

Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Experimentelle Endokrinologie

Interferenzen endokrin aktiver Substanzen mit der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biologin Inka Gotthardt, geb. Hamann

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter

Prof. Dr. Werner Kloas

Prof. Dr. Josef Köhrle

Prof. Dr. Hubertus Jarry

Datum der mündlichen Prüfung: 30.06.2009

Zusammenfassung

Endokrin aktive Substanzen (EACs) sind exogene Substanzen natürlichen oder synthetischen Ursprungs, die mit der Feedbackregulation hormoneller Netzwerke interferieren können und somit deren Homöostase beeinflussen. Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse (HPT-Achse) haben weitreichende Konsequenzen, da Schilddrüsenhormone essentiell für die Regulation von Entwicklung, Wachstum und Stoffwechsel sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wirkprofil potenter Inhibitoren der thyreotropen Achse am Beispiel von 4-Methylbenzyliden-campher (4-MBC) und Genistein (GEN) untersucht. Der UV-Filter 4-MBC wurde in der ovariectomierten Ratte als goitrogene Substanz identifiziert. 4-MBC interferiert auf Ebene von Hypothalamus und Hypophyse mit der Expression Feedback-assoziiierter Gene und beeinflusst daher die Feedbackregulation der thyreotropen Achse. Darüber hinaus wird die Biosynthese von Schilddrüsenhormonen durch Inhibition des Iodidtransports bei gleichzeitig erhöhter *messenger* RNA (mRNA)-Konzentration des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) durch 4-MBC beeinträchtigt. Parallel dazu lässt die verstärkte Expression des Angiogenesemarkers *vascular endothelial growth factor* (VEGF) nach subakuter Exposition auf die Entstehung einer Hypothyreose schließen. Die damit einhergehenden Veränderungen sind auch in peripheren Organen durch die Analyse 3,3',5-Triiod-L-thyronin (T_3)-regulierter Zielgene dokumentiert. Zudem wurden diese Effekte maßgeblich durch die Expositionszeit beeinflusst, da nach chronischer Exposition vermutlich auch kompensatorische Prozesse eine wichtige Rolle spielen. Die gezeigten speziesspezifischen Effekte lassen sich möglicherweise auf Unterschiede in der Pharmakokinetik zurückführen, z.B. in Folge differentieller Expression von Cytochrom P450-Genen. Die mechanistische Analyse des Wirkprofils von GEN, das unter anderem in Soja und Rotklee enthalten ist, erfolgte in Schilddrüsenhormonrezeptor (TR)-defizienten Mäusen ($TR\alpha^{0/0}$). Abhängig vom Geschlecht konnten gewebespezifische Effekte von GEN nachgewiesen werden, die aber keinem offensichtlichen Muster folgten und somit weiterführende Untersuchungen erfordern.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass EASs in Konzentrationen, die bislang als unbedenklich eingestuft wurden, sowohl die Funktion als auch die Regulation der HPT-Achse beeinträchtigen.

Endokrin aktive Substanz (EAC)

UV-Filter

4-Methylbenzyliden-campher (4-MBC)

Soja

(Iso-)Flavonoide

Genistein (GEN)

F21388

Schilddrüse

5'-Deiodasen

Natrium-Iodid-Symporter (NIS)

Summary

Endocrine active compounds (EACs) can be of natural or synthetic origin and show hormone-like effects that interfere with feedback regulation of hormonal networks. Interferences with the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (HPT-axis) result in extensive consequences as thyroid hormones are essential for regulation of development, growth, and metabolism.

In the work presented here, the active profile of potent inhibitors of the HPT-axis namely 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC) and genistein (GEN) was investigated. 4-MBC, a UV filter used in sunscreens and various cosmetics, was identified as a goiter causing agent using ovariectomized rats. 4-MBC acts at the level of hypothalamus and pituitary gland by modulating the expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) as well as thyroid-stimulating hormone (TSH) that regulate feedback on the HPT-axis. Furthermore, biosynthesis of thyroid hormones was impaired by 4-MBC secondary to the inhibition of iodide transport with concomitantly increased *messenger* RNA (mRNA)-levels of the sodium-iodide symporter (NIS). In parallel expression of the angiogenesis marker vascular endothelial growth factor (VEGF) was increased, indicating hypothyroidism. After the application of 4-MBC the expression of L-3,3',5-triiodothyronine (T₃)-regulated target genes was reduced in the periphery both on the mRNA and protein level. The documented species-specific effects indicate a difference in pharmacokinetics, possibly secondary to differential expression of cytochrome P450 genes. GEN is contained in soy and red clover and its mechanistic analysis was carried out in thyroid hormone receptor (TR) deficient mice (TR $\alpha^{0/0}$). The gender-dependent effects of GEN on tissue specificity did not follow an obvious pattern and warrant continuative analysis.

The work presented here supports the assumption that EACs can interfere with function and regulation of the HPT-axis at levels that were previously considered safe.

endocrine active compound (EAC)

UV filter

4-Methylbenzylidene-camphor (4-MBC)

Soy

(iso-)flavonoids

genistein (GEN)

F21388

thyroid gland

5'-deiodinases

sodium-iodide symporter (NIS)



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin angefertigt und durch die Europäische Union im Rahmen des Projektes „EURISKED - Multi-organic Risk Assessment of selected Endocrine Disrupters“ (Grant-Nr. EKV1-CT-2002-00128) sowie durch ein Promotionsstipendium der Charité - Universitätsmedizin Berlin gefördert.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Köhrle nicht zuletzt für die Bereitstellung des interessanten und vielschichtigen Themas meiner Dissertation, sondern vor allem für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die konstruktiven Diskussionen im Verlauf meiner Doktorarbeit am Institut für Experimentelle Endokrinologie. Weiterhin möchte ich mich auch für die zahlreichen Gelegenheiten, an nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen zu können ganz herzlich bedanken. Herrn Prof. Dr. H. Jarry und Herrn Prof. Dr. W. Wuttke der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen danke ich ganz herzlich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts „EURISKED“ sowie für die stete Unterstützung in fachlichen Angelegenheiten und die nette Kommunikation rund um das Thema „Endokrin aktive Substanzen“. Herrn Prof. Dr. J. Samarut und Dr. K. Gauthier, École normale supérieure in Lyon danke ich für die Bereitstellung der TR $\alpha^{0/0}$ -Mäuse. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Klein vom „Centre Hospitalier et Universitaire“ in Nancy und Herrn Dr. R. Sapin vom „Hôpital Civil“ in Straßburg für die Durchführung der Serumanalysen bedanken. Herrn Dr. L. Malendowicz vom „Department of Histology and Embryology“ der Universität Poznan danke ich für die Durchführung der morphometrischen Analysen der Schilddrüsen.

Bei Frau PD Dr. F. Götz bedanke ich mich für ihre große Hilfe bei der Erstellung meines ersten Tierversuchsantrags und ihre kompetente und freundliche Unterstützung bei der anschließenden Durchführung. Bei Frau R. Großklaus, Frau K. Huhne und Frau J. Merz bedanke ich mich für die große Unterstützung bei der Durchführung von Histologien, qPCRs und Western blots. Für das stete Interesse an meiner Arbeit, die konstruktiven Vorschläge und die kritische Durchsicht dieses Manuskripts bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. L. Schomburg und Herrn Dr. U. Schweizer auf das Herzlichste. Für die Korrektur der Arbeit möchte ich mich herzlich bei Dipl.-Biol. T. Endermann und Dipl.-Biol. E. Wirth bedanken. Mein besonderer Dank gilt außerdem allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die schöne Zeit im Labor, wobei ich namentlich Dr. P. Hofmann, Dr. M. Michaelis, Dipl.-Ing. K. Renko, Dipl.-Ing. S. Roth, Dipl.-Biol. J. Chiu und insbesondere Dipl.-Biol. E. Wirth hervorheben möchte. Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre moralische Unterstützung aufs Herzlichste. Abschließend möchte ich mich bei meinem Ehemann Michael Gotthardt für sein unendliches Verständnis und seine stete Motivation bedanken...

Abkürzungsverzeichnis

“	Zoll	Ci	Curie
∅	Durchmesser	CoA	Koaktivator (co-activator)
%	Prozent	CoR	Korepressor (co-repressor)
°C	Grad Celsius	cpm	counts per minute
129S2/Sv	Inzuchtmausstamm	CREBP	cAMP response element binding protein
4-MBC	4-Methylbenzyliden-campher	C _T	threshold cycle
5SrRNA	5S -Untereinheit der ribosomalen RNA	Cyp2a	unspezifische Monooxygenase
5.8SrRNA	5.8S -Untereinheit der ribosomalen RNA	Cyp2b	unspezifische Monooxygenase
6H-	6 Hormon-	Cyp3a	unspezifische Monooxygenase
18SrRNA	18S -Untereinheit der ribosomalen RNA	Cyp7	Cholesterin-7 α -Hydroxylase
28SrRNA	28S -Untereinheit der ribosomalen RNA	Δ	Änderung
α Gsu/aGsu	α -Glykoprotein-Untereinheit (α-glycoprotein subunit)	d	Schichtdicke
α -MSH	α-melanocyte stimulating hormone	d	Tag(e) (day)
α V β 3	Integrin	Da	Dalton
A	Ampere	DAB	3,3'- Diaminobenzidin
Abb.	Abbildung	DAD	deacetylase activating donor
AC	Adenylatcyclase	DBD	DNA-Bindungsdomäne
ADI	acceptable daily intake	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
AF	Aktivierungsfunktion	ddNTP	Didesoxyribonukleosid-triphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat	DEPC	Diethylpyrocarbonat
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)	DEHAL	Dehalogenase
ApoA-1	Apolipoprotein A-1	DIO1/Dio1	Deiodase Typ 1
APS	Ammoniumpersulfat	DIO2/Dio2	Deiodase Typ 2
AR	Androgenrezeptor	DIO3	Deiodase Typ 3
ATP	Adenosintriphosphat	DIT	Diiodtyrosin
bp	Basenpaar(e)	DMSO	Dimethylsulfoxid
BP-2	Benzophenon-2	DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
BPA	Bisphenol A	dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)	DRIP	vitamin D receptor interacting protein
BTEB	basic transcription element-binding protein	dsDNA	doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
Bu2cAMP	Dibutyl-cAMP	DTT	Dithiothreitol
b.w.	Körpergewicht (body weight)	DUOX/Duox	Thyrooxidase
c	Konzentration (concentration)	ϵ_{λ}	molarer Extinktionskoeffizient
C57BL/6	Inzuchtmausstamm	E	Effizienz
cAMP	zyklisches AMP (cyclic AMP)	E λ	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
CBP/p300	CREB binding protein	E ₂	17 β -Estradiol-3-benzoat
CCR	Center for Cardiovascular Research	E ₂ B	17 β -Estradiol-3-benzoat
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)	E ₂ V	17 β -Estradiol-valerat
c-erbA	cellular homolog of the avian erythroblastosis virus , TR α 2	EAC	endokrin aktive Substanz (endocrine active compound)
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation	<i>E. coli</i>	Escherichia coli

Abkürzungsverzeichnis

ECL	enhanced chemiluminescence	Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ED	Endokrine Disruptoren	hnRNPA1	<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	HPG	Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse (<i>hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i>)
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>	HPT	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse (<i>hypothalamic-pituitary-thyroid axis</i>)
eNOS	<i>endothelial NO synthase</i>	Hprt	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
ENS	<i>École normale supérieure de Lyon</i>	HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ER	Östrogenrezeptor (<i>estrogen receptor</i>)	hrTPO	<i>human recombinant TPO</i>
EtBr	Ethidiumbromid	IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
EtOH	Ethanol	IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
EU	Europäische Union	IgG	Immunglobulin G
EURISKED	<i>Multi-organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disrupters</i>	IHC	Immunhistochemie
ExpASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>	IL/II	Interleukin
f	vorwärts (<i>forward</i>)	INF	Interferon
F1	Filialgeneration	i.p.	intraperitoneal
F12	<i>Ham's Nutrient Mixture F-12</i>	IVC	<i>individually ventilated cages</i>
F21388	synthetisches Flavonoid	K _a	Assoziationskonstante
FBS	fötale Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)	kb	Kilobase(n)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Kdr	<i>kinase insert domain receptor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>	λ	Wellenlänge
Fit1	<i>FMS-related tyrosine kinase 1</i>	LB	Luria-Broth Medium
FRTL-5	<i>Fischer rat thyroid low Serum</i>	LBD	Liganden-Bindungsdomäne
FSH/Fshb	Follikel-stimulierendes Hormon	LDL	<i>low density lipoprotein</i>
FT ₃	freies T ₃	LH/Lhb	Luteinisierendes Hormon
FT ₄	freies T ₄	LPS	Lipopolysaccharid
g	Gramm	LSAB	<i>labeled (strept-)avidin-biotin</i>
G	G-Protein reguliertes Protein	LT ₄	Levothyroxin
GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>	M	Molar
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
GC	Guanin-Cytosin-Gehalt von Primern	MCF-7	Brustkrebszelllinie (MCF = <i>Michigan Cancer Foundation</i>)
GEN	Genistein	MBH	mediobasaler Hypothalamus
GH/Gh	Wachstumshormon (<i>growth hormone</i>)	MCT	Monocarboxylattransporter
Glut-4	Glucosetransporter Typ 4	ME1/Me1	Malatenzym (<i>malic enzyme 1</i>)
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon	MGI	<i>Mouse Genome Informatics</i>
GTC	Guanidinisothiocyanat	mGPD/mGpd2	mitochondriale Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n) (<i>hour</i>)	MHC/Myh	<i>myosin heavy chain</i>
H ₂ O bidest.	H ₂ O bidestillata	min	Minute(n) (<i>minute</i>)
hCG	humanes Chorion Gonadotropin	MIT	Monoiodtyrosin
HDAC	Histondeacetylase	MMI	Methimazol
HDL	<i>high density lipoprotein</i>	MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin	MOPS	3-(N-morpholino) Propansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger-RNA	r	rückwärts (<i>reverse</i>)
ms	Millisekunde	R	mittlerer Expressionsunterschied
Mt2	Metallothionein-2	R ²	Korrelationskoeffizient
MW	Mittelwert	RA	Retinsäure (<i>retinoic acid</i>)
n	Stoffmenge	RAR	Retinsäurerezeptor
N	normal	REACH	Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals
NADP(H)	Nikotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat	REST MSC	Relative Expression Software Tool Multiple Condition Solver
NCBI	National Center for Biotechnology Information	RGD	Rat Genome Database
N-Cor	nuclear receptor corepressor	RIA	Radioimmunoassay
NIS/Nis	Natrium-Iodid-Symporter	RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal	RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
NR	nukleärer Rezeptor	rT ₃	3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
OATP	organic anion transporter polypeptide	RT	Raumtemperatur
OECD	Organization for Economic Co-operation & Development	RT-PCR	revers transkribierte PCR
OMC	Octyl-Methoxycinamat	RXR	Retinsäure-X-Rezeptor
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	SB	sodium boric acid
OVX	Ovariectomie	s.c.	subkutan
PAX	paired box gene	SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
PBS	phosphate buffered saline	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
PC/Pcsk	Prohormon-Konvertase (<i>prohormone convertase</i>)	SE α_2	splicing enhancer element α_2
pCAF	p300/CBP-associated factor	SECIS	selenocysteine insertion sequence
PCB	polychlorierte Bephenyle	SERCA	Ca ²⁺ ATPase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
PEPCK	Phosphoenolpyruvat- Carboxykinase	SF2	splicing factor 2
PFA	Paraformaldehyd	SGLT-1	sodium glucose transporter-1
PIA	A1-adenosine receptor agonist	Slc26a4	Pendrin (<i>solute carrier family 26, member 4</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid receptors
PIT-1/Pit1	pituitary transcription factor 1	SRC-1	steroid receptor coactivator-1
PKA	Proteinkinase A	ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
PLC	Phospholipase C	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
POMC/Pomc2	Proopiomelanocortin	SULT/Sult	Sulfotransferase
POP	persistant organic pollutants	t	Reaktionszeit (<i>time</i>)
PPAR	peroxysome proliferator activating receptor	T ₀	L-Thyronin
PR	Progesteronrezeptor	T ₁	Monoiod-L-Thyronin
PRL/PrI	Prolaktin	T ₂	3,3',5'-Diod-L-Thyronin
pS2	human trefoil peptide	T ₃	3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
PTU	6-n-Propyl-2-thiouracil	T ₄	3,3',5,5'-Tetraiod-L-Thyronin
p-Wert	Signifikanzwert	T ₀ AM	Thyronamin
PXR/Nr1i2	Pregnan-X-Rezeptor	T ₁ AM	3-Iodthyronamin
qPCR	quantitative PCR	T α T1	Hypophysenzelllinie

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle	TTR	Transthyretin
TAE	Tris-Acetat-EDTA	TR/Thr	Schilddrüsenhormonrezeptor (<i>thyroid hormone receptor</i>)
TAF	TBP-associated factor	THR-R/Trhr	TRH-Rezeptor
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	Tyr	Tyrosinrest
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin	U	Einheit (Unit)
TBP	TATA binding protein	UCP	uncoupling protein
TBPA	Thyroxin bindendes Präalbumin	UGT	Glucuronidase
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichlor acetic acid</i>)	ÜN	über Nacht
TE ₁₀	Tris-EDTA 1:10	U.S. EPA	U.S. Environmental Protection Agency
TEMED	Tetramethylethylenediamin	UV	Ultraviolett
TETRAC	tetraiodothyroacetic acid	UV/Vis	Ultraviolett/visible
TF	Transkriptionsfaktor	V	Volt
TFIIA	Transkriptionsfaktor IIA	VDR	Vitamin-D-Rezeptor
TG/Tg	Thyreoglobulin	VEGF/Vegfa	vascular endothelial growth factor
Thrsp	thyroid hormone responsive protein	V. cava	Vena cava
T _m	Schmelztemperatur	Vol.	Volumen
TNF α /Tnfa	Tumornekrosefaktor-α	v/v	Volumenprozent (<i>volume over volume</i>)
TPO/Tpo	Thyroperoxidase	w	Woche (week)
TRAP	thyroid hormone receptor associated protein	W	Watt
TRE	thyroid hormone response element	WB	Western blot
TRH/ppTrh	Thyreotropin-releasing Hormon	WHO	World Health Organization
TRHDE/Trhde	TRH degradierendes Eoktoenzym	w/v	Gewichtsprozent (<i>weight over volume</i>)
tRNA	Transfer-RNA	x	-fach
TSH/Tshb	Thyreoidea-stimulierendes Hormon	<i>X. laevis</i>	Xenopus laevis
TSH-R/Tshr	TSH-Rezeptor	xMAP	multiple analyte profiling
TTF	thyroid transcription factor	ZNS	Zentralnervensystem

Gennamen und RNA wurden mit großen Anfangsbuchstaben, Proteinamen durchgehend in Grossbuchstaben angegeben (Beispiel: DIO1/Dio1).

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
DANKSAGUNG	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1	EINLEITUNG
1	1
1.1	Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse
1.1	2
1.1.1	Wirkungen von Schilddrüsenhormonen
1.1.1	2
1.1.2	Negativer Feedbackmechanismus
1.1.2	3
1.1.3	Biosynthese und Transport von Schilddrüsenhormonen
1.1.3	4
1.1.4	Aktivierung und Abbau von Schilddrüsenhormonen
1.1.4	5
1.1.4.1	Deiodase Typ 1 (DIO1)
1.1.4.1	7
1.1.4.2	Deiodase Typ 2 (DIO2)
1.1.4.2	8
1.1.4.3	Deiodase Typ 3 (DIO3)
1.1.4.3	8
1.1.5	Schilddrüsenhormonrezeptoren (TRs)
1.1.5	9
1.1.6	Molekularer Wirkmechanismus von T ₃
1.1.6	10
1.1.7	T ₃ -regulierte Zielgene
1.1.7	12
1.1.7.1	Wachstum und Entwicklung
1.1.7.1	12
1.1.7.2	Stoffwechsel und Thermoregulation
1.1.7.2	13
1.1.7.3	Herz-Kreislauf-System
1.1.7.3	13
1.2	Erkrankungen der Schilddrüse
1.2	14
1.2.1	Hypothyreose
1.2.1	14
1.2.2	Hyperthyreose
1.2.2	15
1.2.3	Schilddrüsendiagnostik
1.2.3	16
1.2.4	Non-Thyroidal-Illness
1.2.4	16
1.3	Endokrin aktive Substanzen (EACs)
1.3	17
1.3.1	Definition - Endokrin aktive Substanzen
1.3.1	17
1.3.2	Exposition
1.3.2	18
1.3.3	Wirkung von EACs auf das Endokrinum
1.3.3	19
1.3.4	UV-Filter - 4-Methylbenzyliden-campher (4-MBC)
1.3.4	20
1.3.5	Nahrungsmittelbestandteile und -ergänzungsmittel (Soja, Genistein)
1.3.5	21
1.4	Klassische Vergleichssubstanzen
1.4	22
1.4.1	Thyreostatika - Propylthiouracil, Methimazol und Perchlorat
1.4.1	22
1.4.2	Synthetische Flavonoide - F21388
1.4.2	23
1.4.3	Endogene Steroide - Estradiolbenzoat (E ₂)
1.4.3	23
1.5	Verwendete Tiermodelle
1.5	23

1.5.1	Ovariectomierte Sprague-Dawley-Ratten	23
1.5.2	TR $\alpha^{0/0}$ -Mäuse	23
1.6	Zielsetzung der Arbeit	24
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Materialien	26
2.1.1	Chemikalien	26
2.1.2	Molekularbiologische Reaktionssysteme	26
2.1.3	Verbrauchsmaterial	26
2.1.4	Geräte	27
2.1.5	Puffer und Lösungen	28
2.1.6	Antikörper	28
2.1.7	Enzyme	29
2.1.8	Nukleinsäuren	29
2.1.8.1	DNA-Größenmarker	29
2.1.8.2	Oligonukleotide	30
2.1.8.3	Sonden	30
2.1.8.4	Vektoren	31
2.1.9	Datenbanken	31
2.1.10	Software	31
2.2	Zellkultur	32
2.2.1	Materialien und Lösungen für die Zellkultur	32
2.2.2	Zellkulturmodell	32
2.2.3	Allgemeine Kulturbedingungen	33
2.2.4	Inkubation der FRTL-5-Zellen mit der UV-Filtersubstanz 4-MBC	34
2.2.5	Mycoplasmenkontrolle	34
2.3	Bakterienkultur	35
2.3.1	Bakterienstämme	35
2.3.2	Allgemeine Kulturbedingungen	36
2.4	Molekularbiologische Methoden	36
2.4.1	Isolation genomischer DNA	36
2.4.2	Genotypisierung der TR $\alpha^{0/0}$ -Mäuse	37
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.4.5	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	40
2.4.6	Ligation	41
2.4.7	Transformation	41
2.4.8	DNA-Isolation aus Plasmidpräparationen	41
2.4.9	Restriktionsverdau	42
2.4.10	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	43

Inhaltsverzeichnis

2.4.11	Sequenzierung	43
2.4.12	Aufarbeitung und Aufbewahrung von Gewebeproben	44
2.4.13	RNA-Isolation	44
2.4.13.1	RNA-Isolation mit peqGOLD Trifast™	45
2.4.13.2	RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits	46
2.4.14	Überprüfung der RNA-Qualität im denaturierenden Formaldehydgel	47
2.4.15	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	48
2.4.16	Quantitative Real-time RT-PCR (qPCR)	48
2.4.17	Northern blot-Analyse	50
2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	52
2.5.1	Herstellung von Proteinhomogenaten	52
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	54
2.5.3	T ₄ -Bindungsassay	54
2.5.4	Deiodase-Assay.....	55
2.5.5	Malatenzym-Assay	59
2.5.6	Iodid-Aufnahme-Assay	60
2.5.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	62
2.5.8	Western blot-Analyse	64
2.6	Tierexperimentelle Praxis.....	66
2.6.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	66
2.6.2	Futtermittel.....	67
2.6.3	Ovariectomie	67
2.6.4	Dosierung der Referenz- und Testsubstanzen	68
2.6.4.1	Referenzsubstanzen und Lösungsmittelkontrollen.....	68
2.6.4.2	Endokrin aktive Substanzen	69
2.6.4.3	Applikation	69
2.6.5	Tötung	72
2.7	Messung von Serumparametern	73
2.7.1	Serumanalyse von Hormonen	73
2.7.2	Serumanalyse proinflammatorischer Zytokine	74
2.8	Histologische Methoden.....	74
2.8.1	Präparation von Organen zur histologischen Analyse	74
2.8.2	Einbetten von Paraformaldehydpräparaten.....	75
2.8.3	Präparation der Gewebeschnitte.....	75
2.8.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	76
2.8.5	Immunhistochemische Analyse	77
2.9	Statistik	78

3	ERGEBNISSE	80
3.1	Charakterisierung chronischer Effekte von 4-MBC und Soja.....	80
3.1.1	Einfluss auf das Körpergewicht und die Konstitution der Tiere	81
3.1.2	Einfluss auf Feedback-assoziierte Parameter in der Hypophyse.....	82
3.1.3	Einfluss auf TSH- und T ₃ -regulierte Zielgene der Schilddrüse	84
3.1.4	Einfluss auf den Transport von Schilddrüsenhormonen	85
3.1.5	Einfluss auf T ₃ -regulierte Endpunkte peripherer Organe.....	86
3.2	Charakterisierung subakuter Effekte von 4-MBC	88
3.2.1	Validierung des Modells zur Analyse der thyreotropen Achse	88
3.2.2	Beeinflussung von Körpergewicht und Konstitution der Tiere	94
3.2.3	Hormonelle Veränderungen der Hypophysen-Schilddrüsenachse	95
3.2.3.1	Hypophysenhormone	95
3.2.3.2	Schilddrüsenhormone	97
3.2.4	Beeinflussung des Feedbacks in Hypothalamus und Hypophyse	98
3.2.5	Expressionsanalyse spezifisch regulierter Gene in der Hypophyse	102
3.2.6	Beeinflussung der Schilddrüse	104
3.2.6.1	Organgewicht und Morphologie der Schilddrüse.....	105
3.2.6.2	Einfluss auf den TSH-induzierten Iodidtransport ins Follikellumen.....	106
3.2.6.3	Einfluss auf die Schilddrüsenhormonbiosynthese	110
3.2.6.4	Einfluss auf die Regulation der Angiogenese.....	112
3.2.7	Einfluss auf die T ₃ -regulierte Genexpression peripherer Gewebe	115
3.2.8	Inflammatorischer Zytokine nach subakuter Applikation von 4-MBC	119
3.3	Untersuchungen zur Wirkung von 4-MBC im Zellkulturmodell.....	121
3.3.1	Beeinflussung des Iodidtransports durch 4-MBC im Zellkulturmodell	122
3.3.2	Expressionsanalyse der Hormonbiosynthese im Zellkulturmodell.....	124
3.4	Methodische Untersuchungen im Wildtyp-Mausmodell	125
3.4.1	Parameter zur Beurteilung der Wirkung der Testsubstanzen	128
3.4.2	Einfluss des Applikationszeitraumes	130
3.4.3	Einfluss von Stamm, Applikationsform und Geschlecht.....	130
3.5	Effekte von GEN und F21388 im TRα^{0/0}-Modell	131
3.5.1	Einfluss auf Körpergewicht und Konstitution der Tiere	132
3.5.2	Hormonelle Veränderungen der Hypophysen-Schilddrüsenachse	134
3.5.3	Beeinflussung des Feedbacks in Hypothalamus und Hypophyse	135
3.5.4	Beeinflussung der Schilddrüse	137
3.5.4.1	Einfluss auf die Morphologie.....	137
3.5.4.2	Einfluss auf Iodidtransport und Schilddrüsenhormonbiosynthese	139
3.5.1	Einfluss auf die T ₃ -regulierte Genexpression peripherer Organe.....	144
3.6	Analyse von Hyper- und Hypothyreose in Wildtyp- und TRα^{0/0}-Mäusen	144

4	DISKUSSION	147
4.1	Charakterisierung der HPT-Achse in der ovariectomierten Ratte	148
4.1.1	E ₂ als Referenzsubstanz in ovariectomierten Ratten	149
4.1.2	T ₄ und MMI als Referenzsubstanzen in ovariectomierten Ratten	152
4.2	Der UV-Filter 4-MBC wirkt goitrogen und verursacht Hypothyreose.....	156
4.2.1	Chronische Effekte	157
4.2.2	Subakute Effekte	160
4.2.2.1	Beeinträchtigung der Feedbackregulation durch 4-MBC.....	162
4.2.2.2	Beeinträchtigung der Schilddrüsenhormonbiosynthese durch 4-MBC.....	168
4.2.2.3	Hemmung T ₃ -regulierter Gene der Peripherie durch 4-MBC.....	171
4.2.3	Vergleich chronischer und subakuter Applikation von 4-MBC	174
4.3	Speziesspezifische Wirkungen von EACs auf die thyreoptrope Achse.....	176
4.3.1	Effekte von 4-MBC im Wildtyp-Mausmodell	177
4.3.2	Effekte von GEN und F21388 im Wildtyp-Mausmodell.....	179
4.4	Analyse TR-vermittelter Effekte von (Iso-)Flavonoiden im TR$\alpha^{0/0}$-Modell ..	183
4.4.1	Hypersensitivität gegenüber T ₄ und MMI/NaClO ₄	185
4.4.2	TR-vermittelte Effekte von GEN und F21388.....	187
4.5	Klinische Relevanz der Daten	191
5	AUSBLICK	193
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	196
	TABELLENVERZEICHNIS	199
	LITERATURVERZEICHNIS	200
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	233
	ERKLÄRUNG	237
	ANHANG.....	238

1 Einleitung

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) reguliert als endokrines Organ Embryonalentwicklung und Wachstum sowie die Homöostase des Energie- und Intermediärstoffwechsels im Körper (Oppenheimer et al. 1987; Yen 2001). Das schmetterlingsförmige Organ ist von einer Bindegewebskapsel umgeben und unterhalb des Schildknorpels an der Vorderseite der Luftröhre lokalisiert. Unter der Kontrolle eines negativen Feedbacksystems, das auch als thyreotroper Regelkreis bezeichnet wird, regulieren hypothalamische *releasing*-Hormone und hypophysäre glandotrope Hormone des Zentralnervensystems (ZNS) die Biosynthese, Speicherung und Sekretion der Schilddrüsenhormone 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin (T₄, Thyroxin) und 3,3',5-Triiod-L-thyronin (T₃, Triiodthyronin) (Kronenberg et al. 2007). Nach dem Transport zu den Zielzellen der peripheren Gewebe erfolgt die Bindung an Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR), die als ligandenmodulierte Transkriptionsfaktoren wirken (Yen et al. 2006). Die enge Regulation der Schilddrüsenfunktion ist für Entwicklung, Wachstum, Physiologie und Adaptation an äußere Störungen von entscheidender Bedeutung. Störungen der Schilddrüsenfunktion bzw. der Schilddrüsenhormonachse äußern sich in Form deutlich eingeschränkter körperlicher und geistiger Leistungsfähigkeit, als irreversibel gestörte geistige Entwicklung im Wachstumsalter bzw. auch als organotypische Fehlbildung (z.B. Iodmangelstruma) mit potentiell procancerogener Aktivität (Kronenberg et al. 2007).

Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass hormonelle Effekte nicht nur durch endogene Substanzen, sondern auch durch Chemikalien und Umweltgifte vermittelt werden (Anway et al. 2005; Crews und McLachlan 2006; Durrer et al. 2007). Zu diesen Stoffen, die als „endokrine Disruptoren“ (ED) oder auch „endokrin aktive Substanzen“ (EAC) klassifiziert werden, gehören beispielsweise polychlorierte Biphenyle (PCBs), deren Derivate und Metabolite u.a. über Bindung an TRs selektiv die Funktion von Schilddrüsenhormonen beeinträchtigen können, aber auch Nahrungsmittelbestandteile und Nahrungsergänzungsmittel, die Flavonoide enthalten, deren Wirkstoffe die Schilddrüsenhormonbiosynthese beeinträchtigen können (Divi et al. 1997; Zoeller 2005).

Im Folgenden werden Regulation, Stoffwechsel und molekulare Wirkung der Schilddrüsenhormone sowie die bisher verfügbaren Informationen zur Wirkung ausgewählter EACs auf die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse (HPT-

Achse, thyreotrope Achse) beschrieben, um darauf aufbauend die Zielsetzung der Arbeit herzuleiten, welche die funktionelle und molekulare Charakterisierung der Wirkung ausgesuchter EACs auf die Regulation der thyreotropen Achse sowie deren Effekte auf die Genexpression regulatorischer und peripherer Organe zum Thema hat.

1.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse

Das endokrine System von Mensch und Tier beruht auf der Verbindung von Organen zu Regelkreisen, innerhalb derer sich die einzelnen Instanzen zur Aufrechterhaltung der Homöostase gegenseitig beeinflussen. Hypothalamus und Hypophyse stimulieren (oder inhibieren) endokrine Drüsen, woraufhin diese Hormone freisetzen, die in den Zielorganen ihre jeweilige Wirkung ausüben und über Feedbackregulation das lebensnotwendige Gleichgewicht von Auf- und Abbaureaktionen, Wachstum und Reifung, Tag und Nacht usw. sicherstellen (Kronenberg et al. 2007).

1.1.1 Wirkungen von Schilddrüsenhormonen

Die biologischen Effekte der Schilddrüsenhormone sind vielfältig und reichen von der Thermogenese zur Steuerung von Tag-Nacht-Rhythmus und zur Regulation von Wachstums und Reifeprozessen z.B. von Skelett und Gehirn (Kim 2008). Stoffwechseleffekte betreffen Kohlehydrate (beschleunigte Aufnahme, gesteigerte Glukoneogenese der Leber), Lipide (Lipolyse, beschleunigter Cholesterinstoffwechsel) und Proteine (Förderung der Proteinbiosynthese) und resultieren in erhöhtem Sauerstoff- und Energieverbrauch. Dies betrifft insbesondere das verfügbare Adenosin-Triphosphat (ATP), das nicht nur durch Induktion der anabolen und katabolen Stoffwechselwege, sondern auch durch die Expression von Na^+/K^+ -ATPasen und sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen verstärkt umgesetzt wird (Ribeiro 2008; Silva 2003). Zusätzlich wirkt T_3 kardial positiv inotrop und chronotrop und senkt darüber hinaus den peripheren Gefäßwiderstand, sodass das Herzminutenvolumen erhöht wird (Klein und Ojamaa 2001). Die Beeinträchtigung Schilddrüsenfunktion kann schwerwiegende Folgen für Stoffwechsel, Reproduktionsfähigkeit und Gesundheit der Nachkommen haben. Die Auswirkungen einer Unter- oder Überfunktion der Schilddrüse machen sich in einer Vielzahl spezifischer, teils gegenläufiger Stoffwechseleränderungen bemerkbar, die entwicklungs- und altersabhängig sind und nicht-lineare, U-förmige Konzentrationsbeziehungen aufweisen.

1.1.2 Negativer Feedbackmechanismus

Das Thyreotropin-*releasing*-Hormon (TRH, Thyreoliberin), welches die Synthese und Freisetzung von Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH) aus der Hypophyse reguliert, wird im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus gebildet. Es besteht aus den drei Aminosäuren (pyro)Glu-His-Pro-NH₂ und wird mit Hilfe der Prohormonkonvertasen (PC1 und PC2), die der Furin-Familie angehören, aus dem Vorläuferprotein Präpro-TRH (ppTRH) freigesetzt und stellt damit das kleinste bekannte Releasing-Hormon dar (Perello und Nilni 2007; Perello et al. 2006). Nach weiterer proteolytischer Prozessierung und posttranslationaler Modifikation folgen die Freisetzung des Neuropeptids sowie der Transport über den portalen Blutkreislauf zu den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse. Nach Bindung des Gq₁₁-Protein gekoppelten Rezeptors (TRH-R), der in der Plasmamembran der thyreotropen Zellen der Hypophyse verankert ist, aktiviert TRH die Sekretion und *de-novo*-Synthese von TSH (Yen 2001). Die Wirkung von TRH wird sowohl von T₃ als auch von Östrogenen (E₂) supprimiert (Schomburg und Bauer 1995; Schomburg und Bauer 1997).

Das heterodimere Glykoproteohormon TSH, das von den thyrotropen Zellen der Adenohypophyse sezerniert wird, besteht aus einer α -Untereinheit (α GSu), die auch Teil der gonadotropen Hormone ist, sowie einer nicht-kovalent gebundenen spezifischen β -Untereinheit, wobei erst durch Assoziation beider Untereinheiten ein funktionelles Protein mit einer Größe von 28 kDa entsteht. Neben der gemeinsamen α -Untereinheit, die auch in Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) sowie in der Plazenta Schwangerer als humanes Choriongonadotropin (hCG) exprimiert wird, zeigen auch die β -Untereinheiten dieser Hormone starke Homologien, da davon ausgegangen wird, dass diese während der Evolution durch Genduplikation entstanden sind. TSH stimuliert nach Freisetzung und Transport über das Blut die Biosynthese der Schilddrüsenhormone T₄ und T₃, indem es an den Gs α -Protein gekoppelten heptahelikalen Rezeptor (TSH-R) bindet, der basolateral in der Membran des Thyrozyten, der die kleinste funktionelle Einheit der Schilddrüse darstellt, verankert ist (Parmentier et al. 1989; Kero et al. 2007). Dessen Aktivierung stimuliert Angiogenese und Iodidaufnahme, die Expression an der Proteinbiosynthese beteiligter Gene sowie die präferentielle Freisetzung von T₃ gegenüber T₄.

Die Regulation der thyreotropen Achse erfolgt dabei über einen mehrschleifigen Regelkreis, der unter negativer Feedback-Kontrolle steht, indem die Sekretion von

TRH und TSH durch die Konzentration der im Serum vorhandenen Schilddrüsenhormone beeinflusst wird. So bewirken TSH und T_3 eine Suppression der TRH-Sekretion, während die Biosynthese von TSH sowie T_4 und T_3 sowohl durch das Thyreotropin selbst als auch durch die Schilddrüsenhormone reguliert wird (Schneider et al. 2001; Prummel et al. 2004). Diese Regulation des Feedbacks ist so präzise, dass die Beziehung von TSH und T_4 zur Diagnose vieler Schilddrüsenerkrankungen herangezogen wird.

1.1.3 Biosynthese und Transport von Schilddrüsenhormonen

Aufgabe der Schilddrüse ist die Produktion, Speicherung und Freisetzung der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 nach Stimulation durch TSH-abhängig von den Spurenelementen Iod und Selen (Köhrle et al. 1995). TSH verstärkt alle Prozesse, die zur Biosynthese von Schilddrüsenhormon notwendig sind: Angiogenese, Aufnahme und Organifizierung von extra- und intrathyroidalem Iodid, Freisetzung von Thyroglobulin (TG), Proteinbiosynthese und Sekretion von T_4 und T_3 (Abb. 1). Die Aufnahme von Iodid in den Thyrozyten erfolgt entgegen einem Konzentrationsgradienten über den basolateral lokalisierten Natrium-Iodid-Symporter (NIS) (Dohan et al. 2003c; Dai et al. 1996). Der apikal gelegene Kanal Pendrin (SLC26A4) vermittelt die Chloridaufnahme aus dem Lumen und den Iodidefflux in das apikale Kolloid des Thyrozyten (Gillam et al. 2004; Yoshida et al. 2004). Über die apikale Membran wird TG in das Lumen sezerniert, wo es als molekulare Matrix für die Schilddrüsenhormonbiosynthese und Speicherung zur Verfügung steht (Martin-Belmonte et al. 2000). Die membranassoziierten Thyrooxidasen (DUOX1/2) sind Mitglieder der NADPH-Oxidase-Familie und erzeugen H_2O_2 in einem Zwei-Schritt-Mechanismus, der die Grundlage für die Oxidation von Iodid in atomares Iod darstellt (De Deken et al. 2002). Dieser Prozess erfolgt mit Hilfe des membranständigen Hämproteins Thyroperoxidase (TPO), die in Gegenwart des Kofaktors H_2O_2 auch die Iodierung der Tyrosinreste katalysiert. Die in 3- und 5-Position iodierten Tyrosinreste, Monoiodtyrosin und Dioiodtyrosin, werden in einem oxidativen Kopplungsschritt abhängig von der Iodversorgung zu T_4 oder T_3 zusammengefügt (Abb. 1). Bedarfsabhängig wird T_4 bereits zum Teil in der Schilddrüse durch die 5'-Deiodasen (DIO1, DIO2) in 5'-Position zu T_3 deiodiert (Köhrle 2000), da ihre Expression und Aktivität ebenfalls TSH-abhängig reguliert ist (Dunn und Dunn 2001). T_4 und T_3 werden schließlich nach redoxregulierter Proteolyse in das Blut abgegeben (Brix et al. 2001) (Abb. 1).

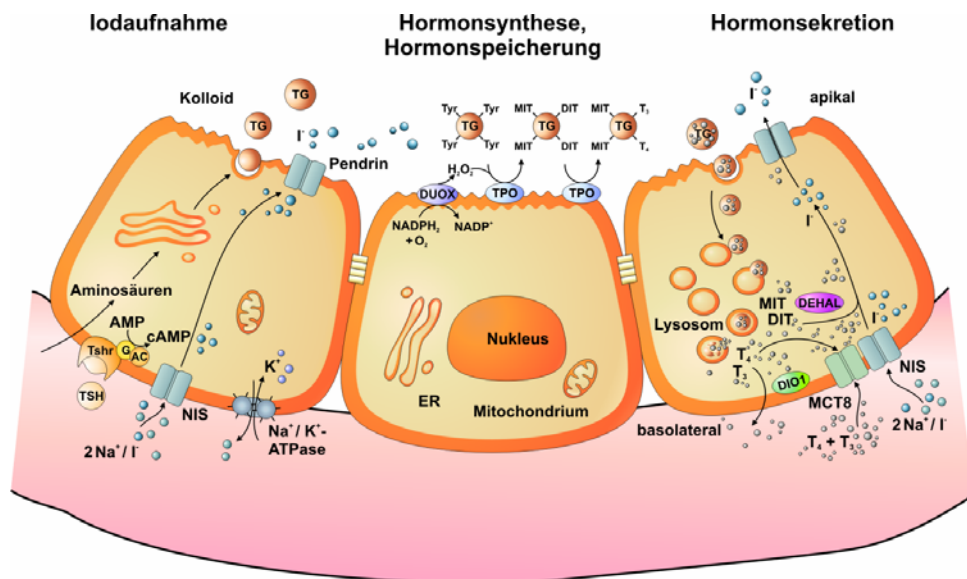


Abb. 1: Biosynthese der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 .

Die Schilddrüsenfollikel bestehen aus einer Schicht epithelialer Zellen (orange), die das Kolloid fest einschließen. Die aktive Anreicherung von I^- wird von NIS vermittelt, der zusammen mit der Na^+/K^+ -ATPase, welche den Na^+ -Gradienten aufrechterhält und dem TSH-R, der den Transport reguliert, an der basolateralen Membran lokalisiert ist (links). An der apikalen Membran wird *de novo*-synthetisiertes TG und I^- - letzteres vermittelt durch Pendrin, an das Kolloid abgegeben. Durch die membranständigen Enzyme Thyrooxidasen (DUOX) und Thyroperoxidase (TPO) werden Tyrosinreste (Tyr) am Thyroglobulin iodiert (Mitte). Nach Endozytose des iodierten TG und phagosomaler Hydrolyse werden T_4 und T_3 freigesetzt und basolateral an das Blut abgegeben. Ihre Verteilung wird u.a. durch den Monocarboxylattransporter (MCT8) beeinflusst, dem eine Rolle sowohl in Sekretion als auch in der Rückresorption zugeschrieben wird (rechts). Durch die 5'-Deiodase Typ 1 (DIO1) werden T_4 und T_3 metabolisiert und das freigesetzte Iod - wiederum über Pendrin - an das Kolloid abgegeben.

Die Plasmakonzentrationen von T_4 und T_3 liegen im Menschen bei 90 nM bzw. 2 nM, wobei 99,9 % des T_4 und 99,0 % des T_3 an Plasmaproteine gebunden werden, die sich in Kapazität und Affinität unterscheiden. Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) ist ein Transportprotein mit hoher Affinität aber geringer Kapazität ($K_a 10^8 M^{-1}$), das nur in Säugern exprimiert wird (Buettner et al. 1999). Transthyretin (TTR) hat hingegen eine mittlere Affinität ($K_a 10^{10} M^{-1}$) und eine hohe Kapazität, während Albumin T_4 und T_3 mit niedriger Affinität bindet ($K_a 10^6 M^{-1}$), aber eine hohe Kapazität aufweist (Hamilton und Benson 2001; Palha 2002). Die freie Konzentration von Schilddrüsenhormonen im Serum ist mit unter 0,1 % sehr gering, jedoch wird nur das freie T_4 (FT_4) und T_3 (FT_3) in die Zelle aufgenommen (Richardson 2007).

1.1.4 Aktivierung und Abbau von Schilddrüsenhormonen

Deiodasen gehören zur Familie der Selenoproteine (die Aminosäure Selenocystein ist Bestandteil des konservierten aktiven Zentrums) und katalysieren sowohl die

Aktivierung als auch den Abbau von Schilddrüsenhormonen. Die mRNA alle bisher klonierten Isoenzyme enthält eine Sec-Insertions-Sequenz (SECIS) (Köhrle 2002). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sie sich in katalytischen Eigenschaften, Substratspezifität, Kinetik, Reaktionsmechanismus und pathophysiologischen Implikationen (Bianco et al. 2002).

In der Schilddrüse wird T_4 *de-novo* synthetisiert und dort oder in der Peripherie zu T_3 aktiviert (Engler und Burger 1984). Seine Aufnahme in die Zielzellen wird durch Transmembranproteine wie die Monocarboxylattransporter 8 und 10 (MCT8, MCT10) sowie dem organischen Anionentransporter (OAPT1C1) vermittelt (Friesema et al. 2006; Visser et al. 2007; Friesema et al. 2005). T_3 wird entweder *de novo* am TG-Molekül synthetisiert oder aber durch enzymatische Deiodierung aus T_4 erzeugt (Köhrle 2002). Die Deiodierung wird durch die Iodthyronin-Deiodasen DIO1, 2 und 3 katalysiert (Abb. 2).

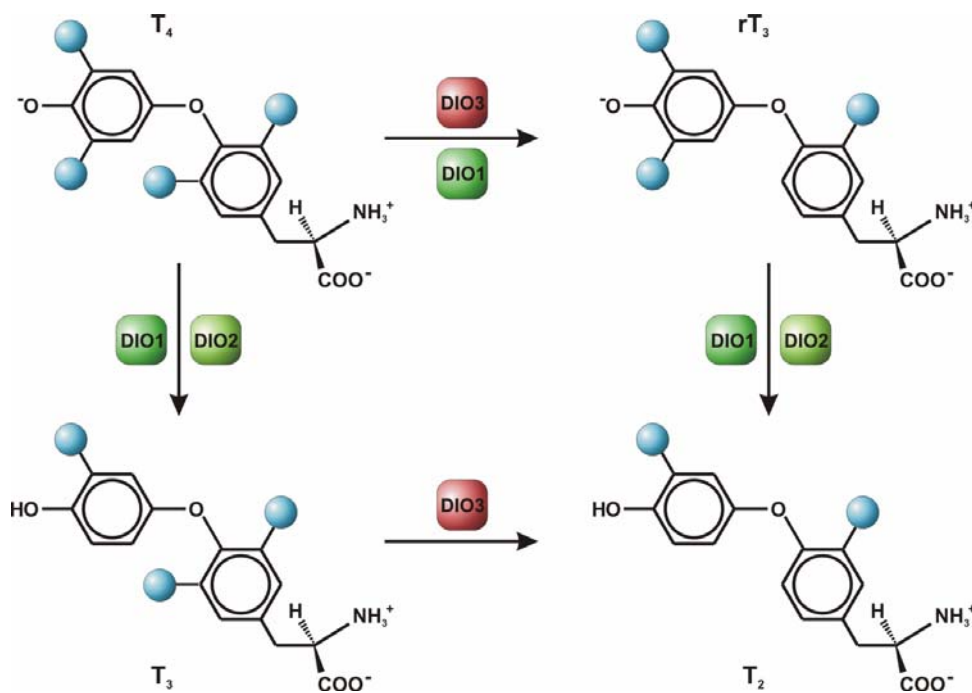


Abb. 2: Deiodasen.

Deiodasen katalysieren die Entfernung von Iodresten (blau) am Phenol- oder Tyrosylring der Iodthyronine. Deiodasen konvertieren die Vorstufe T_4 in das biologisch aktive T_3 (DIO1, DIO2) oder verhindern die Aktivierung durch Bildung des inaktiven rT₃ (DIO1, DIO3). T_2 ist ein inaktives Abbauprodukt aus beiden Stoffwechselwegen, das schnell durch weitere Deiodierung abgebaut wird. Adaptiert von Bianco et al. (Bianco et al. 2002).

Während DIO1 sowohl auf den Phenol- als auch auf den Tyrosylring wirkt, ist DIO2 spezifisch für den Phenol-Ring und katalysiert damit die Aktivierung von T_4 zu T_3 (Köhrle 2002). DIO3 katalysiert die Deiodierung am Tyrosylring und damit den Abbau

von T_4 zu reversem T_3 (rT_3) (Köhrle 2002). Da für rT_3 bisher keine biologische Funktion beschrieben ist, ist es als inaktiver Metabolit oder Vorstufe für die Thyronamine T_1AM und T_0AM zu betrachten (Piehl et al. 2008). Auch T_3 und rT_3 sind Substrate für Deiodasen. Ihre Metabolisierung führt zu weiteren inaktiven Thyroninen, dem L-Diiodthyronin ($3,5-T_2$, $3,3'-T_2$, $3',5'-T_2$), L-Monoiodthyronin ($3-T_1$, $3'-T_1$) und L-Thyronin (T_0) (Chopra et al. 1978). Die Hauptfunktion der Deiodasen ist damit die Regulation der lokalen und systemischen Bioverfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen (Köhrle 2002).

Der Abbau von TH erfolgt durch Glukuronidasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT), die durch Erhöhung der Wasserlöslichkeit die Ausscheidung im Urin und Galle erleichtern (Kronenberg et al. 2007).

1.1.4.1 *Deiodase Typ 1 (DIO1)*

Die Dio1 wurde 1990 als Selenoprotein identifiziert (Behne et al. 1990). Sie katalysiert hauptsächlich die Monodeiodierung von $3,5,3',5'$ -Tetraiodothyronin (T_4) und $3,3',5'$ -Triiodothyronin (reverses T_3 , rT_3) (Bianco et al. 2002), wobei rT_3 das bevorzugte Substrat der Dio1 ist (Köhrle 2002). Bei der Deiodierungsreaktion wird zunächst das Iodthyronin auf das Selenoat-Anion übertragen und dann das resultierende Selenyl-Iodid Intermediat von einem bisher unbekanntem intrazellulären Kosubstrat reduziert, um das Enzym zu regenerieren (Kuiper et al. 2005). *In vitro* wird DTT als Kosubstrat akzeptiert. Möglicherweise führt die Deiodierung *in vivo* zur Suizid-Inaktivierung von DIO1, indem das Enzym nicht regeneriert wird (Köhrle 2002). DIO1 und DIO2 lassen sich experimentell unterscheiden, da allein DIO1 durch 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) inhibiert wird (Visser und van Overmeeren-Kaptein 1981).

DIO1-mRNA und Enzymaktivität wurden in klassischen Zielgeweben von T_3 , wie Leber, Niere und Herz nachgewiesen (Köhrle 2002; Bianco et al. 2002). Im ZNS und insbesondere in der Hypophyse der Ratte war DIO1-Enzymaktivität nachweisbar, nicht jedoch im menschlichen ZNS (Campos-Barros et al. 1996).

Bis vor kurzem galt die Dio1 Aktivität in Leber und Schilddrüse als die Hauptquelle für Serum- T_3 im euthyreoten Organismus und damit für die systemische Versorgung mit aktivem Schilddrüsenhormon (Bianco et al. 2002). Allerdings sind Dio1-defiziente Mäuse gesund und fertil. Ihre T_4 und rT_3 Spiegel im Serum waren zwar erhöht, die T_3 -

und TSH-Konzentrationen jedoch unverändert (Streckfuss et al. 2005; Schneider et al. 2005).

1.1.4.2 *Deiodase Typ 2 (DIO2)*

Die DIO2 katalysiert ausschließlich die Deiodierung am Tyrosinring und wandelt ihr bevorzugtes Substrat T_4 zu T_3 um (Bianco et al. 2002). Dabei interagieren Iodthyronin und ein Kosubstrat mit dem Enzym bevor die eigentliche Reaktion stattfinden kann (Visser et al. 1982). Ebenso wie für DIO1 ist das Kosubstrat unbekannt, wobei *in vitro* DTT akzeptiert wird (Köhrle 2002).

Die Dio2 wird insbesondere in Organen wie Gehirn, braunem Fettgewebe, Placenta und Muskel exprimiert. Ihre Transkription wird - entgegen der DIO1 - durch T_3 inhibiert (Burmeister et al. 1997). Somit bewirkt die erhöhte Konzentration von T_3 und rT_3 bei Hyperthyreose über die Reduktion der DIO2-Expression und -Aktivität eine negative Feedbackkontrolle (Visser et al. 1982). Spezies-spezifische Unterschiede in der Expression betreffen u.a. die adulte Schilddrüse und das Herz, in denen beim Menschen, nicht jedoch in der Ratte DIO2 exprimiert ist (Bates et al. 1999; Bianco et al. 2002).

DIO2-Knockoutmäuse wiesen keinen charakteristischen Phänotyp auf, zeigten eine normale Entwicklung und Fertilität sowie nur minimale Wachstumsdefizite im Männchen. Allerdings waren die Serumkonzentrationen von T_4 und TSH bei konstanten T_3 -Spiegeln im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Offensichtlich bedarf es der DIO2 Aktivität, um eine effiziente Feedbackregulation über TSH sicherzustellen (Schneider et al. 2001).

1.1.4.3 *Deiodase Typ 3 (DIO3)*

Die DIO3 wird unter anderem in Plazenta, im Gehirn, im schwangeren Uterus, in der Haut sowie in fetalen und neonatalen Geweben exprimiert. Sie inaktiviert T_4 und T_3 durch Deiodierung des Tyrosylringes zu rT_3 und $3,3'$ - T_2 (Hernandez 2005). Damit kann DIO3 die Überladung von Zellen mit biologisch aktivem T_3 verhindern (Hernandez 2005).

Die DIO3-Knockoutmaus zeigte erhöhte Serumkonzentrationen von T_3 und eine Überexpression T_3 -abhängiger Gene im Gehirn von Jungtieren. Im adulten DIO3-

Knockout waren die Serum-Spiegel von T_3 und T_4 erniedrigt bei nur geringem Anstieg von TSH als Zeichen einer Hypothyreose (Hernandez et al. 2006). Entsprechend ist DIO3 an der Feedbackregulation der Schilddrüsenachse beteiligt.

1.1.5 Schilddrüsenhormonrezeptoren (TRs)

TRs gehören auf Grund ihrer Sequenzhomologie zur Familie der nukleären Rezeptoren (NR), zu denen auch Steroid-, Retinsäure- und Vitamin D-Rezeptoren gehören, die an der Regulation von Reproduktion, Entwicklung und Stoffwechsel beteiligt sind (Evans 2005). NR stammen aufgrund ihres gleichartigen strukturellen Aufbaus evolutionär vermutlich von einem gemeinsamen Vorläufergen ab, denn sie zeichnen sich durch eine gleichartige grundlegende Struktur aus (Evans 1988). Diese werden in zwei Klassen eingeteilt, wobei folgende der Klasse II angehören: TR, Vitamin D-Rezeptoren (VDR), Retinsäure-Rezeptoren (RAR), 9-*cis*-Retinoic-X-Rezeptoren (RXR) und Peroxisom-Proliferator aktivierte-Rezeptoren (PPAR).

Bisher wurden drei als Transkriptionsfaktor funktionelle TRs beschrieben, die von zwei unterschiedlichen Genen (*THRA* und *THRB*) kodiert werden (Oetting und Yen 2007) (Abb. 3). $TR\alpha_1$ und $TR\beta_1$ werden ubiquitär in Zielgeweben der Schilddrüsenhormone exprimiert, $TR\beta_2$ jedoch nur in spezifischen Regionen des ZNS wie dem vorderen Hypophysenlappen und Hypothalamus (Hodin et al. 1990; Cook et al. 1992; Ribeiro 2008). Das zweite Hauptprodukt von *THRA*, $TR\alpha_2$ oder auch *c-erbA α 2* genannt, zeigt keine Ligandenbindung für T_3 und wird hauptsächlich in der Hypophyse exprimiert und wirkt vermutlich durch Konkurrenz um die DNA-Bindung als endogener dominant negativer Inhibitor der T_3 -Wirkung.

Nach Aktivierung durch T_3 und Heterodimerisierung mit RXRs binden TRs an die Thyroid-Hormone-Response-Elemente (TRE) im Promoterbereich Ihrer Zielgene (Oetting und Yen 2007). Dadurch wird der kardiale β_1 -adrenerge Rezeptor positiv reguliert, während TSH β in der Hypophyse und im Hypothalamus negativ reguliert werden (Williams et al. 1977; Bodenner et al. 1991).

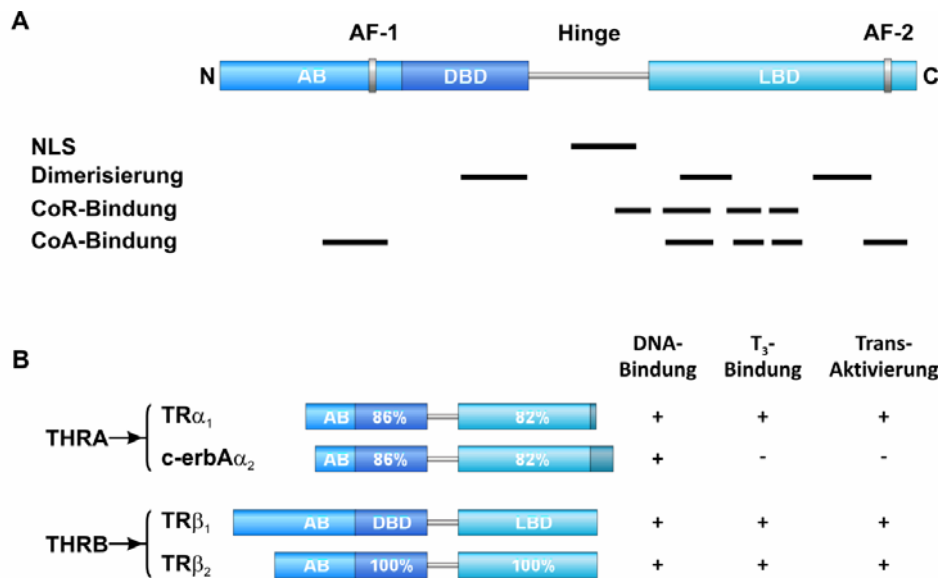


Abb. 3: Isoformen der Schilddrüsenhormonrezeptoren.

(A) Schematische Darstellung der vier funktionellen Untereinheiten. N-terminal befindet sich die Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion-1 (AF-1) und die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Die flexible Scharnierregion (Hinge) mit Kernlokalisierungssignal (NLS) verbindet diese mit der C-terminalen AF-2 Untereinheit, welche die Ligandenbindungsdomäne (LBD) enthält. Die Regionen, die Bindung der Koaktivatoren/Korepressoren (CoA/CoR) vermitteln sind schwarz unterstrichen. (B) Die beiden THR-Gene kodieren unterschiedliche Protein-Isoformen der TRs (TR α und TR β). THRA wird von 2 Promotoren exprimiert, wobei die TR α_1 -Isoform als T₃-induzierbarer Transkriptionsfaktor wirkt. Die C-terminale Isoform c-erbA α_2 (alias TR α_2) bindet nicht an T₃ und wirkt als Antagonist. THRB wird von drei unterschiedlichen Promotoren exprimiert. Die drei N-terminalen Isoformen binden T₃ und wirken als T₃-induzierbare Transkriptionsfaktoren. Die Prozentangaben stellen die Sequenzhomologien von DBD und LBD zur entsprechenden Domäne von TR β_2 dar (Flamant und Samarut 2003).

1.1.6 Molekularer Wirkmechanismus von T₃

Bisher ist kein umfassendes Modell verfügbar, das die Effekte von T₃ auf Aktivierung und Repression der Genexpression in unterschiedlichen Geweben erklärt (Oetting und Yen 2007). Die klassische molekulare Wirkung von T₃ ist eine Aktivierung der Expression spezifischer Zielgene, welche nach T₃-abhängiger Interaktion der TR mit den Promotoren der Zielgene vermittelt wird. Diese binden bereits in Abwesenheit von T₃ an die TRE und rekrutieren Korepressoren (CoR) (Heinzel et al. 1997; Horlein et al. 1995) und reprimieren die Transkription der Zielgene (Abb. 4) (Chen und Evans 1995; Baniahmad et al. 1992). Nach der Bindung von T₃ und allosterischen Konformationsänderungen dissoziieren die CoR, die Koaktivatoren (CoA) binden und aktivieren die Transkription (Hu und Lazar 1999). Der Korepressorkomplex besteht aus mehreren Proteinen und beinhaltet unter anderem N-CoR (*nuclear receptor corepressor*), SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*) und Histon-Deacetylasen (HDAC) (Perissi et al. 2004; Ishizuka und Lazar 2003) (Abb. 4 A).

HDAC3 wird durch die DAD (*deacetylase activating domain*) von N-CoR oder SMRT aktiviert (Guenther et al. 2001) und gemeinsam mit NCoR vom Aporezeptor zum TRE rekrutiert, wo es durch lokale Histondeacetylierung transient die Genaktivität reprimiert (Ishizuka und Lazar 2003). Koaktivatoren induzieren die Transkription; dazu gehören CBP/p300 (CREB-binding protein) und Mitglieder der SRC/p160 Familie sowie die Histonacetyltransferase (Nagy et al. 1999). Der assoziierte Komplex aus DRIP (vitamin-D-receptor-interacting protein) und TRAP (*thyroid-hormon-receptor-associated protein*) vermittelt die Interaktion zwischen RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) und basalen Transkriptionsfaktoren (TF) (Abb. 4 B) (Bassett et al. 2003).

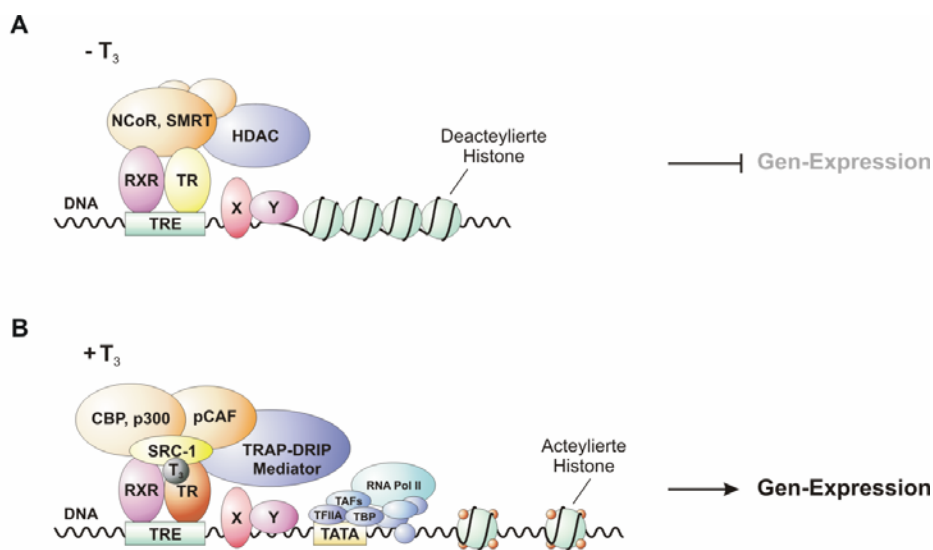


Abb. 4: Molekularer Wirkmechanismus von T₃.

(A) TR binden bereits in Abwesenheit von T₃ die TRE ihrer Zielgene, meist als Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor RXR. Dadurch werden Korepressoren (z.B. NCoR oder SMRT) und Histondeacetylasen rekrutiert, welche das Chromatin in einem reprimierten Zustand halten. (B) Nach der Bindung von T₃ an TR führt die Änderung der Konformation zum Austausch der Korepressoren gegen Koaktivatoren (SRC-1), sowie Rekrutierung von Histonacetylasen (CBP, p300, and pCAF) und weiterer Mediatoren (TRAP und DRIP). Damit wird der Zugang der Transkriptionsmaschinerie ermöglicht (TBP, TFIIA, TAFs, RNA Polymerase II) und damit die Transkription der Zielgene induziert (Bernal 2002).

Schilddrüsenhormone bewirken auch Effekte an der Plasmamembran, die transkriptionsunabhängig sind und teilweise unabhängig von TRs vermittelt werden (Oetting und Yen 2007). Dazu gehört die Aktivierung von MAPK nach der Bindung von T₄ oder T₃ an αVβ3-Integrin (Bergh et al. 2005a). Weitere nicht-genomische Effekte betreffen die ~10 % der TR, die sich außerhalb des Zellkerns befinden, wie z.B. die T₃-abhängige Interaktion von zytosolischem TRβ2 und der Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K), gezeigt in einer Hypophysenzelllinie (Storey et al. 2006).

1.1.7 T₃-regulierte Zielgene

Die Effekte von Schilddrüsenhormonen auf Entwicklung, Wachstum, Stoffwechsel, Thermogenese werden durch veränderte Expression zahlreicher Zielgene vermittelt, wobei deren Regulation in der Regel auf Transkriptionsebene erfolgt, jedoch in vielen Fällen ungeklärt ist (Bianco et al. 2002). So wurden durch Hochdurchsatzmethoden T₃-regulierte Gene identifiziert, die zum Teil eine biphasische Antwort auf T₃ zeigten (Feng et al. 2000; Weitzel et al. 2001) oder durch T₃ negativ reguliert wurden, obwohl ihre Promoter keine TRE-Konsensussequenz enthielten. Ihre T₃-Abhängigkeit wurde jedoch durch Mutagenese und *in vitro* Bindungsstudien wie EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) oder ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation) bestätigt (Flamant et al. 2006).

1.1.7.1 Wachstum und Entwicklung

T₃ fördert das Wachstum sowohl zentral über die Stimulation der hypophysären Produktion von GH (Wachstumshormon) (Giustina und Wehrenberg 1995; Kamegai et al. 2004) sowie peripher an der Epiphysenfuge der Knochen (Stimulation der endochondralen Ossifikation) (Shao et al. 2006). Entsprechend kann Hypothyreose in der Entwicklungsphase zu Minderwuchs führen mit verzögerter Knochenreifung, Desorganisation des Epiphysenknorpels und Beeinträchtigung der Differenzierung von Chondrozyten (Bassett et al. 2006). Im adulten Organismus erhöht T₃ den Knochenumsatz durch Aktivierung von Osteoklasten und Osteoblasten und beeinflusst damit die Knochenmasse und -stabilität. Diese Effekte werden durch die T₃ regulierten Gene wie Kollagen, Alkalische Phosphatase, und Rezeptoren für *fibroblast growth factor* (FGFR) vermittelt (Bohme et al. 1992; Stevens et al. 2003).

Eine weitere wichtige Rolle übernimmt T₃ in der Entwicklung des ZNS (Howdeshell 2002). Ein T₃-Mangel während der embryonalen Gehirnentwicklung führt zu schweren permanenten Schäden und mentaler Retardierung (Nunez 1984). Die relevanten T₃-abhängigen Gene sind Hairless Corepressor, Neurogranin und BTEB (*basic transcription element-binding protein*) (Thompson 1996; Guadano-Ferraz et al. 1997; Morita et al. 2003). Die Entwicklung des Innenohrs wird ebenso von T₃ beeinflusst, so dass eine kongenitale Hypothyreose zu Hörverlust führen kann (Howdeshell 2002).

1.1.7.2 *Stoffwechsel und Thermoregulation*

T₃ beeinflusst zahlreiche Stoffwechselprozesse – nicht nur über die Genexpression in Zielorganen, sondern auch durch Transkriptionsregulation der thyreotropen Achse (DIO, TPO, TG). Damit erfolgt die Feedbackregulation auch auf Transkriptionsebene (Koenig 2005).

Im Energiestoffwechsel beeinflussen TH insbesondere die Umsetzung von Fetten und Kohlehydraten. Fettmobilisierung und Liponeogenese wird durch Induktion der Gene des Malatenzyms (ME), einem Schlüsselenzym in Glykolyse und Citrat-Zyklus (Nikodem et al. 1989), der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, der Fettsäuresynthase, sowie von Spot14 - einem Aktivator der Fettsäuresynthase vermittelt (Klein und Ojamaa 2001). Die Senkung des Cholesterin-Spiegels erfolgt durch reduzierte Expression von Apolipoprotein A-1 (ApoA-1), Cholesterin-7 α -Hydroxylase (Cyp7), und Induktion von hepatischen LDL-Rezeptoren (Ness et al. 1998). Im Kohlehydratstoffwechsel beschleunigt T₃ die intestinale Resorption, steigert die Glukoneogenese, Glykolyse, Glykogensynthese und Glykogenolyse. So reguliert T₃ unter anderem die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) als Geschwindigkeits-bestimmendes Enzym der Glukoneogenese und induziert den Glucosetransporter GLUT-4 im Skelettmuskel und Fettgewebe (Casla et al. 1990). Im Proteinstoffwechsel wirken Schilddrüsenhormone in niedrigen Konzentrationen anabol und können der Entwicklung einer Adipositas entgegenwirken, indem sie den Grundumsatz erhöhen (Lanni et al. 2001). So verstärken TH die Expression der mitochondrialen Entkopplungsproteine (UCP1-3) und damit den Grundumsatz im Skelettmuskel, weißen und braunen Fettgewebe (Lanni et al. 2003). Im braunen Fettgewebe wird damit die Thermogenese induziert, ebenso wie durch die T₃-vermittelte Expression von Genen der Na⁺/K⁺-ATPase (Yalcin et al. 1999).

1.1.7.3 *Herz-Kreislauf-System*

Parallel zur Steigerung des Stoffwechsels stimuliert T₃ den Kreislauf indem es auf das Myokard positiv chronotrop und inotrop wirkt. Dies erfolgt u.a. durch die verstärkte Expression von Proteinen des Sarkomers wie beispielsweise MHC β , der adrenergen Signaltransduktion, sowie von Ionenkanälen (Dillmann 2002). Dazu gehören die Induktion des beta-Adrenorezeptors, des kardialen Schrittmacherproteins HCN-2, der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (SERCA), der Na⁺/K⁺-ATPase sowie TR α 1,

Phospholamban, Adenylatzyklase Typ V und VI und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Exchanger (Klein und Ojamaa 2001).

Die Effekte von T_3 auf die Herzmuskulatur und auf den Stoffwechsel werden vorwiegend von $\text{TR}\alpha 1$, die Cholesterin-senkende Wirkung hauptsächlich durch $\text{TR}\beta 1$ vermittelt so dass sich mit $\text{TR}\beta$ -spezifische Liganden Steigerungen der metabolischen Rate ohne den Nebeneffekt der Tachykardie erzielen lassen. Demzufolge sind β -selektive TR-Liganden potentielle Therapeutika zur Behandlung von Diabetes und Adipositas (Grover et al. 2007).

1.2 Erkrankungen der Schilddrüse

Schilddrüsenerkrankungen können genetische, immunologische, neoplastische oder umweltbedingte Ursachen haben, die langfristig zu einer Hyper- oder Hypothyreose, also einer Über- oder Unterfunktion der Schilddrüse führen können; dazu gehören Neoplasien und insbesondere auch Autoimmunerkrankungen sowie durch Iodmangel erzeugte Vergrößerungen der Schilddrüse, die als Struma bezeichnet werden. Besonders die umweltbedingten Ursachen spielen eine große Rolle, da sie einerseits zu einem Großteil der Erkrankungen beitragen und andererseits vergleichsweise leicht zu beeinflussen sind. Dabei ist vor allem in Zeiten starker hormoneller Veränderungen wie Pubertät, Schwangerschaft und Stillzeit sowie Klimakterium eine ausreichende Iodversorgung mit 150 - 300 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ von besonderer Bedeutung, die jedoch oftmals nicht über den Nahrungsweg gedeckt werden kann, wodurch bei ausbleibender Supplementation das Risiko auftretender Folgeerscheinungen wächst.

1.2.1 Hypothyreose

Die Entstehung von Hypothyreosen ist in 90 % der Fälle auf eine Fehlfunktion der Schilddrüse selbst zu zurückzuführen, während die verbleibenden 10 % auf einer Fehlregulation der Schilddrüsenfunktion beruhen. Die in Tab. 1 aufgeführten pathogenetischen Ursachen reichen von genetisch und autoimmun zu iatrogen und umweltbedingt, wobei das klinische Bild altersabhängig ist: Während der Embryonalentwicklung kann eine T_3 -Defizienz zu Wachstumsstörungen und schwerer mentaler Retardierung („Kretinismus“) führen, bei der neonatal mit einer Inzidenz von 1:3000 Probleme mit der Nahrungsaufnahme, Verstopfung, Teilnahmslosigkeit und persistierender Ikterus im Vordergrund stehen (Nunez 1984; Zoeller et al. 2002).

Unbehandelt erfolgt die Entwicklung zum Kretinismus mit kleiner Statur, vorstehender Zunge, vorgewölbtem Abdomen und mentalen Problemen innerhalb weniger Monate. Im älteren Kind zeigen sich bei geringem Größenwachstum, mentaler Retardierung und verzögerter Geschlechtsreife schlechte schulische Leistungen. Im adulten Organismus kontrolliert der T_3 -Stoffwechsel (Gewichts- und Thermoregulation), Herzfunktion, Tag-Nacht-Rhythmus und Stimmung (Yen 2001). Die Symptome bei Hypothyreose im Erwachsenen sind unspezifisch und reichen von Lethargie, Konstipation, Kälteintoleranz und Krämpfen, auf die im Verlauf reduzierte Aktivität und Appetit bei Zunahme des Körpergewichtes folgt. Schließlich kann sich ein Myxödem entwickeln mit dünnen Haaren, teigiger kalter Haut und das Herz kann dilatieren (Fauci et al. 2008).

Schwere unbehandelte Hypothyreose kann zu Herzinsuffizienz, Psychose und Koma führen. Da sich Schilddrüsenerkrankungen auch psychiatrisch manifestieren können (Bauer und Whybrow 2001) habe Sie neben der medizinischen auch eine soziale Bedeutung (Darras et al. 1999).

In der Regel lässt sich die Hypothyreose nachdem die Diagnose durch Serumwerte von TSH, T_3 , T_4 , Funktionstests und bildgebende Verfahren gestellt ist durch Supplementation mit synthetischen Schilddrüsenhormonen gut behandeln (Levothyroxin). Leider ist die Dosierung in vielen Patienten noch immer suboptimal (Roberts und Ladenson 2004).

1.2.2 Hyperthyreose

Die Ursachen für Hyperthyreose sind meist immunogen (*Morbus Basedow*), umfassen jedoch auch Neoplasien und Infektionen, sowie die Überdosierung mit Schilddrüsenhormonen (Tab. 1). *Morbus Basedow* ist eine recht häufige Erkrankung insbesondere bei Frauen im 30. bis 40. Lebensjahr. Häufig manifestiert sich die Erkrankung mit Nervosität, Schlaflosigkeit, Hitzeintoleranz und Gewichtsverlust. Bei älteren Patienten ist besonders das Herz mit betroffen. Der *Morbus Basedow* zeigt zusätzlich den charakteristischen Exophthalmus (Hervortreten des Augapfels). Insbesondere bei schwerer Symptomatik ist die Hyperthyreose leicht zu diagnostizieren und wird durch Serumuntersuchungen und bildgebende und Funktionsdiagnostik der Schilddrüse komplettiert. Die medikamentöse Behandlung wird in jungen Patienten bevorzugt (vgl. 1.4.1), während operative Eingriffe und

Radioiodtherapie besonders in älteren Patienten zur Anwendung kommen (Fauci et al. 2008). Bei der Wiederherstellung normaler Schilddrüsenfunktion bessert sich in der Regel auch eine assoziierte abnorme Hämodynamik im Herzen (Klein und Danzi 2007).

Tab. 1: Ursachen von Hypo- und Hyperthyreose.

Hypothyreose	Hyperthyreose
Angeborene primäre <ul style="list-style-type: none"> • Dysgenese • Pendred-Syndrom 	Häufig <ul style="list-style-type: none"> • Morbus Basedow (immunogene diffuse Struma) • multifokale Struma • autonomes Adenom • exogen (durch Schilddrüsenhormone) • subakute oder stumme Thyreoiditis
Erworbene primäre <ul style="list-style-type: none"> • Iodmangel • Hashimoto Thyreoiditis • z.n. Radioiodtherapie oder OP 	
Sekundäre <ul style="list-style-type: none"> • Hirntumor 	
	Selten <ul style="list-style-type: none"> • TSH-produzierendes Adenom • embryonales Hodenkarzinom, Chorionkarzinom, Struma ovarii

1.2.3 Schilddrüsendiagnostik

Die Schilddrüsendiagnostik umfasst vorwiegend die Bestimmung von TSH sowie die Messung von freiem T₄ oder Gesamt-T₄ und -T₃, da diese von der Konzentration der Plasmaproteine abhängt und nur 1 % der Schilddrüsenhormone in freier Form vorliegt. Entsprechend hohe Gesamt-T₄-Spiegel finden sich in der Schwangerschaft oder bei Einnahme von Kontrazeptiva, da Östrogene die TBG Konzentration erhöhen. Mittlerweile sind Tests verfügbar, welche die freie Hormonkonzentration verlässlich messen. Bildgebende Verfahren zur Schilddrüsendiagnostik sind der Ultraschall zur strukturellen Untersuchung der Gewebestruktur und zur Kontrolle bei Feinnadelbiopsie und die Szintigraphie, um die Aufnahme radioaktiver Nuklide zu verfolgen u.a. zum Ausschluss maligner Erkrankungen (Fauci et al. 2008).

1.2.4 Non-Thyroidal-Illness

Serumspiegel der Schilddrüsenhormone können nicht nur bei primären Erkrankungen der Schilddrüse verändert sein, sondern auch bei Hunger, Sepsis, postoperativ nach jeder schweren Grunderkrankung (De Groot 1999). Am Pathomechanismus sind

sowohl der Hypothalamus, als auch reduzierte Umwandlung von T_4 in T_3 beteiligt (De Groot 2006), zum Teil infolge der Wirkung von Interleukin- 1β (IL- 1β), das in Patienten sowohl DIO1-Expression und -Aktivität erniedrigt (Jakobs et al. 2002).

Im Tiermodell kann diese Erkrankung durch Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) in subletaler Dosis rekapituliert werden (Boelen et al. 1995). Von den unterschiedlichen Zytokinen, die durch LPS induziert werden, führte allein Interferon- γ (INF γ) im Gegensatz zu IL 1α , IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) zu reduzierten Serumspiegeln von T_3 und T_4 , bei unverändertem TSH-Spiegel (Boelen et al. 1995). Demzufolge wird die Schilddrüsenfunktion nicht nur durch Hypothalamus und Hypophyse reguliert, sondern zusätzlich u.a. durch Zytokine.

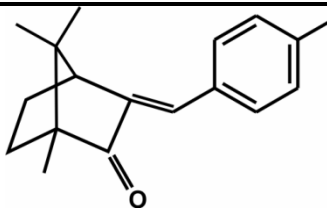
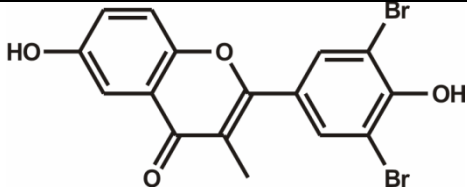
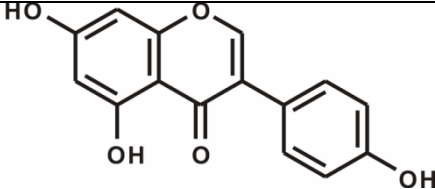
1.3 Endokrin aktive Substanzen (EACs)

1.3.1 Definition - Endokrin aktive Substanzen

Als EACs bezeichnet man Substanzen mit hormon-agonistischer bzw. -antagonistischer Wirkung, welche hormonelle Regelkreise in Mensch und Tier stören und damit physiologische Funktionen sowie die Entwicklung und auch das Immunsystem beeinträchtigen können (Cooke et al. 2004). EACs sind zum einen Pflanzeninhaltsstoffe wie (Iso-) Flavonoide (z.B. in Soja und Hirse) und Polyphenole, die in vielen Nahrungsmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln enthalten sind (Elnour et al. 1998; Tuohy 2003b) andererseits synthetische Stoffe, die sich als Bestandteile von z. B. Pestiziden, Kunststoffen, Schmierstoffen, Lacken und vor allem auch Kosmetika letztlich in der Nahrungskette anreichern (Chen 2001). Beispiele für endokrin aktive Substanzen sind in Tab. 2 aufgelistet.

Entsprechend der vielfältigen hormonellen Effekte im Organismus zeigen auch EACs eine breite Wirkung auf Stoffwechsel, Wachstum, und Entwicklung. So wurde beispielsweise an Fischen und Amphibien gezeigt, dass aus Abwässern eingetragene Kontaminanten mit EAC-Wirkung Missbildungen wie Feminisierung bei Männchen und Beeinträchtigung der Fortpflanzung, also eine Störung der gonadotropen Achse, verursachen können (Toppari 2002). Effekte auf die Reproduktion werden zum Teil sogar auf die nachfolgende Generation weitergegeben, möglicherweise über veränderte Methylierung der DNA in der Keimbahn (Anway et al. 2005).

Tab. 2: Endokrin aktive Substanzen (EACs).

Gruppe	Substanz	Strukturformel
UV-Filter	4-MBC	
Flavonoide	F21388	
	Genistein (GEN)	

1.3.2 Exposition

EACs finden sich unter anderem als UV-Absorber in Kosmetika oder Weichmacher in Kunststoffen (Schlumpf et al. 2008; Schonfelder et al. 2002). Weiterhin sind Fungizide und Herbizide sowie bestimmte Brandschutzmittