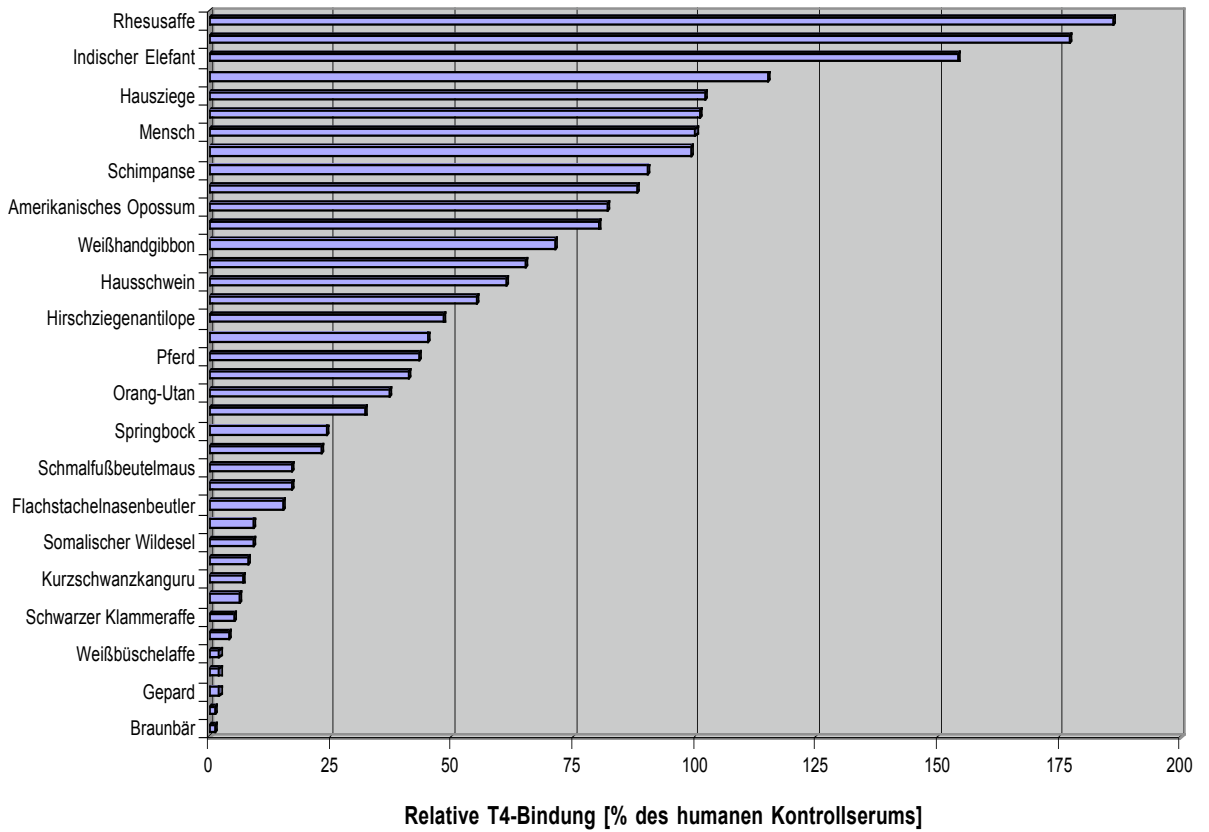
### 3.2.2 Überblick über alle untersuchten Tierarten

In der folgenden Tabelle sind alle Tierarten zu finden, die in einem Bindungstest genauer untersucht wurden. In den folgenden Kapiteln werde ich mich den einzelnen Auffälligkeiten zuwenden, die man hierbei finden konnte. Unter anderem erschien es nach eingehendem Studium der Eigenschaften der verschiedenen Ordnungen und Klassen interessant, die Ergebnisse nach

- Zugehörigkeit zu den Ordnungen (Klassifikation)
- Ernährungsweise (Omnivor, Herbivor, Insektivor, Carnivor)
- Entwicklungsgrad innerhalb der Ordnung der Primaten
- Lebensraum (Kontinent, Umgebung)
- Aktivität (Tag, Dämmerung oder Nacht)

zu unterscheiden.

In allen Tabellen wird die deutsche Bezeichnung nach D. Starck (1995) verwendet. Die Anordnung der Tierarten folgt dabei der offiziellen hierarchischen Einteilung. Wenn aus bestimmten Gründen auf die Einteilung verzichtet wird, oder diese modifiziert wurde, so wird dies genauestens begründet.



**Abbildung 8: Bindungskapazität verschiedener Tierarten**

In dieser Tabelle sind die wichtigsten getesteten Säugetiere aufgeführt. Es wird schnell deutlich, dass nur wenige Tierarten im Vergleich zum Menschen eine höhere Bindungskapazität von Schilddrüsenhormonen aufweisen. Diese Arten sind im Einzelnen:

- Lemur Katta
- Indischer (Asiatischer) Elefant
- Goldbauchmangabe
- Rhesusaffe

Eine Bindungskapazität auf annähernd menschlichem Niveau weisen auf:

- Schimpanse
- Sumpfwallbie

- Hausrind
- Hausziege

Alle anderen getesteten Tierarten zeigten im Versuch eine verminderte Thyroxinbindung. Zur Vereinfachung wurden die untersuchten Proben in vier Klassen eingeteilt, die folgendermaßen definiert wurden:

- 0 = keine oder nur sehr geringe (0-10%) Bindung
- + = geringe (11-50%) Bindung
- ++ = mäßige (51%-90%) Bindung
- +++ = gute oder höhere (91%-200%) Bindung

0	+	++	+++
Totenkopffaffe	Stachelnasenbeutelr	Axishirsch	Sumpfwallabie
Braunbär	Nordelch	Siamang	Mensch (Normal)
Weißbüschelaffe	Spitzfußbeutelmaus	Hausschwein	Hausrind
Gepard	Przewalski-Pferd	Zwergziege	Hausziege
Sibirischer Tiger	Spingbock	Weißhandgibbon	Lemur Katta
Hauskatze	Mandrill	Meerkatze	Mensch (Schwanger)
Ameisenigel	Orang-Utan	Opossum	Indischer Elefant
Hausmaus	Dahomey-Rind	Hausschaf	Goldbauchmangabe
Schw. Klammeraffe	Pferd	Mensch (TBG-PD)	Rhesusaffe
Schmalfußbeutelmaus	Kappenlangur	Schweinsaffe	
Wolf	Hirschziegenantilope	Mantelpavian	
Kurzschwanzkänguru		Schimpanse	
Pademelon			
Wanderratte			
Haushund			
Somalischer Wildesel			
Hauskaninchen			

**Tabelle 4: Bindungskapazität (Klassen)**

### 3.2.3 Bindungskapazität nach Ordnungen

Da jeweils nur wenige Vertreter der einzelnen Ordnungen untersucht wurden, sind die gewonnenen Ergebnisse nur als grobe Hinweise auf verschiedenes, für die weitere Forschung, interessantes oder weniger interessantes Bindungsverhalten zu werten. Aus Gründen der Vollständigkeit und vor allem für weitere Untersuchungen, die einen

Überblick über die bekannten Säugetiere schaffen sollen, erscheint eine kurze tabellarische Aufzählung jedoch sinnvoll. Außerdem findet man innerhalb bestimmter Unterordnungen oder Familien übereinstimmende Ergebnisse, die erwähnenswert erscheinen. Die Ordnungen, die zu den höheren oder echten Säugern gehören, sind nach der offiziellen Taxonomie durchnummeriert.

Ordnung	Untersuchte Arten	Ergebnisse
- Kloakentiere	1	0
- Beuteltiere	7	0 bis +++

6. Primaten	16	0 bis +++
9. Nagetiere	3	0
12. Raubtiere	6	0
24. Rüsseltiere	1	+++
28. Unpaarhufer	3	0 bis +
29. Paarhufer	10	+ bis +++

**Tabelle 5: Bindungskapazität nach Ordnungen (Überblick)**

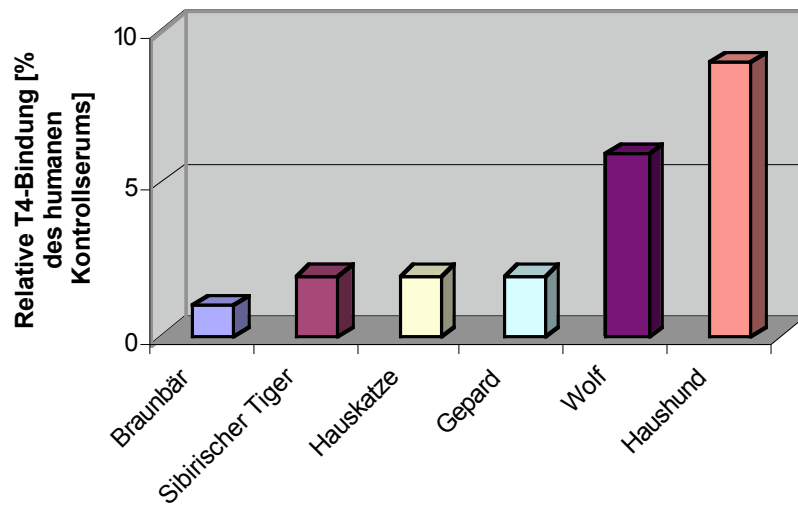
Es lassen sich folgende Ergebnisse zusätzlich festhalten:

- Primaten: Alle Mitglieder der Überfamilie der Plattnasen (Ceboidea) scheinen kein TBG als Bindungsprotein zu besitzen, da alle drei getesteten Arten so gut wie keine Bindung aufweisen.
- Primaten: Alle Mitglieder der Überfamilie der Hundsaffen (Cercopithecoideae), insbesondere diejenigen der Unterfamilie der Pavianartigen (Papioninae) scheinen eine hohe oder sehr hohe Bindungskapazität zu Schilddrüsenhormonen aufzuweisen.

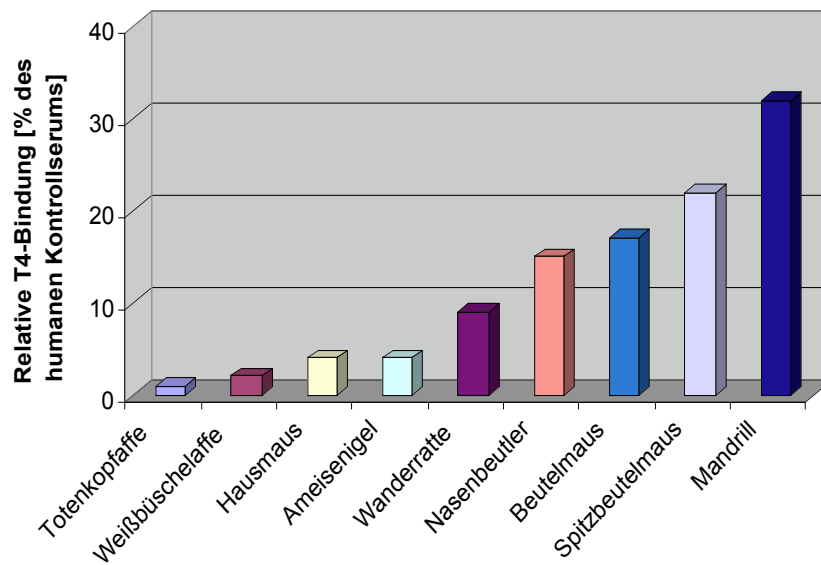
- Nagetiere: Alle getesteten Nagetiere zeigten keine oder nur eine sehr geringe Bindung im Versuch.
- Raubtiere: Alle getesteten Raubtiere (siehe auch 3.2.4) zeigten eine verschwindend geringe, oder nicht vorhandene Bindungskapazität für Schilddrüsenhormone.
- Huftiere: Bis auf den somalischen Wildesel und das Hauspferd zeigten alle getesteten Huftiere eine gute oder menschenähnliche Bindungskapazität des TBGs. Da alle getesteten Huftiere Pflanzenfresser sind, siehe dazu auch Kapitel 3.2.4
- Nur einzelne Primaten und der asiatische Elefant wiesen überhaupt eine deutlich höhere Bindungskapazität des TBGs auf.

#### 3.2.4 Bindungskapazität der Fleischfresser und Pflanzenfresser

Gerade der Vergleich der Bindungskapazität von Fleisch- und Pflanzenfressern brachte interessante Ergebnisse. Hierzu wurden die untersuchten Tiere in Fleisch- und Pflanzenfresser eingeteilt. Bei den Insektenfressern wurden nur die Tierarten ausgewählt, die sich auch häufiger von Kleintieren ernähren und damit als Insect-Carnivor bezeichnet werden können. Gerade bei den Primaten zeigten sich Unterschiede zwischen den reinen Pflanzen- und Blätterfressern und den Affenarten, die regelmäßig auch Insekten und andere Kleintiere verspeisen.



**Abbildung 9: Bindungskapazität der reinen Fleischfresser**

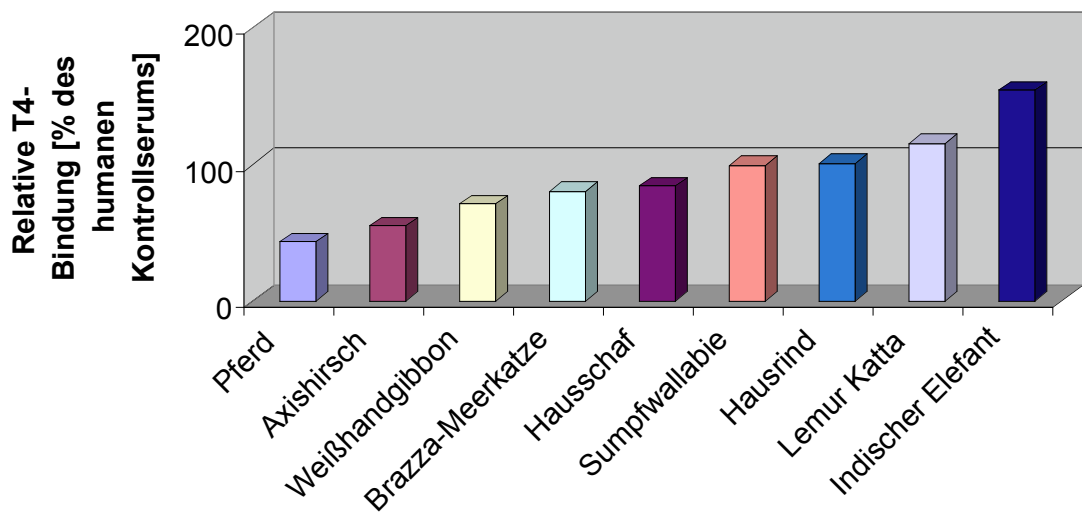


**Abbildung 10: Bindungskapazität der Insekten- und Kleintierfresser**

Als Ausnahme ist hier jedoch das Amerikanische Opossum zu nennen, welches als Insektenfresser regelmäßig auch Kleintiere verspeist und dennoch eine hohe Bindungskapazität aufweist. Da auch der Mensch und das Hausschwein als Allesfresser Schilddrüsenhormone gut an ihr TBG binden können, kann man die Ergebnisse in Bezug auf die Ernährungsweise



der Tierarten nur für reine Pflanzen- oder Fleischfresser anwenden. Denn auch wenn die untersuchten Affenarten, die sich bevorzugt von Insekten ernähren, eine geringe Bindungskapazität im Versuch zeigen, so gibt es andere Affenarten, wie Schimpanse oder Schweinsaffe, deren Serum trotz regelmäßigem Verzehr von Kleintieren keine „carnivoren Eigenschaften“ präsentiert.

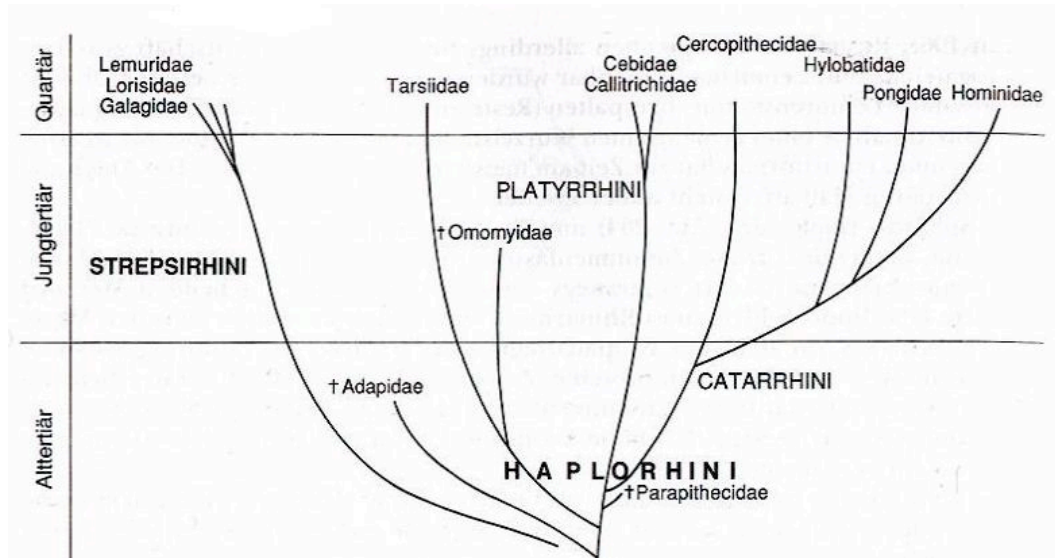


**Abbildung 11: Bindungskapazität der reinen Pflanzenfresser**

Zusammenfassend kann also festgehalten werden:

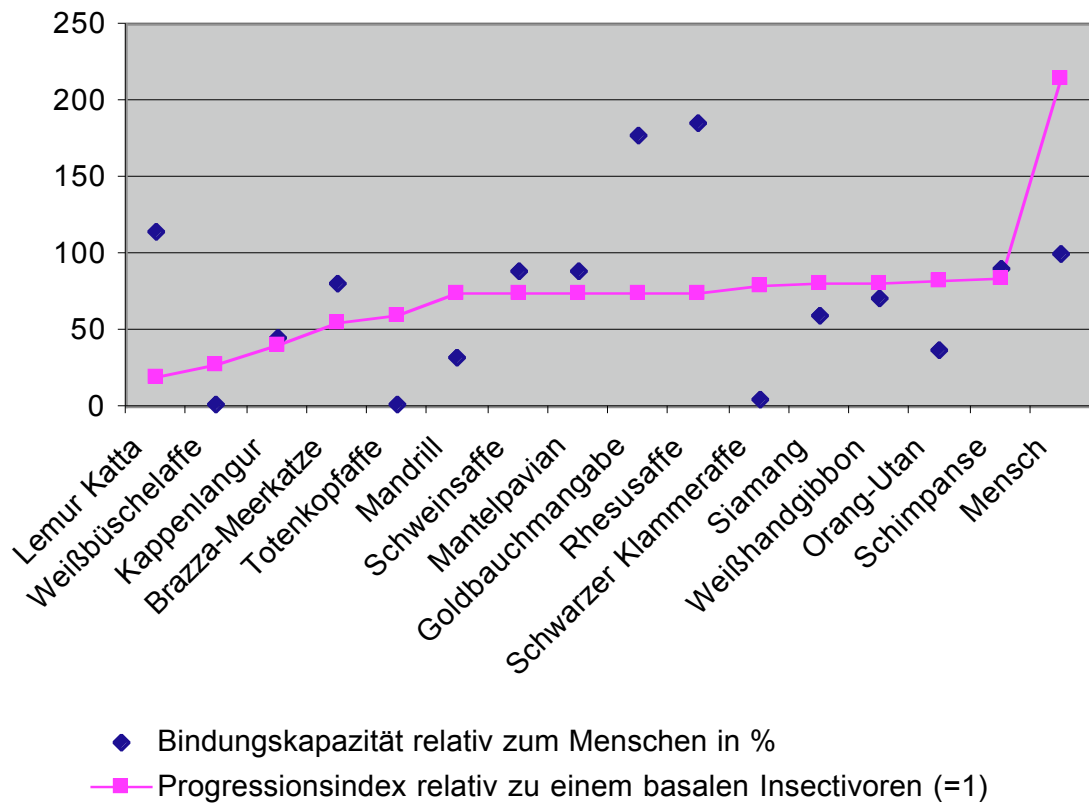
- reine Fleischfresser zeigen eine sehr niedrige oder gar keine Bindungskapazität für Schilddrüsenhormone.
- reine Pflanzenfresser zeigen eine hohe Bindungskapazität für Schilddrüsenhormone
- bei den Insektenfressern und den Allesfressern kommt man zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Es zeichnet sich jedoch auch hier eine Tendenz zur niedrigeren Bindungskapazität ab, die mit dem regelmäßigen Verzehr von Kleintieren zusammenzuhängen scheint.

### 3.2.5 Entwicklungsgrad der Primaten



**Abbildung 12: Stammbaum der Primaten**  
*modifiziert nach Lukett (1975)*

Die Abbildung stellt die Entwicklung der unterschiedlichen Gattungen und Arten der Altwelt- und Neuweltaffen auseinander dar. Bei den untersuchten Affenarten ließen sich einige Auffälligkeiten feststellen (siehe 3.2.4 und 3.2.6), die jedoch durch die weltweite Verbreitung und die vielfältige Anpassung der Herrentiere relativiert werden. Es erschien jedoch interessant, die Primaten nicht nur in Bezug auf ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Ordnungen, ihre Ernährungsweise und ihren Lebensraum zu untersuchen, sondern auch auf ihr Bindungsverhalten im Verhältnis zu ihrer Entwicklung auf sekundäre kognitive Fähigkeiten hin. Gibt es Veränderungen in der Bindungskapazität des TBGs, die mit der Nähe zu den Menschenaffen oder dem Menschen in Verbindung stehen? Die Antwort darauf kann, wenn man die vorliegenden Ergebnisse betrachtet, vorläufig nur ein klares „Nein“ sein, wie die folgende Tabelle zeigt:

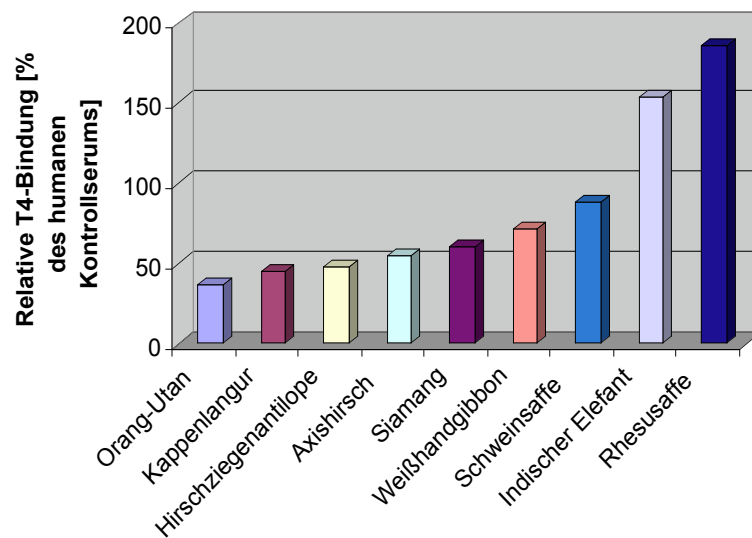


**Abbildung 13: Bindungskapazität im Verhältnis zur Neencephalisation**

### 3.2.6 Geographische Auffälligkeiten

Die Einteilung der untersuchten Arten nach ihrem geographischen Lebensraum brachte aufgrund der kleinen Anzahl nur Hinweise, die für die Vorbereitung weiterer Arbeiten aber Erwähnung finden sollen. Während bei den „überall“ (in jeder Umgebung und in jedem Klima) und bei den „weltweit“ (auf verschiedenen Kontinenten und in verschiedenen Klimazonen) lebenden Arten sehr unterschiedliche Ergebnisse zu vermerken sind, gab es zwei kleine Besonderheiten:

- Alle in Südamerika beheimateten Primaten wiesen keine Bindungskapazität des TBGs auf.
- Alle Tierarten (ausgenommen natürlich die Carnivoren), die auf dem indischen Subkontinent oder in Südostasien, und nur dort, beheimatet sind, zeigen eine gute oder sehr gute Bindungskapazität.



**Abbildung 14: Bindungskapazität von Tierarten aus Indien / SO-Asien**

### 3.2.7 Tageszeit der Nahrungssuche und Aktivität

Auch wenn bei den Tieren die Tageszeit ihrer Nahrungssuche und der Zeitraum ihrer größten Aktivität für ihr Überleben und für die Auswahl ihres Lebensraumes eine große Rolle spielen, so konnten aus den gewonnenen Daten hierzu keine Auffälligkeiten entnommen werden. Auch wenn anzunehmen ist, dass die unterschiedlichen Aktivitätsphasen, an die der Mensch ja nicht in gleicher Weise fest gebunden ist, mit unterschiedlichen Hormonspiegeln einhergehen, so konnte gerade bei dem Vergleich der nacht- und tagaktiven Affen und Beuteltiere kein System erkannt werden. Aus diesem Grund erscheint ein nähere Untersuchung von Tierarten nach ihrem Jagd- und Sammelverhalten obsolet.

### 3.3 Scatchard-Analyse

Bei den durchgeführten Scatchards zu Bestimmung der Bindungsaffinität zeigte sich, wie später bei den Versuchen zur Hitzedenaturierung (siehe 3.4), dass die Analyse der Tierseren mit niedriger, oder gegen Null gehender Bindungskapazität keine auswertbaren Ergebnisse lieferte.

Aus diesem Grund wurden nur Tierarten untersucht, bei denen TBG an Schilddrüsenhormone sicher gebunden hatte. Dennoch sei es erwähnt, dass zahlreiche Carnivoren (unter anderem Tiger, Gepard und Braunbär ) und die Primaten mit niedriger Kapazität (unter anderem der Totenkopffaffe) dennoch neben den Hauptversuchsreihen analysiert wurden, um damit die Ergebnisse der Bindungstests noch einmal zu bestätigen. Hierbei ergaben sich keine Abweichungen von den in Kapitel 3.2 beschriebenen Erkenntnissen. Es erschien dennoch wichtig, die zu untersuchenden Tierarten in die Scatchard-Versuche einzubeziehen.

Die untersuchten Tiere lassen sich demnach, ähnlich wie beim Bindungstest im Vergleich zum nicht defizienten Menschen grob in mehrere Gruppen einteilen:

- Tierarten mit deutlich schlechterer Bindungsaffinität (unter 50% relativ), wie zum Beispiel Brillenlangur, Mandrill oder Orang-Utan.
- Tierarten mit mäßig schlechterer Bindungsaffinität, wie zum Beispiel Weißhandgibbon, Lemur oder Hausschaf

Diese Tierarten zeigen ähnliche Ergebnisse wie ein Mensch mit partialem TBG-Mangel.

- Tierarten mit nahezu gleicher Bindungsaffinität, wie zum Beispiel Elefant, Rhesusaffe oder Hausziege. Diese Gruppe erwies sich als die Kleinste.

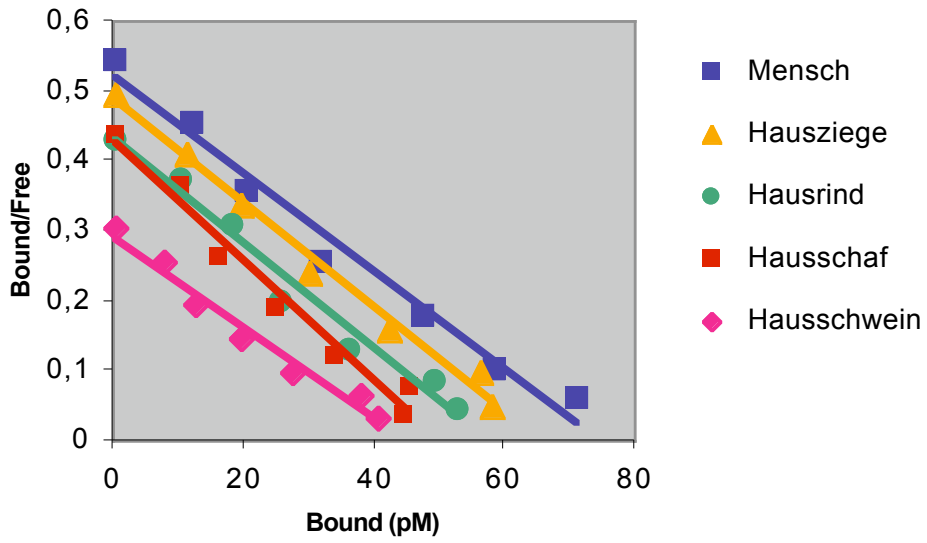


Abbildung 15: *Scatchard der Haustierarten*

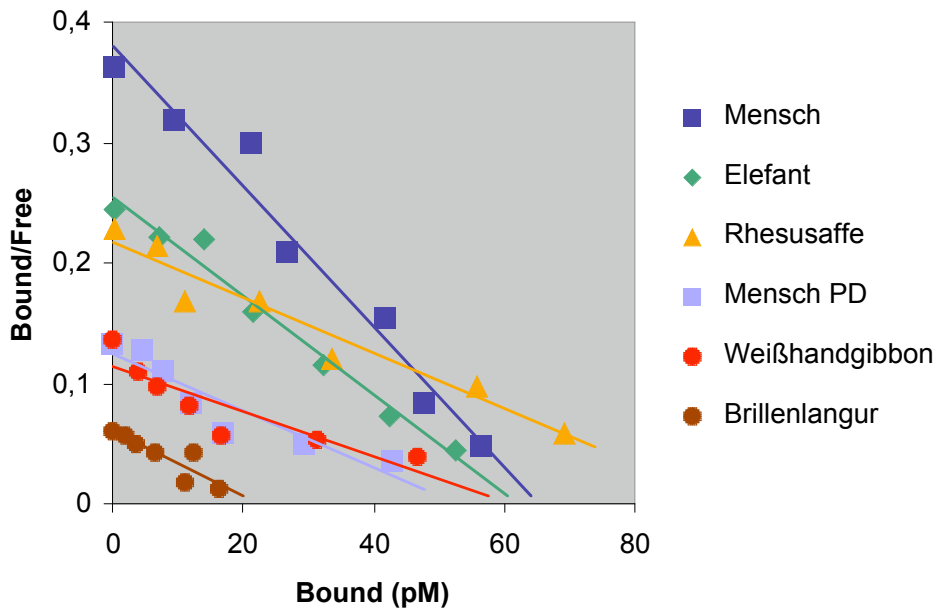


Abbildung 16: *Scatchard verschiedener Tierarten*

### 3.4 Hitzedenaturierung

Bei den Versuchen zur Hitzedenaturierung des Proteins bei 55°C waren die Ergebnisse eindeutig. Auch die Tierarten, welche eine höhere Bindungskapazität für Schilddrüsenhormone aufweisen, zeigten weniger Hitzestabilität als der Mensch. Nur das, im Vergleich mituntersuchte TBG anderer Menschen zeigte ein ähnlich stabiles Verhalten wie das TBG im Vergleichsserum.

In den ersten Versuchsreihen wurde das menschliche TBG mit Vertretern verschiedener Ordnungen verglichen. Die Ergebnisse wurden in absoluten Werten und in Prozenträngen angegeben.

Zu den einzelnen Versuchsreihen folgen nun einige Abbildungen, Erläuterungen und Interpretationen:

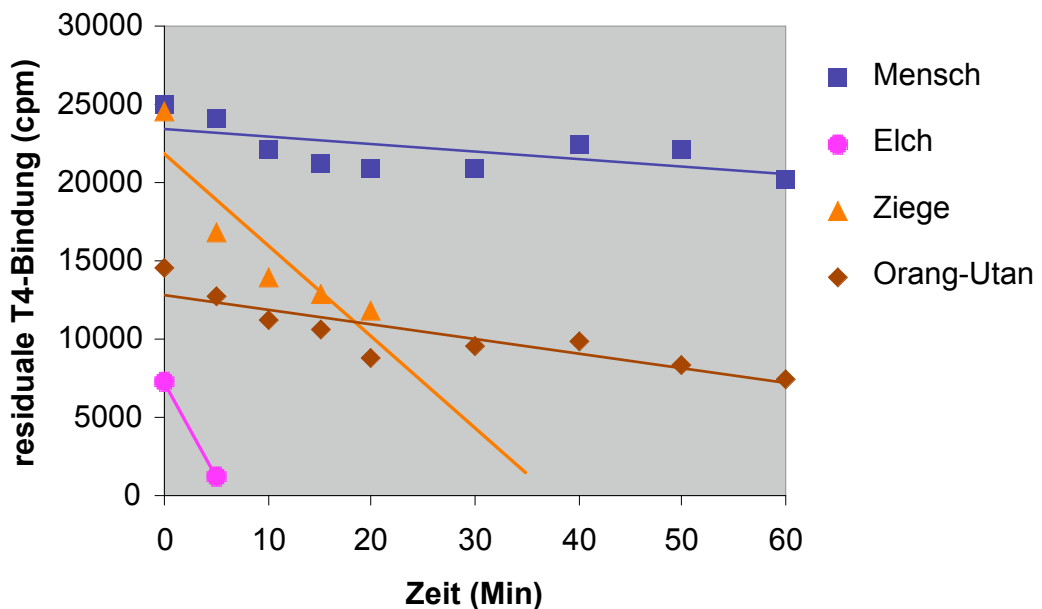
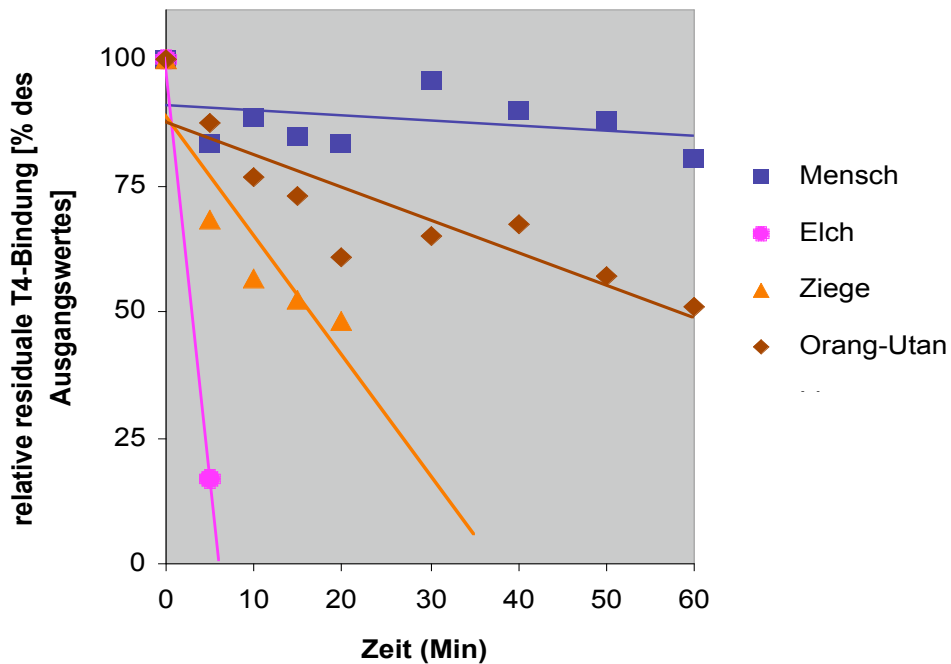


Abbildung 17: Hitzedenaturierung des TBG bei 55°C (1)



**Abbildung 18: Hitzedenaturierung des TBG relativ zum Ausgangswert (1)**

Auch wenn das TBG der Maus scheinbar ähnlich hitzestabil ist, wie das des Menschen, so zeigen die Untersuchungen, dass dieses Ergebnis nur durch die ohnehin niedrige oder nicht vorhandene Bindungskapazität für Schilddrüsenhormone zustande kommt. Aus diesem Grund war es wichtig bei der Auswertung der Untersuchungen zur Hitzestabilität immer relative und absolute Werte zu vergleichen und die Ergebnisse entsprechend zu interpretieren.

Der Elch und auch die nicht abgebildete Hausmaus, die beide wenig oder kein TBG aufweisen, erscheinen in der relativen Darstellung bei Verwendung von mehr Datenpunkten dann nämlich verfälscht. Interessant ist die Hausziege, die trotz einer ähnlich guten Bindungskapazität schnell im Vergleich zum menschlichen TBG deutlich abfällt. Auch der Orang-Utan zeigt sowohl im relativen, als auch im absoluten Vergleich eine schwächere Hitzestabilität.



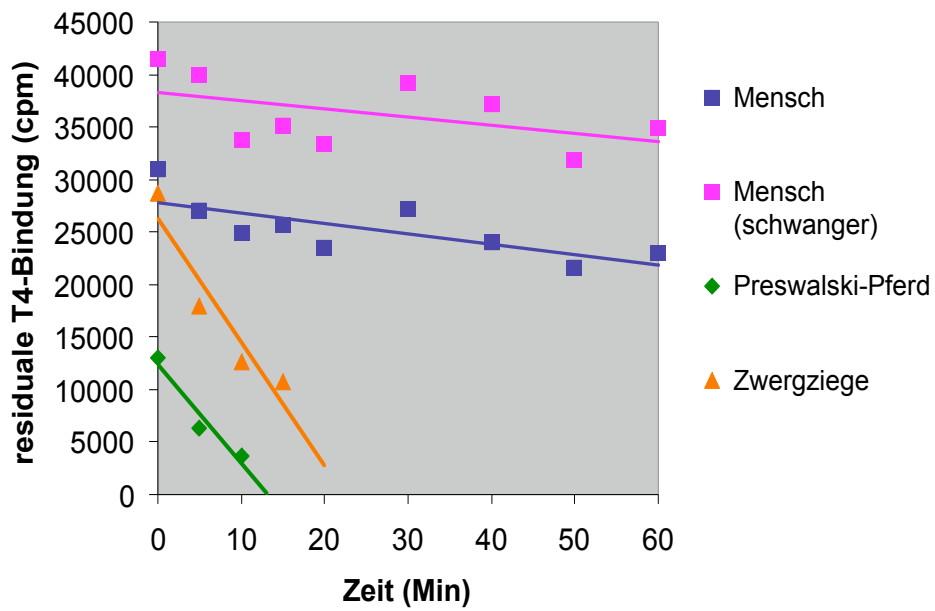


Abbildung 19: *Hitzedenaturierung des TBG bei 55°C (2)*

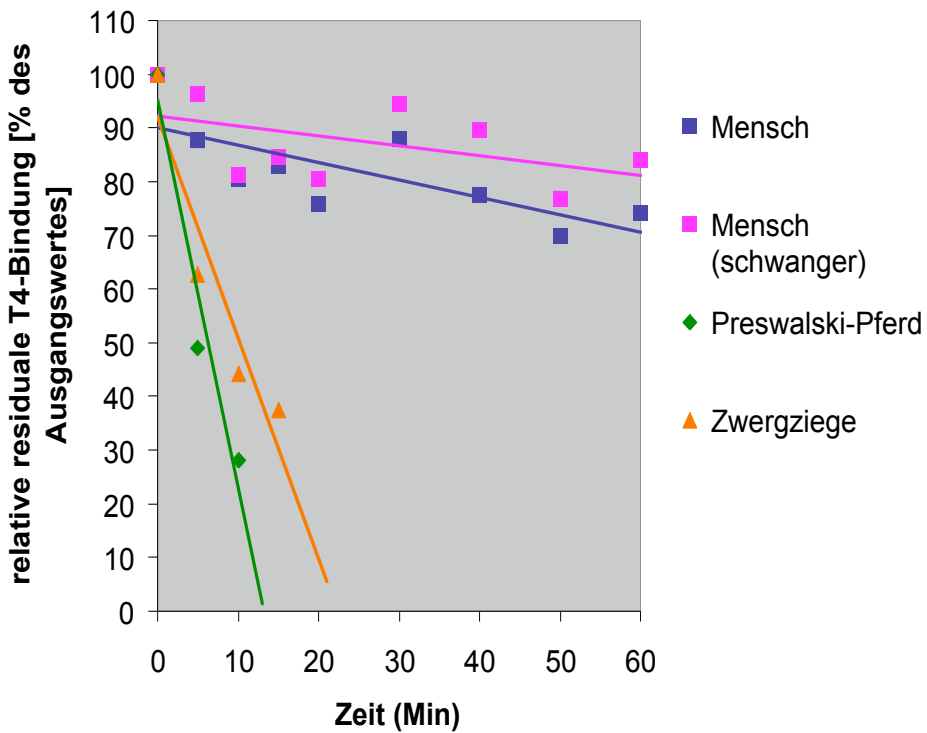


Abbildung 20: *Hitzedenaturierung des TBG relativ zum Ausgangswert (2)*

In den nächsten Versuchsreihen bestätigten sich diese Annahmen weiterhin. Wie in der oberen Abbildung zu sehen ist, erreicht keine Tierart das Niveau der Hitzestabilität des menschlichen TBGs. Sowohl das Przewalski-Pferd als auch die Zwergziege zeigen stark abfallende Kurvenverläufe im direkten Vergleich zum menschlichen Serum. Zwischen der Graviden und der männlichen Vergleichsperson zeigten sich in diesen Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund der niedrigen TBG-Gesamtbindungskapazität bei einigen Tierarten (zum Beispiel Kaninchen) konnte die Hitzedenaturierung nicht durchgeführt werden. Hierbei ist vor allem das niedrige Anfangsniveau wichtig, welches fast bei Null liegt und nur dadurch einen weiteren sichtbaren Abfall verhindert. Aus diesem Grund sind diese Tierarten hier auch nicht abgebildet.

Nach Abschluß der ersten Versuchsreihen wurde deshalb auf die Testung der Hitzestabilität derjenigen Tierarten, die im Bindungstest kein oder nur sehr wenig TBG gebunden hatten (siehe 3.2.2) und die in die Klasse „0“ eingeordnet wurden, verzichtet. Die im weiteren Verlauf der Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse bestätigten aber nur das Vorhergehende:

- Alle getesteten tierischen TBGs wiesen eine verminderte Hitzestabilität im Vergleich zum menschlichen TBG auf.

Zuletzt noch zwei Abbildungen, die deutlich zeigen, wie auch das TBG des asiatischen oder indischen Elefanten, dessen Bindungskapazität deutlich höher lag, in der Hitzedenaturierung schnell unter die gemessenen Counts des menschlichen Vergleichsserums abfällt.

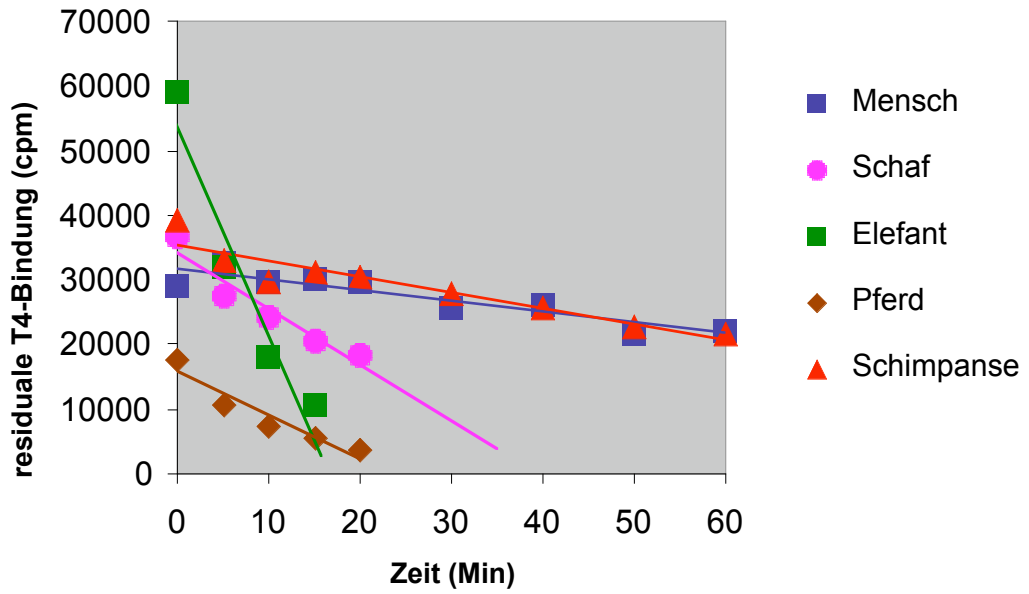


Abbildung 21: Hitzedenaturierung des TBG bei 55°C (3)

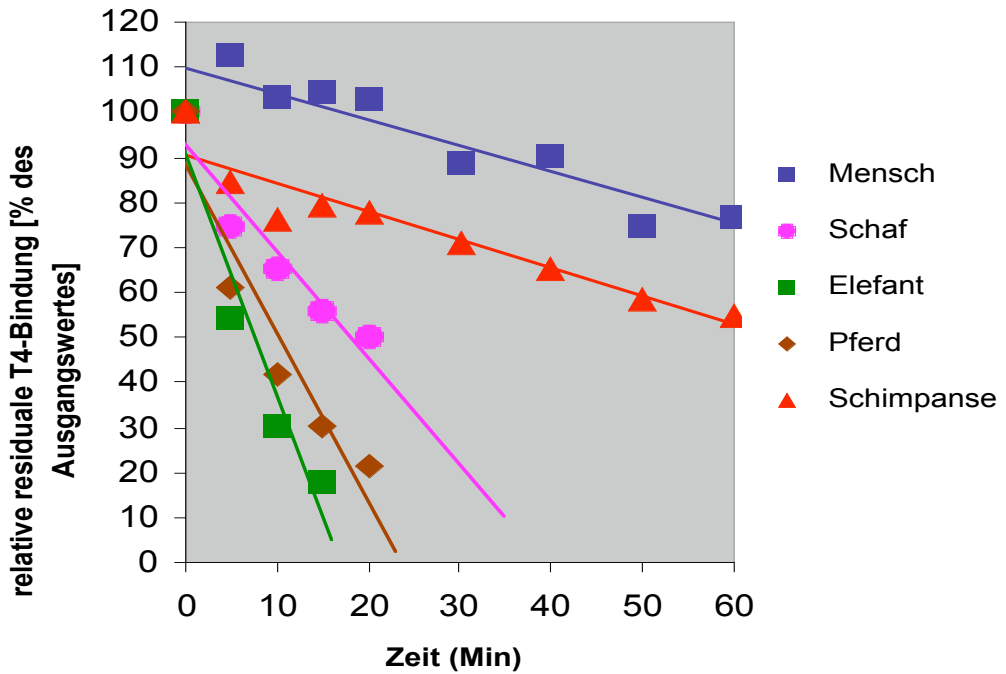


Abbildung 22: Hitzedenaturierung des TBG relativ zum Ausgangswert (3)

Nach Abschluß aller Testreihen ließ sich aus allen gewonnenen Daten noch ein weiteres Ergebnis ermitteln, welches in den Abbildungen 14 und 18 ebenfalls dargestellt ist:

- Eine ähnlich gute Hitzestabilität wie der Mensch zeigten nur die Primaten. Innerhalb dieser Ordnung scheint jedoch, in Bezug auf die Hitzestabilität, kein Zusammenhang zwischen dieser und Familienzugehörigkeit, Ernährung oder Lebensraum zu bestehen.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das TBG zahlreicher Säugetiere nach verschiedenen Eigenschaften proteinbiochemisch charakterisiert. Einzelne Fragestellungen und Besonderheiten wurden während der Versuchsverläufe und der Auswertung ermittelt und im Ergebnisteil detailliert dargestellt. Die Fragen, die im Zusammenhang mit den Vorarbeiten und den bekannten Erkenntnissen der Wissenschaft, noch von Interesse sind, sind die folgenden:

1. Welche Tierarten sollten zusätzlich noch, mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden, proteinbiochemisch untersucht werden?
2. Welche in dieser Arbeit untersuchten Tierarten eignen sich besonders zur weiteren molekulargenetischen und detaillierteren Untersuchung?

Diese Untersuchungen und die vorliegende Arbeit können uns den zwei weiterführenden Fragen der derzeitigen TBG-Forschung näher bringen:  
Was sind die genauen Aufgaben des TBG?  
Welche Eigenschaften sind für seine Funktion und seine Struktur entscheidend?

### ***4.1 In Zukunft zu untersuchende Tierarten***

Das Sammeln und die Untersuchung von tierischem Serum gestaltet sich gerade bei außereuropäischen Arten für eine, in Europa forschende Labrogruppe nicht immer einfach. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Arbeiten von Schreiber und Richardson in Australien zu erwähnen, die sich intensiv mit den dort ansässigen Säugetieren beschäftigt haben.

Dennoch sollten folgende Ordnungen und einzelne Familien weiter untersucht werden, um das, in dieser Arbeit begonnene, Bild zu vervollständigen und zu ergänzen:

- Die **Monotremata** sind vom Menschen und dem menschlichen TBG entwicklungsgeschichtlich weit entfernt und außerdem durch die vorliegenden Arbeiten genug untersucht. Als Sonderform der Säugetiere kommt den gewonnenen Ergebnissen in dieser Unterklasse sicher nur ergänzende Bedeutung zu. Das Schnabeltier (*Ornithorhynchus anatinus*), Englisch „Platypus“, wurde bereits getestet (Schreiber 1997).
- **Marsupialia**, die Beuteltiere, bieten noch Raum für weitere Untersuchungen (vor allem Hitzedenaturierung und Scatchard-Analysen), auch wenn hier ebenfalls auf die geographische Sonderstellung und die entwicklungsgeschichtliche Distanz zu den höheren Säugern hingewiesen werden muß. Als interessante Ergänzung für weiterführende Untersuchungen sind die schon einmal (Schreiber 1997) untersuchten Familien Peramelidae (Beuteldachse), Phalangeridae (Kletterbeutler), Petauridae (Streifenbeutler und Gleitflugbeutler), Macropodidae (Kangurus), Vombatoidea (Wombats, Plumpbeutler) und Tarsipedidae (Honigbeutler) zu nennen. Unter der Macropoden erscheint nach systematischen Gesichtspunkten die Unterfamilie der Potoroinae (Rattenkängurus) interessant. Bei den Untersuchungen der australischen Forschungsgruppe kam es zu sehr vielfältigen Ergebnissen, die wegen der Konzentration dieser Arbeit auf höhere und in den meisten Kontinenten vorhandenen Säugetiere, hier nicht detailliert erwähnt werden können.

Höhere Säuger (mit Ordnungsnummern):

- **1. Insectivora** sind eine sehr basale aber auch sehr heterogene Ordnung. Da es keine genauen Untersuchungen zu dieser Ordnung gibt, wäre es empfehlenswert von den vier bekannten Unterordnungen (Tenrecoidea, Chrysochloridea, Erinaceoidea, Soricoida = Tenrekartige, Goldmulle, Igelartige, Spitzmäuse und Maulwürfe) jeweils das Serum einer Tierart zu analysieren.
- **2. Macroscelididae** (Rüsselspringer, Elefantenspitzmäuse) wurden früher den Insectivora zugerechnet. Eine Untersuchung dieser kleinen Ordnung erscheint nicht sinnvoll. Als Ergänzung zu den gewonnenen Ergebnissen sei als Hinweis die Gattung *Elephantulus* als wichtigster Vertreter zu nennen.
- **3. Dermoptera** (Riesengleiter, Flattermakis, Colugos) bestehen nur aus zwei Gattungen sind aber als sehr basale Form nahe den Chiroptera und vor allem den Halbaffen interessant. Bislang bestehen zu dieser Ordnung keine Voruntersuchungen. Als wichtigste Gattung sei hier *Cynocephalus* (= *Galeopithecus*) zu erwähnen.
- **4. Chiroptera** (Handflügler, Fledertiere, Flughunde und Fledermäuse) sind eine sehr große Ordnung. Diese besteht aus zahllosen, weltweit verbreiteten und sehr mannigfaltigen Arten. Da nur eine Art, *Myotis lucifugus*, näher untersucht wurde, sollten weitere Analysen angeschlossen werden. Man unterscheidet die *Microchiroptera* (Fledermäuse) von den *Megachiroptera* (Flederhunde). Insgesamt stellen diese Tiere 20% aller Eutheria dar. Nur die Ordnung *Rodentia* weist mehr Artenvielfalt auf. Besonders hervorzuheben wären die Familien *Rhinolophidae* (Hufeisennasen), und *Vespertilionidae* (Glattnasen)
- **5. Scandentia** (Spitzhörnchen, Tupaias) sind eine weitere, sehr basale Ordnung, die früher zu den Insectivora gezählt wurde. Es finden sich nur wenige, seltene Gattungen, von denen sich eventuell

das Serum des Tuapaias (Spitzhörnchen) für zukünftige Versuche anbietet.

- **6. Primates** (Herrentiere) sind die menschenähnlichste und damit interessanteste Ordnung. Es gibt hier einige Voruntersuchungen (u.a. Seo 1989) und auch in dieser Arbeit wurde das TBG von Primaten extensiv untersucht. Dennoch erscheint es wichtig, weitere Arten zu untersuchen, um Lücken zu schließen und um gegebenenfalls die gewonnenen Ergebnisse zu festigen. Von den wenig entwickelten, den Insectivora nahestehenden, Affen empfiehlt es sich, die Familien Cheirogaleidae (Katzenmakis) und Lorisidae / Galagidae (Loris und Galagos) weiter zu untersuchen, die eine hohe Bindungskapazität haben (Seo 1989). Von den höheren Affen sollten auf jeden Fall einzelne Gattungen und Arten der Familie Tarsiidae (Koboldmakis) untersucht werden. Ergänzend zu den Ergebnissen dieser Arbeit erscheint es zudem sinnvoll noch eine Art der Callitrichidae (Krallenäffchen) und Cebidae (Kapuzinerartige) näher zu analysieren. Die Familie Cercopithecidae erscheint genug erforscht und auch die Colobidae sollten nicht primäres Untersuchungsziel sein, da hier mit dieser Arbeit und den Vorarbeiten zahlreiche Daten vorliegen. Leider fehlt bislang der Gorilla gorilla, dessen TBG als Menschenaffe unbedingt noch getestet werden sollte.
- **7. und 8.** sind ausgestorben
- **9. Rodentia** (Nagetiere, früher „Glires“) sind die größte Gruppe innerhalb der höheren Säuger. Man findet weltweit 1800 Arten und 33 Familien, so dass eine vollständige Analyse dieser Ordnung unmöglich sein dürfte. Es lässt sich aufgrund der wenigen Voruntersuchungen und der Beschränkung auf die bekanntesten Vertreter (so auch in dieser Arbeit), nämlich auf Maus und Ratte, nur ungefähr sagen, welche weiteren Arten sich für eine Untersuchung anbieten könnten. Auf jeden Fall sollten die Familie



Sciuridae (Eichhörnchenartige) mit *Marmota marmota* (Alpenmurmeltier), *Citellus* (Ziesel), *Cynomys* (Präriehund) und *Tamias* (Streifenhörnchen, Chipmunks, Burunduks) vertreten sein. Weiterhin empfehlen sich die Familien Castoridae mit *Castor* (Biber) und die Familie Cricetidae mit ihren großen Unterfamilien Cricetinae (Hamster) und Gerbillinae (Rennmäuse). Aufgrund der Systematik bietet sich auch die Familie Arvicolidae (Wühlmäuse) mit der Unterfamilie Lemminae (Lemminge), den afrikanischen Muridae und die Gattung *Mastomys* (Vielzitzenmaus) an. Es folgen in der Auswahl der interessanten Familien der Rodentia die Glirinae (Schläfer oder Bilche) deren zahllose Unterordnungen sehr selten sind, Hystricidae (Stachelschweine), Hydrochoeridae (Wasserschweine) und abschließend die Chinchillidae (Hasenmäuse). Von den Caviidae (Meerschweinchen) wurde bereits *Cavia porcellus* getestet, welches kein TBG aufwies. Es erscheint auch aus diesem Grund nicht sinnvoll von allen diesen Familien Serumproben zu untersuchen, aber es ist wichtig, die breit gefächerte Systematik dieser Ordnung aufzuzeigen.

- **10. Lagomorpha** (Hasen) werden durch zwei prominente Gattungen vertreten, die beide bereits untersucht wurden. Zum Vergleich bietet sich noch *Lepus timidus* (Schneehase) an.
- **11. Cetacea** (Mutica, Wältiere) sind wichtige und für die Forschung sicher interessante Säugetiere. Aus Artenschutzgründen ist es jedoch schwer, Blut zahlreicher Arten zur Untersuchung zu erhalten. Es würde sich anbieten, von den beiden Unterordnungen Odontoceti (Zahnwale) mit den Delphinen und Mysticeti (Bartenwale) jeweils eine Art zu analysieren.
- **12. Carnivora** (Raubtiere) sind eine Ordnung, deren Vertreter nach dem Stand der Forschung, der auch durch diese Arbeit bestätigt wurde, über kein TBG als Bindungsprotein für Schilddrüsenhormone

verfügen. Zur Vervollständigung des Bildes, und um auszuschließen, dass einzelne Gattungen doch TBG aufweisen, sollten eventuell nach die Familien Mustelidae (Marderartige mit Dachsen), Procyonidae (Kleinbären), Viverridae (Ginsterkatzen, Palmenroller), Herpestidae (Ichneumons, Mungos) und Hyaenidae (Hyaenen) untersucht werden. Es erscheint sinnvoll und wichtig, die Sera der Unterordnung Pinnipedia (Flossenfüßler, Robben) ebenfalls genauer zu analysieren.

- **13. Pholidota** (Schuppentiere) besteht nur aus einer Gattung, deren populärster Vertreter, *Manis* oder auch *Smutsia gigantea* (Riesenschuppentier) sich für eine systematische Untersuchung anbietet, auch wenn aufgrund der entfernten Verwandtschaft zum Menschen hierfür kein triftiger Grund besteht.

Die Ordnungen 14 bis 29 zählen alle zu den Huftieren (Ungulata)

- **14. bis 17.** sind ausgestorben
- **18. Tubulidentata** (Röhrenzähler, Erdferkel) seien hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. *Orycteropus afer* wäre eine Art, dessen TBG man untersuchen könnte, auch wenn dazu, ähnlich wie bei der Ordnung 13 keine augenscheinliche Notwendigkeit besteht.
- **19. bis 23.** sind ausgestorben
- **24. Proboscoidea** (Rüsseltiere) sind eine kleine Ordnung, die aber für die weitere TBG-Forschung interessant sein könnte, da eine untersuchte Art, *Elephas maximus*, eine hohe Bindungskapazität auswies. Es erscheint deshalb sinnvoll, das Serum des afrikanischen Elefanten (*Loxodonta africana*) ebenfalls zu untersuchen.
- **25.** ist ausgestorben
- **26. Sirenia** (Seekühe) erscheinen wie 13 und 18 nicht sinnvoll.
- **27. Hyracoidea** (Schliefer) sind keine Nagetiere, auch wenn sie früher zu den Rodentia gezählt wurden. Die genaue Zuordnung wird aber vor allem in letzter Zeit wieder heftig diskutiert. Da es nur eine

Familie innerhalb dieser Ordnung gibt, wäre eine Analyse des TBGs im Vergleich zu den Rodentia aber erstrebenswert.

- **28. Perissodactyla** (Unpaarhufer) sind auch in dieser Arbeit genau untersucht worden. Ergänzend könnte man die Familien Tapiridae (Tapir) und Rhinocerotidae (Nashörner) auswählen.
- **29. Artiodactyla** (Paarhufer) sind eine sehr große und dem Menschen als Haustiere gut bekannte Ordnung. Innerhalb dieser Arbeit wurden die wichtigsten Arten analysiert und die Ergebnisse wurden beschrieben. Insgesamt stellt diese Ordnung eine der interessantesten und für die TBG-Forschung bedeutendsten Ansammlung von Familien dar, die unbedingt weiter studiert werden sollte. Es empfiehlt sich besonders aus der Familie Suinae noch andere Schweinearten zu analysieren. Zudem erscheint sinnvoll folgende Tiergruppen näher zu beleuchten: Familie Hippopotamidae (Flusspferde), von der Unterordnung Tylopoda (Schwielensohler), die Familie Camelidae (Kamele), von der Unterordnung Tragulinae die Arten *Hyemoschus* und *Tragulus javanicus* (Kleinkantchill). Diese sind innerhalb der Artiodactyla besonders interessant, weil es sich um sehr alte Formen dieser Ordnung handelt. Oft werden sie als die Urformen der Wiederkäuer bezeichnet, die bei den Unpaarhufern bereits ausgestorben sind. In der Unterordnung Pecora ist die Familie Moschidae (Moschustiere) als eine Reliktgruppe wichtig. Desweiteren sollte man von der Familie Cervidae (Hirsche) noch die Sera der Unterfamilien Capreolinae (Rehe) und Rangiferinae (Rentiere und Karibus) einer Laboruntersuchung zukommen lassen. Weitere bedeutende Familien sind Giraffidae und Bovidae, von welchen unter anderem *Bubalus* (asiatischer Büffel), *Syncerus caffer* (Kaffernbüffel), *Bison bison* (amerikanischer Bison) und *Bison bonasus* (Wisent) neue oder ergänzende Ergebnisse liefern könnten. Zuletzt bieten sich Unterfamilien 4-9 der Hornträger, die

sehr vielfältigen Antilopenarten und Bockarten inklusive der Gnus und der Spießböcke, außerdem die Gazellen sowie die Gemen an. Innerhalb der Unterfamilie Caprinae (Ziegen) sind Ovibos (Moschusochse) und Wildschafe und Wildziegen anzugehen.

- **30. Xenarthra** (Edentata) sind eine zahnlose, lose geordnete Gruppe, welche schwer zuzuordnen ist. Diese Ordnung wird noch immer von Zoologen und Biologen ausgiebig diskutiert und erforscht. Falls Untersuchung von Sera möglich sein sollten empfehlen sich die Familien Cingulata oder Loricata (Gürteltiere), Tardigrada (Faultiere) und Vermilingua (Ameisenfresser).

#### ***4.2 Molekular genetisch zu untersuchende Tierarten***

Hier bieten sich von den untersuchten Tierarten vor allem diejenigen an, welche

- a) eine höhere oder gleich hohe Bindungskapazität
- b) eine ähnlich hohe Bindungsaffinität und
- c) eine ähnlich gute Hitzestabilität

aufzuweisen haben.

In der vorliegenden Arbeit wiesen diese Eigenschaften (teilweise mit Einschränkungen) folgende Tierarten auf:

- Hausziege
- Indischer Elefant
- Rhesusaffe und
- Goldbauchmangabe

Diese Arten würden sich für eine genauere Analyse mit molekulargenetischen Mitteln anbieten. Gerade die beiden Primatenarten sollten dabei im Mittelpunkt des Interesses stehen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Überblick über ein breites Spektrum von höheren Säugetieren und einigen Beuteltieren und Kloakentieren geschaffen. Auf Basis dieser Forschung kann das TBG einzelner Tierarten genauer auf seinen Aufbau und seine Beschaffenheit untersucht werden.

Proteinbiochemisch wurden die Tierarten durch Prüfung ihrer Serumkonzentration, der Bindungsaffinität für  $T_4$ , und der Hitzestabilität charakterisiert. Die Methodik bestand aus dem  $T_4$ - Bindungstest, der Scatchard-Analyse und der Hitzedenaturierung

In Verwertung und durch weiterführende Untersuchungen auf Basis der neuen Erkenntnisse könnten im TBG-Molekül Regionen identifiziert werden, welche sehr wahrscheinlich für Ligandenbindung und Hitzestabilität von Bedeutung sind. Zusätzlich könnten bestehende Hypothesen bezüglich des  $\alpha_1$ -PI-Strukturmodells zur Funktions-Struktur-Korrelation im TBG-Molekül bestätigt werden.

## **6. Verwendete Geräte, Materialien und Methoden**

### **6.1 Geräte**

Zum Einstellen von Lösungen wurde das pH-Meter pH-Digi 510 der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten, Weilheim verwendet. <sup>125</sup>J-Messungen wurden im Liquid Szintillation Analyzer 1450 Wizzard von Wallac/Berthold, München durchgeführt. Die Kühlzentrifuge sowie die Zentrifugenröhrchen waren von Sorvall/DuPont, Bad Homburg. Der Autoklav war von Tecnomara, Bad Homburg. Die Tischzentrifuge 5415 C und der Thermomixer 5436 waren beide von Eppendorf, Hamburg. Der Vortex-Evaporator von der Firma Bender & Hobein, Zürich, Schweiz. Die Standkamera vom Typ MP4 und die Polaroidfilme Typ 667 von Agfa lieferte Sigma, Deisenhofen. Absorptionsmessungen wurden durchgeführt mit dem Spektralphotometer DU 62 der Firma Beckmann, Sommerset, USA.

### **6.2 Materialien**

Das radioaktiv markierte <sup>125</sup>Jod-Thyroxin bezogen wir von Du Pont, Bad Homburg v. d. H. (NEX-111H). Das Ionenaustauscher Resin Amberlite IRA-400 war von der Firma Mallinckrodt, Paris. Von Gibco BRL, Eggenstein waren Phospor-Buffered-Saline (PBS) pH 8.0; das Petroleumbenzin von Riedel-de-Haen, Seelze. Safe-Lock 0,5 ml Reaktionsgefäse kamen von Biozym, Hessisch Oldendorf. Von Promega/Serva, Heidelberg, stammten Agarose, Agar Agar und ein Teil des Bovinen Serumalbumin (BSA Fraktion V). Borsäure, Bromphenolblau, CaCl<sub>2</sub>, Chloroform, Ethanol 96%, Harnstoff, KAc, KCl, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NaCl, Na-Acetat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Saccharose, Tris-

Base, Tris-HCl und Tris/HCl pH 8,8 bezogen wir von Merck, Darmstadt. ATP, restliche Teile des BSA Fraktion V, Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Proteinase K waren von Boehringer, Mannheim. Barbital Puffer, Chloroform, Ethidiumbromid, Glycerol, Hefeextrakt, Isoamylalkohol, Mineralöl, Sigmacote, TE-gesättigtes Phenol, Thyroxin ( $T_4$ ), Triton X-100 und Trypton lieferte Sigma, Deisenhofen.

Von Falcon (über Labor Schubert, München) bezogen wir 50 ml und 14 ml Blue Max Röhrchen; die 1 ml Reaktionsgefäße von Eppendorf, Ismaning. Einmal-Sterilfilter waren von Millipore, Watford, UK.

### **6.3 Methoden**

#### **6.3.1 $T_4$ -Bindungstest**

Mit dem  $T_4$ -Bindungstest wird die Bindungskapazität von TBG für  $T_4$  bestimmt. Dazu sättigt man das TBG der zu untersuchenden Serumprobe (Probe, P) mit radioaktiv markiertem  $T_4$  ab, den Überschuß an freiem  $T_4$  bindet man vollständig an ein Ionenaustauscher-Harz. Im Überstand befindet sich jetzt nur noch das vom TBG gebundene  $T_4$ , dessen Menge mit dem  $\square$ -Zähler bestimmt wird. Störgrößen im Serum, die die Bindung kompetitiv beeinflussen könnten, werden für jede Serumprobe mit Hilfe der sog. Displacement-Bestimmung weitgehend eliminiert: durch weitere Zugabe von unmarkiertem  $T_4$  im Überschuß wird das Markierte vom TBG verdrängt und an das Harz gebunden. Im Überstand bleibt dann nur noch eine unspezifische markierte  $T_4$  Menge (Displacement, D). Dieser Wert wird am Ende von den einzelnen Meßwerten subtrahiert. Für jeden Bindungsassay wird ferner ein Null- und ein Totalwert bestimmt. Der Nullwert (N) ergibt sich aus der vollständigen Sättigung der markierten  $T_4$ -Lösung mit dem Ionenaustauscher-Harz (ohne Zugabe von Serum) durch

Messung des Überstandes. Der Totalwert (T) errechnet sich durch alleinige Messung der markierten T<sub>4</sub>-Lösung.

Barbital Puffer (BP) dient der Verdrängung von im Serum auch an Albumin und Transthyretin gebundenem T<sub>4</sub>, wobei die Bindung an TBG unbeeinträchtigt bleibt. Die unspezifische Bindung von TBG an den Reaktionsgefäßwänden wird durch Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) reduziert.

### Barbiturat Puffer (BP)

5 x 1g (á 60 mM) Barbiturat Puffer      ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

Der Ansatz wurde zum besseren Lösen kurze Zeit auf 60°C erhitzt.

Die Konzentration betrug 300mM.

### BSA

100 mg BSA      ad 5 ml H<sub>2</sub>O dest.

Die Konzentration betrug 20 mg/ml.

### TB-Lösung

10 mM Tris/HCl pH 8,8      50 ml

0,01% BSA (20mg/ml)      50 µl

### Lösung C

Barbiturat Puffer      100 ml

BSA-Lsg. (20mg/ml)      100 µl

<sup>125</sup>J T<sub>4</sub>      240 µl

### Lösung D

Barbiturat Puffer      3 ml

T<sub>4</sub>-Stock (2mg/ml)      30 µl



Lösung D wurde immer frisch angesetzt.

Zur Kontrolle wurde die Verdünnungsreihe eines Testserums mitgetestet:

1. 1  $\mu\text{l}$ : 2  $\mu\text{l}$  Serum + 18  $\mu\text{l}$  TB
2. 0,3  $\mu\text{l}$ : 6  $\mu\text{l}$  (aus 1.) + 14  $\mu\text{l}$  TB
3. 0,1  $\mu\text{l}$ : 6  $\mu\text{l}$  (aus 2.) + 12  $\mu\text{l}$  TB

Je 10  $\mu\text{l}$  Serum wurde mit 2 ml Lösung C gemischt. Dieser Ansatz wurde aufgeteilt; jeweils 950  $\mu\text{l}$  wurden zu 50  $\mu\text{l}$  TB-Lösung (Probe, P) und zu 50  $\mu\text{l}$  Lösung D (Displacement, D) gegeben. Zur Bestimmung der Null- und Totalwerte (N, T) wurden je Test zwei Röhrchen mit je 950  $\mu\text{l}$  Lösung C versetzt.

Die Proben wurden gevortext, dann 30 min bei Raumtemperatur und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Sodann wurden die Ansätzen P, D und N mit 0,5  $\text{cm}^3$  Ionenaustauscher-Harz versehen, zwei Minuten geschüttelt, mit 2 ml eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und schließlich 30 sec aufgeschüttelt. Nach Sedimentation des Harzes wurde je 1 ml zügig abpipettiert und die Radioaktivität im  $\square$ -Zähler bestimmt.

### 6.3.2 Scatchard-Analyse der Bindungsaffinität von TBG

Ähnlich dem o. g.  $\text{T}_4$ -Bindungstest, der die Bindungskapazität von TBG bestimmt, wird hier die Bindungsaffinität von TBG für  $\text{T}_4$  errechnet.

Präparationen der zu untersuchenden Serumprobe werden mit  $^{125}\text{I}-\text{T}_4$  inkubiert und anschließend mit ansteigenden Mengen von nicht-radioaktivem  $\text{T}_4$  versetzt, welches das radioaktive  $\text{T}_4$  allmählich verdrängt. Das markierte  $\text{T}_4$  wird desto schneller verdrängt, je schlechter es vom TBG gebunden wird. Nach der Inkubation wird das ungebundene  $\text{T}_4$  mittels Ionenaustauscherharz von dem Proteingebundenen getrennt. Anschließend

wird die TBG-gebundene  $^{125}\text{I}$  Aktivität im  $\beta$ -Zähler gemessen. Die Affinitätskonstante ( $K_a$ ) und Konzentration der verschiedenen TBG-Präparationen werden nach Scatchard bestimmt. (Scatchard 1949)

**T<sub>4</sub>-Standard:**

2 mg/ml T<sub>4</sub> in Ethanol

Für alle Messungen wurde folgende Standard-Verdünnungsreihe hergestellt:

1.) 110 $\mu\text{l}$ T <sub>4</sub> Standard	+ 9.9 ml T-B	= 2500 fmol
2.) 4 ml aus 1.	+ 4.0 ml T-B	= 1250 fmol
3.) 4 ml aus 2.	+ 4.0 ml T-B	= 625 fmol
4.) 4 ml aus 3.	+ 4.0 ml T-B	= 313 fmol
5.) 4 ml aus 4.	+ 4.0 ml T-B	= 156 fmol
6.) 4 ml aus 5.	+ 4.0 ml T-B	= 78 fmol
7.) 4 ml aus 6.	+ 4.0 ml T-B	= 39 fmol

In von 1 bis 7 nummerierte Röhren wurden aus dieser Verdünnungsreihe je 50  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die Röhren 8 bis 10 wurden wie folgt besetzt:

- 8.) 50  $\mu\text{l}$  nur Lösung D = blank
- 9.) 50  $\mu\text{l}$  T-B = Nullwert (N)
- 10.) 50  $\mu\text{l}$  T-B = Totalwert (T, ohne Harz))

Die Verdünnung des Serums erfolgte zu einer Endkonzentration von 1:1000 (= Probenverdünnung): 11  $\mu\text{l}$  Serum + 11 ml Lösung C. Zur Kontrolle wurde stets die Verdünnung eines Normalserums mitgemessen.

In alle Röhrchen (1-10) wurde nun jeweils 1 ml der zu testenden Probenverdünnung gegeben. Die weitere Vorgehensweise entsprach nun dem einfachen  $T_4$ -Bindungstest mit Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur, 30 min. auf Eis. Anschließend Zugabe von Ionenaustauscherharz (nicht jedoch in die 10. Probe) und 2-minütiges Schütteln, Zugabe von je 2 ml eiskaltem  $H_2O$  dest., kurzes Aufschütteln. Jeweils 1 ml wurde abgenommen und im  $\square$ -Zähler gemessen (Murata, Refetoff *et al.* 1985).

### 6.3.3 Hitzedenaturierung

Das Ausmaß der Hitzedenaturierung wird durch Inkubation der Seren bei  $55^\circ C$  für unterschiedlich lange Zeit und Messung der verbleibenden  $T_4$ -Bindungskapazität bestimmt. Dazu erfolgt eine Inkubation der Proben im Wasserbad und Abnahme von Aliquots in 5- bzw. 10-minütigen Abständen. Die Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) der Denaturierung wird durch die Berechnung der Steigung der linearen Regression der semilogarithmischen Darstellung der verbleibenden  $T_4$ -Bindungskapazität nach der Zeit bestimmt und mit der eines menschlichen TBG-Normalserums verglichen.

Für die Verdünnung der Proben wird ein mit BSA angereicherter TB-Puffer benötigt:

- 50 ml TB-Puffer
- 50  $\mu$ l BSA (20 mg/ml)

Probenverdünnung: 10  $\mu$ l Serum + 490  $\mu$ l (TB + BSA)

Von jeder Probe wurden vor dem Erhitzen 50  $\mu$ l als Nullwert in 1 ml Lösung C gegeben und auf Eis gestellt. Dann wurden alle Proben (Menge entsprechend der gewünschten Meßpunkte) gleichzeitig in ein  $58^\circ C$  heißes

Wasserbad gestellt. In 5- bzw 10-minütigen Abständen wurden über 60 min je 50 µl davon abgenommen und in 1 ml Lösung C enthaltende Reagenzgläser überführt. Auch diese wurden bis zur Messung auf Eis gesetzt.

Die Messung der residualen T<sub>4</sub>-Bindung erfolgte mit dem T<sub>4</sub>-Bindungstest (s. Kap. 5.3.1)

#### **6.4 Mehrsprachige Liste der untersuchten Tierarten**

In dieser Liste ist in der Spalte „Quelle“ zudem die Herkunft des verwendeten Serums vermerkt. Dabei stehen die Kürzel für folgenden Institute oder Personen:

O = Labor Dr. med. Onno E. Janssen

Medizinische Klinik Innenstadt der LMU, Ziemssenstr. 1, 80336 München

R = Labor Christian Roos

Institut für Biochemie, Schillerstraße 42, 80336 München

S = Labor Samantha J. Richardson, Ph.D.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Melbourne, Parkville 3010, Victoria, Australia

C = Labor der Chirurgischen Klinik

Chirurgische Klinik Innenstadt der LMU, Nußbaumstr. 20, 80336 München

<b>Deutsch</b>	<b>Lateinisch</b>	<b>Englisch</b>	<b>Quelle</b>
Mensch	Homo sapiens sapiens	Human	O
Ameisenigel / Echidna	Tachyglossus aculeatus	Short Beaked Echidna	S
Amerikanisches Opossum	Didelphis virginiana	Common Opossum	S
Flachstachelnasebeutel	Echymipera kalubu	Kalubu Bandicoot	S
Spitzbeutelmaus	Antechinus stuartii	Brown Antechinus	S
Schmalfußbeutelmaus	Sminthopsis macroura	Common Donnat	S
Kurzschwanzkanguru	Setonix brachyurus	Quokka	S
Pademelon / Filander	Thylogale billardieri	Tasmanian Pademelon	S
Sumpfwallabie	Macropus eugenii	Tammar Wallaby	S
Lemur Katta	Lemur catta	Ring-tailed Lemur	R
Weißbüschelaffe	Callithrix jacchus	White Marmoset	R
Totenkopffaffe	Saimiri sciureus	Squirrel Monkey	R

Schwarzer Klammeraffe	Ateles fusciceps	Black Spider Monkey	R
Rhesusaffe	Macaca mulatta	Rhesus Monkey	R
Schweinsaffe	Macaca nemestrina	Pig-tailed Macaque	R
Mantelpavian	Papio hamadryas	Hamadryas Baboon	R
Mandrill	Mandrillus sphinx	Mandrill	R
Goldbauchmangabe	Cercocebus agilis	Agile Mangabey	R
Brazza-Meerkatze	Cercopithecus neglectus	DeBrazza's Monkey	R
Kappenlangur	Trachypithecus obscurus	Spectacled Langur	R
Siamang	Hylobates syndactylus	Siamang	R
Weißhandgibbon	Hylobates lar	White-handed Gibbon	R
Orang-Utan	Pongo pygmaeus abelii	Orang-Utan	R
Schimpanse	Pan troglodytes	Chimpanzee	R
Hausmaus	Mus musculus	Mouse	C
Wanderratte	Rattus norvegicus	Rat	O
Hauskaninchen	Oryctolagus cuniculus domesticus	European Rabbit	O
Braunbär	Ursus arctos arctos	Brown Bear	R
Wolf	Canis lupus	Wolf	R
Haushund	Canis lupus familiaris	Dog	O
Gepard	Acinonyx jubatus	Cheetah	R
Sibirischer Tiger	Panthera tigris altaica	Tiger	R
Hauskatze	Felis lybica catus	Cat	O
Indischer Elefant	Elephas maximus	Asian Elephant	R
Przewalski-Pferd	Equus przewalski	Przewalski Horse	R
Somalischer Wildesel	Equus africanus somalicus	African Wild Ass	R
Pferd	Equus przewalski caballus	Horse	O
Hausschwein	Sus scrofa domestica	Pig	O
Axishirsch	Cervus axis	Axis Deer	R
Nordelch	Alces alces	Elk	R
Dahomey-Rind	Bos primigenius dahomey	Dahomey Cattle	R
Husrind	Bos primigenius taurus	Cattle	O
Springbock	Antidorcas marsupialis	Springbok	R
Hirschziegentilope	Antilope cervicapra	Blackbuck	R
Hausziege	Capra aegagrus hircus	Goat	O
Zwergziege	Capra pygmaea	Pygmy Goat	R
Hausschaf	Ovis ammon aries	Sheep	O

**Tabelle 6: Mehrsprachige Liste der untersuchten Tierarten**

**6.5 Beispieltabelle für die Berechnung der relativen T4-Bindung**

Bezeichnung der Probe	Residuale T4-Bindung (cpm)	Relative T4-Bindung (% des humanen Kontrollserums)
Mensch	97459	100
Mensch (TBG-PD)	77967	80
Indischer Elefant	150087	154
Hausschwein	59450	61
Pferd	41907	43
Kurzschwanzkänguru	6823	7

**Tabelle 7: Berechnung der relativen T4-Bindung**

## 7. Literaturverzeichnis

Ain, K. B. and S. Refetoff (1988). "Relationship of oligosaccharide modification to the cause of serum thyroxine-binding globulin excess." J Clin Endocrinol Metab **66**(5): 1037-1043.

Ain, K. B., S. Refetoff, et al. (1988). "Effect of estrogen on the synthesis and secretion of thyroxine-binding globulin (TBG) by a human hepatoma cell line, Hep G2." Molecular Endocrinology **2**: 313-323.

Ain, K. B., M. Yuichi, et al. (1987). "Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen induced elevation of serum TBG- concentration." J Clin Endocrinol Metab **65**(4): 689-696.

Ashwell, G. and J. Harford (1982). "Carbohydrate-specific receptors of the liver." Annu. Rev. Biochem **51**: 531-554.

Astner, S. T., B. Treske, et al. (1997). Expression of thyroxine-binding globulin-Ser23Thr in *xenopus oocytes* confirms its isolated binding defect. 24th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Munich, Journal of Endocrinological Investigation.

Bardoff, W. (1964). "Der grosse Brehm Band I, Säugetiere erster Teil." Safari Verlag, Berlin

Bao, J., N. Sifers. et al. (1987). "Molecular evolution of serpins: Homologous structure of human  $\alpha$ I-antichymotrypsin and  $\alpha$ I-antitrypsin genes." Biochemistry **26**: 7755-7759.

Bartalena, L. (1990). "Recent achievements in studies on thyroid hormone-binding proteins." Endocrine Reviews **11**: 47-64.

Baumann, U., R. Huber, et al. (1991). "Crystal Structure of Cleaved Human  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin at 2.7 Å Resolution and its Comparison with other Serpins." Journal of Molecular Biology **218**: 595-606.

Behm, H.-W. (1964). "Der grosse Brehm Band II, Säugetiere zweiter Teil." Safari Verlag, Berlin

Beierwaltes, W. H. and J. Robbins (1959). "Familial increase in the thyroxine-binding sites in serum alpha globulin." Journal of Clinical Investigation **38**: 1683.

Benvenga, S. (1997). "A thyroid hormone binding motif is evolutionarily conserved in apolipoproteins." Thyroid **7**(4): 605-611.

Bertenshaw, R., D. Sarne, et al. (1992). "Sequencing of the variant thyroxine-binding globulin (TBG)-San Diego reveals two nucleotide substitutions." Biochimica et Biophysica Acta **1139**: 307-310.

Bhat, M. and H. Cama (1978). "Vitamin A and thyroxine carrier proteins in chicken plasma: steady-state control of the plasma level of free retinol-binding protein and free thyroxine." Biochim-Biophys-Acta **541**(2): 199-210.

Blundell, T. L., B. L. Sibanda, et al. (1987). "Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules." Nature **326**: 347.

Burr, W. A., D. B. Ramsden, et al. (1980). "Hereditary abnormalities of thyroxine-binding globulin concentration." Q J Med **49**: 295-313.

Büttner, C., B. Chen, et al. (1993). An additional glycosylation site within the putative ligand binding domain of thyroxine-binding globulin abolishes thyroxine binding. 67th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Orlando, FL, Thyroid.

Büttner, C., B. Treske, et al. (1994). Molecular modeling and site-directed mutagenesis of the ligand binding domain of thyroxine-binding globulin. 68th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Chicago, IL, Thyroid.

Carrell, R. W., P. A. Pemberton, et al. (1987). "The Serpins: Evolution and Adaptation in a Family of Protease Inhibitors." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **L II**: 527- 535.

Carvalho, G., R. Weiss, et al. (1998). "Complete deficiency of thyroxine-binding globulin (TBG-CD Buffalo) caused by a new nonsense mutation in the thyroxine-binding globulin gene." Thyroid **8**: 161-165.

Cavalieri, R. R. and e. al. (1981). "The effects of drugs on the distribution and metabolism of thyroid hormones." Pharmacol Rev. **33**(2): 55-80.

Cheng, S.-y., M. Stefania, et al. (1979). "Effect of deglycosylation on the binding and immunoreactivity of human thyroxine-binding globulin." J Biol Chem **254**(18): 8830-8835.

Copping, S. and P. G. H. Byfield (1988) "Thyroxine-binding globulin deficiency reexamined." Clinical Endocrinology **28**: 45-50..

Cvejic, D., S. Savin, et al. (1995). "Development of a bovine thyrotropin (TSH) radioimmunoassay and its application in thyroid function studies in cattle." Act Vet Beograd **45**(4): 198-201.



Daiger, S. P. and R. S. Wildin (1981). "Human thyroxine binding globulin (TBG): Heterogeneity within individuals and among individuals demonstrated by isoelectric focusing." Biochemical Genetics **19**: 673-685.

Davis, P., C. Laird, et al. (1974). "Binding of thyroid hormone in rabbit serum: definition of a prealbumin and effects of strain variation on binding." J-Endocrinol **63**(2): 389-98.

Dickson, P. W., A. R. Aldred, J. G. T. Menting, P. D. Marley, W. H. Sawyer, and G. Schreiber (1987). "Thyroxine transport in choroid plexus." J. Biol. Chem. **262**(29): 13907-13915.

Duan, W., S. Richardson, et al. (1995). "Evolution of transthyretin in marsupials." Eur-J-Biochem **227**(1-2): 396-406.

Ekins, R. P., A. K. Sinha, et al. (1994). "Transport of thyroid hormones to target tissues." Acta Med Austriaca **21**(2): 26.

Elliott, P. R., D. A. Lomas, et al. (1996). "Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin." Nat Struct Biol **3**(8): 676 - 681.

Emerson, C., C. Seiler, et al. (1993). "Gene expression and serum thyroxine-binding globulin are regulated by adrenal status and corticosterone in the rat." Endocrinology **133**(3): 1192-6.

Engh, R., H. Löbermann, et al. (1989). "The S-variant of human  $\alpha_1$ -antitrypsin, structure and implications for function and metabolism." Protein Engineering **2**: 407-415.

Flink, I. L., T. J. Bailey, et al. (1986). "Complete amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin deduced from cloned DNA: Close

homology to the serine antiproteases.” Proceedures of the National Academy of Sciences USA **83**: 7708-7712.

Gärtner, R., R. Henze, et al. (1981). “Thyroxine-binding globulin: Investigation of microheterogeneity.” J Clin Endocrinol Metab **52**: 657-664.

Gershengorn, M. C., S. Y. Cheng, et al. (1977). “Characterization of human thyroxine-binding globulin. Evidence for a single polypeptide chain.” Journal of Biological Chemistry **252**: 8713-8718.

Gershengorn, M. C., R. E. Lippoldt, et al. (1977). “Structure and stability of human thyroxine-binding globulin.” J Biol Chem **252**: 8719-8723.

Glennemeier, K. and P. Licht (1993). “Binding affinities of thyroxine-binding proteins in turtle plasma.” Gen-Comp-Endocrinol **90**(1): 78-86.

Glennemeier, K. and P. Licht (1993). “Comparative studies of thyroxine binding proteins in turtle plasma using column chromatography.” Gen-Comp-Endocrinol **89**(1): 119-31.

Goussis, O. S. and T. J. Theodoropoulos (1990). “Dilantin and salicylate effects on hepatic thyroxine bio-availability and dialyzable thyroxine.” Hormon Metabolism Research **22**(6): 342-344.

Grasberger, H. and O. Janssen (1999). “Modularity of serpins. A bifunctional chimera possessing alpha1-proteinase inhibitor and thyroxine-binding globulin.” J Biol Chem. **274**(21): 15046-51.

Grimaldi, S., H. Edelhoch, et al. (1982). “Effects of thyroxine binding on the stability, conformation, and fluorescence properties of thyroxine-binding globulin.” Biochemistry **21**: 145-150.

Hammond, G. L., C. L. Smith, et al. (1987). "Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors." Proceedures of the National Academy of Sciences USA **84**: 5153-5157.

Hillier, A. (1971). "The mechanism of thyroxine transfer from plasma to tissue binding sites." J Physiol **217**: 635-639.

Hocman, G. (1981). "Human thyroxine-binding globulin." Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology **81**: 45-88.

Huber, R. and R. W. Carrell (1989). "Implications of the three-dimensional structure of  $\alpha$ 1-antitrypsin for structure and function of the serpins." Biochemistry **28**: 8951-8966.

Hulbert, A. and P. Else (1989). "Evolution of mammalian endothermic metabolism: mitochondrial activity and cell composition." Am-J-Physiol **256**: R63-R69.

Hunt, L. T. and M. O. Dayhoff (1980). "A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and  $\alpha$ <sub>1</sub>-proteinase inhibitor." Biochemical and Biophysical Research Communications **95**: 864-871.

Imamura, S., Y. Mori, et al. (1991). "Molecular cloning and primary structure of rat thyroxine-binding globulin." Biochemistry **30**(22): 5406-5411.

Isojarvi, J. I., A. J. Pakarinen, et al. (1989). "Thyroid function in epileptic patients treated with carbamazepine." Archives of Neurology **46**(11): 1175-1178.

Janssen, O. E., R. Bertenshaw, et al. (1992). "Molecular Basis of Inherited Thyroxine-Binding Globulin Defects." Trends Endocrinol Metab **3**: 49-53.

Janssen, O. E., C. Büttner, et al. (1994). The new variant thyroxine-binding globulin-Houston has reduced thyroxine-binding affinity but normal concentration in serum. 76th Annual Meeting of the Endocrine Society, Anaheim, CA.

Janssen, O. E., B. Chen, et al. (1993). Sequence analysis and in-vitro expression of the heat-resistant variant thyroxine-binding globulin-Chicago. 75th Annual meeting of the Endocrine Society, Las Vegas, NV.

Janssen, O. E., B. Chen, et al. (1993). A subject expressing two different variants of thyroxine-binding globulin (TBG): Characterization of serum and in-vitro expressed heat-resistant TBG-Chicago and isoelectric focusing variant TBG-Slow. 21st Annual Meeting of the European Thyroid Association, Cardiff, G.B.

Janssen, O. E., B. Chen, et al. (1995). "Molecular and Structural Characterization of the Heat-resistant Thyroxine-binding Globulin-Chicago." The Journal of Biological Chemistry **270**(47): 28234-28238.

Janssen, O. E., F. Kambe, et al. (1992). The variant thyroxine-binding globulin-Gary (TBG<sup>Asn-96</sup>) has an additional carbohydrate chain that impairs its secretion. 36. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Erlangen, Deutschland.

Janssen, O. E. and S. Refetoff (1992). "In vitro expression of thyroxine-binding globulin (TBG) variants: Impaired secretion of TBG<sup>Pro-227</sup> but not TBG<sup>Pro-113</sup>." Journal of Biological Chemistry **267**: 13998-14004.

Janssen, O. E., K. Takeda, et al. (1991). "Sequence of the variant thyroxine-binding globulin (TBG) in a Montreal family with partial TBG deficiency." Hum Genet **87**: 119-122.

Jarvis, J., S. Munro, et al. (1992). "Homology model of thyroxine binding globulin and elucidation of the thyroid hormone binding site." Protein-Eng **5**(1): 61-7.

Jorgensen, E. C. (1978). Thyroid hormones and analogs: II. Structure-activity relationships. Hormonal proteins and peptides. L. W. New York, Academic Press. **6**: 107.

Kallee, E. and H. Ott (1992). Innere Medizin in Praxis und Klinik. New York, Georg Thieme Verlag.

Kambe, F., H. Seo, et al. (1988). "Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid coding for human thyroxine-binding globulin (TBG): existence of two TBG messenger ribonucleic acid species possessing different 3'-untranslated regions." Mol-Endocrinol **2**(2): 181-5.

Kambe, F., H. Seo, et al. (1992). "An Additional Carbohydrate Chain in the Variant Thyroxine-Binding Globulin-Gary (TBGAsn-96) Impairs its Secretion." Molecular Endocrinology **6**: 443-449.

Kreil, G. (1981). "Transfer of proteins across membranes." Annu-Rev-Biochem **50**: 317-348.

Kwieceński, G., D. Damassa, et al. (1991). "Patterns of plasma sex hormone-binding globulin, thyroxine and thyroxine-binding globulin in relation to reproductive state and hibernation in female little brown bats." J-Endocrinol **128**(1): 63-70.

Lahner, H. (2000). "Proteinbiochemische und Molekularbiologie Charakterisierung des Thyroxin-bindenden Globulins von Rind und Schwein."

L Lahner, H., Spring, S. A. et al (1998). "Characterization of the bovine thyroxine-binding globulin gene." 80<sup>th</sup> Annual Meeting of The Endocrine Society, 24.-27.06. 1998, New Orleans.

Lahner, H., O. Janssen, et al. (1998). "Primary Structure of Pig Thyroxine-binding Globulin and Characterization of the Protein." 25th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Athen.

Larsson, M., T. Pettersson, et al. (1985). "Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs." Gen-Comp-Endocrinol **58**(3): 360-75.

Licht, P. (1994). "Thyroxine-binding protein represents the major vitamin D-binding protein in the plasma of the turtle, *Trachemys scripta*." Gen-Comp-Endocrinol **93**(1): 82-92.

Licht, P., R. Denver, et al. (1991). "Comparative survey of blood thyroxine binding proteins in turtles." J-Exp-Zool **259**(1): 43-52.

Liebhaber, S. A. and Y. W. Kan (1983). "α<sub>2</sub>-Thalassemia caused by an unstable α<sub>2</sub>-globulin mutant." Journal of Clinical Investigation **71**: 461-465.

Lim, C. F., A. J. Curtis, et al. (1991). "Interactions between oleic acid and drug competitors influence specific binding of thyroxine in serum." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **73**(5): 1106-1110.

Löbermann, H., R. Tokuoka, et al. (1984). "Human α<sub>1</sub>-proteinase inhibitor." Journal of Molecular Biology **177**: 531-556.

Loebermann, H., R. Tokuoka, et al. (1984). "Human  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor." Journal of Molecular Biology **177**: 531-556.

Luckett, W. P., J.-L. Hartenberger (eds.): Evolutionary relationships among Rodents. A multidisciplinary analysis. Nato ASI series, Life Sciences. New York / London (Plenum Press) 1984.

Marshall, J. S., R. P. Levy, et al. (1966). "Human thyroxine-binding globulin deficiency: A genetic study." N Engl J Med **274**: 1469-1473.

Marshall, J. S. and J. Pensky (1971). "Studies on thyroxine-binding globulin (TBG). III. Some physical characteristics of TBG and its interaction with thyroxine." Arch Biochem Biophys **146**: 76.

Mendel, C., Weisiger RA, Cavalieri RR (1988). "Uptake of 3,5,3'-triiodothyronine by the perfused rat Liver: return to the free Hormone hypothesis." Endocrinology **123**(4): 1817-24.

Mendel, C., R. Cavalieri, et al. (1989). "Thyroxine transport and distribution in Nagase analbuminemic rats." J-Clin-Invest **83**: 143-148.

Mendel, C. M., R. A. Weisinger, et al. (1987). "Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: A perfused rat liver study." Endocrinology **120**: 1742-1749.

Miura, Y., Y. Mori, et al. (1994). "Impaired Intracellular Transport Contributes to Partial Thyroxine-Binding Globulin Deficiency in a Japanese Family." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **79**: 740-744.

Miura, Y., Y. Mori, et al. (1993). "Sequence of the variant thyroxine-binding globulin (TBG) in a family with partial TBG deficiency in Japanese (TBG-PDJ)." Endocrinology Japonica **40**: 127-132.

Moloshok, R. E., L. Y. F. Hsu, et al. (1969). "Partial thyroxine-binding globulin deficiency in a family." Pediatr **44**: 518-525.

Mori, Y., Y. Miura, et al. (1995). "Precise localization of the human thyroxine-binding globulin gene to chromosome Xq22.2 by fluorescence in situ hybridization." Hum Genet **96**: 481-482.

Mori, Y., Y. Miura, et al. (1995). "Gene amplification as a cause for inherited thyroxine-binding globulin excess in two Japanese families." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **80**: 3758-3762.

Mori, Y., S. Refetoff, et al. (1988). "Detection of the thyroxine-binding globulin (TBG) gene in six unrelated families with complete TBG deficiency." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **67**: 727-733.

Mori, Y., S. Seino, et al. (1989). "A mutation causing reduced biological activity and stability of thyroxine-binding globulin probably as a result of abnormal glycosylation of the molecule." Molecular Endocrinology **3**: 575-579.

Munro, S. L., C. F. Lim, et al. (1989). "Drug competition for thyroxine binding to transthyretin (prealbumin): comparison with effects on thyroxine-binding globulin." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **68**(6): 1141-1147.



Murata, Y., J. Magner, et al. (1986). "The role of glycosylation in the molecular conformation and secretion of thyroxine-binding globulin." Endocrinology **118**(4): 1614-21.

Murata, Y., S. Refetoff, et al. (1985). "Variant thyroxine-binding globulin in serum of Australian Aborigines: Its physical, chemical and biological properties." Journal of Endocrinological Investigation **8**: 225-232.

Murata, Y., J. Takamatsu, et al. (1986). "Inherited abnormality of thyroxine-binding globulin with no demonstrable thyroxine-binding activity and high serum levels of denatured thyroxine-binding globulin." New England Journal of Medicine **314**: 694-699.

Nicoloff, J. T., J. T. Dowling, et al. (1964). "Inheritance of decreased thyroxine-binding by the thyroxine-binding globulin." J Clin Endocrinol Metab **24**: 294-298.

Nikolai, T. F. and U. S. Seal (1966). "X-chromosome linked familial decrease in thyroxine-binding globulin deficiency." J Clin Endocrinol Metab **25**: 835-841.

Nilsson, S. and P. Peterson (1975). "Studies on thyroid hormone-binding proteins. I. The subunit structure of human thyroxine-binding globulin and its interaction with ligands." J-Biol-Chem **250**(21): 8543-53.

Nusynowitz, M. L., R. F. Clark, et al. (1971). "Thyroxine-binding globulin deficiency in three families and total deficiency in a normal woman." Am J Med **50**: 458-464.

Oppenheimer, J. H. (1968). "Role of plasma proteins in the binding, distribution, and metabolism of the thyroid hormones." N Engl J Med **278**: 1153-1162.

Owen, M. C., S. O. Brennan, et al. (1983). "Mutation of antitrypsin to antithrombin;  $\alpha$ 1-Antitrypsin Pittsburgh (358 Met->Arg), a fatal bleeding disorder." New Engl. J. Med **309**: 694-698.

Pavgi, S. and P. Licht (1992). "Measurement of plasma thyroxin binding protein in relation to thyroidal condition in the turtle, *Trachemys scripta*, by radioimmunoassay." General and Comparative Endocrinology **85**: 147-155.

Pemberton, P., P. Stein, et al. (1988). "Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation." Nature **336**(6196): 257-8.

Peters, T. (1985). "Serum Albumin." Advances in Protein Chemistry **37**: 161-245.

Refetoff, S. (1989). "Inherited Thyroxine-Binding Globulin Abnormalities in Man." Endocrine Reviews **10**: 143-161.

Refetoff, S., V. S. Fang, et al. (1975). "Studies on human thyroxine-binding globulin (TBG): IX. Some physical, chemical, and biological properties of radioiodinated TBG and partially desialylated TBG." Journal of Clinical Investigation **56**: 177-187.

Refetoff, S. and P. R. Larsen (1989). Transport, cellular uptake and metabolism of thyroid hormone (Chapter 38). Endocrinology. L. J. DeGroot. Philadelphia, W.B. Saunders. Second Edition: 541-561.

Refetoff, S. and Y. Murata (1985). "X-chromosome-linked inheritance of the variant thyroxine-binding globulin in serum of Australian Aborigines: Its physical, chemical and biological properties." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **60**: 356-360.

Refetoff, S., Y. Murata, et al. (1996). "Thyroxine-Binding Globulin: Organization of the Gene and Variants." Horm Res **45**: 128-138.

Refetoff, S., N. Robin, et al. (1970). "Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: a study of PBI, serum T4, free T4, and the pattern of T4 and T3 binding to serum proteins." Endocrinology **86**(4): 793-805.

Refetoff, S., N. I. Robin, et al. (1972). "Study of four new kindreds with inherited thyroxine-binding globulin abnormalities: Possible mutations of a single gene locus." J Clin Invest **51**: 848-867.

Refetoff, S. and H. A. Selenkow (1968). "Familial thyroxine-binding globulin deficiency in a patient with Turner's syndrome (X0): Genetic study of a kindred." New England Journal of Medicine **278**: 1081-1087.

Refetoff, S., M. Yoshiharu, et al. (1984). "Radioimmunoassays specific for the tertiary and primary structures of thyroxine-binding globulin (TBG): measurement of denatured TBG in serum." J Clin Endocrinol Metab **59**(2): 269-277.

Richardson, S. J., A. J. Bradley, et al. (1994). "Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins." American Journal of Physiology **266**: R1359-R1370.

Robbins, J. (1996). Thyroid Hormone Transport Proteins and the Physiology of Hormone Binding. Werner and Ingbar's The Thyroid. R. D. U. Lewis E. Braverman. Philadelphia, Lippincott-Raven. Chapter 6: 96 - 110.

Robbins, J., S. Y. Cheng, et al. (1978). "Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis." Rec Prog Horm Res **84**: 477-518.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-491.

Sarne, D. H., S. Refetoff, et al. (1989). "A new inherited abnormality of thyroxine-binding globulin (TBG-San Diego) with decreased affinity for thyroxine and triiodothyronine." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **68**: 114-119.

Savu, L., R. Vranckx, et al. (1991). "A senescence up-regulated protein: the rat thyroxine-binding globulin (TBG)." Biochim-Biophys-Acta **1097**(1): 19-22.

Scatchard, G. (1949). "The attractions of proteins for small molecules and ions." Ann NY Acad Sci **51**: 660-672.

Schreiber, G. and S. Richardson (1997). "The Evolution of Gene Expression, Structure and Function of Transthyretin." Comp-Biochem-Physiol **116B**(2): 137-160.

Schulze, A., U. Baumann, et al. (1990). "Structural transition of  $\alpha_1$ -antitrypsin by a peptide sequentially similar to  $\beta$ -strand s4A." European Journal of Biochemistry **194**: 51-56.

Schulze, A. J., R. Huber, et al. (1994). "Structural aspects of serpin inhibition." FEBS Letters **344**: 117-124.

Seo, H., M. Ando, et al. (1989). "Plasma thyroxine-binding proteins and thyroid hormone levels in primate species; is callithricidae thyroid hormone resistant?" Endocrinol-Jpn **36**(5): 665-73.

Seo, H., K. Sueda, et al. (1983). Translation of human thyroxine-binding globulin (TBG) messenger RNA in a cell free protein synthesizing system. Current Problems in Thyroid Research, Proceedings of the Second Asia and Oceania Thyroid Association Meeting. N. Vi, K. Torizuka, S. Nagataki and K. Miyai. Amsterdam, Excerpta Medica: 127-130.

Siegel, J. S., L. Korcek, et al. (1979). "Modification of Thyroxine-Binding Globulin with p-Iodophenylsulfonyl (pipsyl) chloride and Effect on Thyroxine Binding Activity." FEBS Letters **102**: 306-310.

Silhavy, T. J., S. A. Benson, et al. (1983). "Mechanisms of protein localization." Microbiol-Rev **47**(3): 313-344.

Skjoldebrand, L., J. Brundin, et al. (1986). "Thyroxine-binding globulin in spontaneous abortion." Gynecol-Obstet-Invest **21**(4): 187-92.

Snyder, S. M., R. R. Cavalieri, et al. (1976). "Binding of thyroid hormones and their analogues to thyroxine-binding globulin in human serum." Journal of Biological Chemistry **251**: 6489-6494.

Starck, D. (1995). "Lehrbuch der speziellen Zoologie Bd.2 Wirbeltiere / Teil 5. Säugetiere von D. Starck; 5/1: Allgemeines, Ordo 1-9." Gustav Fischer Verlag, Jena

Starck, D. (1995). "Lehrbuch der speziellen Zoologie Bd.2 Wirbeltiere / Teil 5. Säugetiere von D. Starck; 5/2: Ordo 10-30, Haustiere, Literatur, Register." Gustav Fischer Verlag, Jena

Stein, P. E., A. G. W. Leslie, et al. (1990). "Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins." Nature **347**: 99-102.

Sunthornthepvarakul, T., P. Angkeow, et al. (1994). "An identical missense mutation in the albumin gene results in familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia in 8 unrelated families." Biochemical and Biophysical Research Communications **202**: 781-787.

Sykes, B. (1983). "DNA in heritable disease." The Lancet **ii**: 787-788.

Tabachnik, M. and V. Perret (1987). "Specific Labeling of the Thyroxine Binding Site in Thyroxine-Binding Globulin: Determination of the Amino Acid Composition of a Labeled Peptide Fragment Isolated from a Proteolytic Digest of the Derivatized Protein." Biochemistry International **15(2)**: 409-417.

Takamatsu, J., M. Ando, et al. (1986). "Isoelectric focusing variant thyroxine-binding globulin in American Blacks: Increased heat lability and reduced serum concentration." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **63**: 80-87.

Takamatsu, J. and S. Refetoff (1986). "Inherited heat-stable variant thyroxine-binding globulin (TBG-Chicago)." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **63**: 1140-1144.

Takamatsu, J., S. Refetoff, et al. (1987). "Two new inherited defects of the thyroxine-binding globulin (TBG) molecule presenting as partial TBG deficiency." Journal of Clinical Investigation **79**: 833-840.

Takeda, K., Y. Mori, et al. (1989). "Sequence of the variant thyroxine-binding globulin of Australian Aborigines: Only one of two amino acid

replacements is responsible for its altered properties.” Journal of Clinical Investigation **83**: 1344-1348.

Takemura, Y., H. G., et al. (1971). “Thermal stability of serum thyroxine-binding proteins.” J Clin Endocrinol Metab **32**: 222-224.

Tata, J. R. (1960). “Biochemical applications of a newly discovered property of thyroxine.” Ann. N. Y. Acad. Sci. **86**: 469-483.

Travis, J., A. Guzdek, et al. (1990). “Serpins: Structure and mechanism of action.” Biology and Chemistry Hoppe-Seyler **371**(Suppl.): 3-11.

Trent, J. M., I. L. Flink, et al. (1987). “Localization of the human thyroxine-binding globulin gene to the long arm of the X chromosome (Xq21-22).” Am J Hum Genet **41**: 428-435.

Tsykin, A. and G. Schreiber (1993). “Sheep thyroxine-binding globulin: cDNA sequence and expression.” Mol-Cell-Endocrinol **98**(1): 91-7.

Ulrich, K. (1990). "Vergleichende Biochemie der Tiere." Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Usala, S. J., G. E. Tennyson, et al. (1990). “A base mutation in the c-erb A $\beta$  thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance.” Journal of Clinical Investigation **85**: 93-100.

van der Walt, B. and P. van Jaarsveld (1978). “Bovine Thyroxine-Binding Globulin: purification and comparison of molecular weight and amino acid composition with human thyroxine-binding globulin.” Biochimica et Biophysica Acta **535**: 44-53.

Vranckx, R., M. Rouaze, et al. (1990). “The Hepatic Biosynthesis of Rat Thyroxine Binding Globulin (TBG): Demonstration, Ontogenesis, and Up-

Regulation in Experimental Hypothyroidism.” Biochemical and Biophysical Research Communications **167**(1): 317-322.

Vranckx, R., L. Savu, et al. (1990). “Characterization of a major development-regulated serum thyroxine-binding globulin in the euthyroid mouse.” Biochem-J **271**: 373-379.

Wagner, S. and O. Janssen “Glykosylierungen des Thyroxin-bindenden Globulins.” unveröffentlicht.

Waltz, M. R., T. N. Pullman, et al. (1990). “Molecular basis for the properties of the thyroxine-binding globulin-slow variant in American Blacks.” Journal of Endocrinological Investigation **13**: 343-349.

Weiss, R., Y. Mori, et al. (1989). “Sequence of the human thyroxine-binding globulin (TBG) gene and its structural homology to the serpin superfamily.” Clinical Research **37**: 536A.

Wenzel, K. W. (1981). “Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function.” Metabolism **30**: 717-732.

Wright, H. T., H. X. Quian, et al. (1990). “Crystal Structure of Plakalbumin, a Proteolytically Nicked Form of Ovalbumin.” Journal of Molecular Biology **213**: 513-528.

Yamamori, I., Y. Mori, et al. (1991). “Nucleotide deletion resulting in frameshift as a possible cause of complete thyroxine-binding globulin deficiency in six Japanese families.” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **73**: 262-267.



Zinn, A. B., J. S. Marshall, et al. (1978). "Carbohydrate structures of thyroxine-binding globulin and their effects on hepatocyte membrane binding." J Biol Chem **253**: 6768-6773.

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Gärtner danke ich sehr für die Übernahme der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. h.c. P.C. Scriba danke ich für die anfängliche Übernahme der Arbeit und die Möglichkeit, sie an der Medizinischen Klinik des Klinikums Innenstadt der LMU durchführen zu können.

Herrn Dr. med. Onno Eilard Janssen gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und für die kompetente und engagierte Betreuung. Gerade sein persönliches Engagement für seine Arbeitsgruppe war unerlässlich für die Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Christian Roos vom Institut für Genetik danke ich für die Überlassung zahlreicher Blutproben von teilweise ausgefallenen Spezies.

Herrn Harald Lahner und Herrn Helmut Grasberger gilt mein Dank für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe.

Frau Sofia Wachter danke ich für die kompetente Hilfe bei der Erstellung von Präsentationen und Graphiken für die Kongresspräsentation.

Außerdem danke ich allen anderen Kollegen und Freunden, die mich bei dieser Promotion mit fachlichem oder menschlichem Rat unterstützt haben.

## 9. Lebenslauf

Name	Joerg Sebastian Schelling
Geburtsdatum	25.09.1972
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Konfession	Evangelisch
Eltern	Gisela Brigitte Schelling, geb. Meyer Dr. med. Ulf Hans-Fritz Schelling
Schulbildung	1979 – 1983 Grundschule Lochham 1983 – 1992 Kurt-Huber-Gymnasium Gräfelfing
Studium	1992 – 1993 Studium der Geschichte, Nordistik und Japanologie an der LMU München 1993 – 2000 Studium der Humanmedizin an der LMU München 2000 3. Staatsexamen in München, Teilapprobation 2001 Beginn der Tätigkeit als Arzt im Praktikum an der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU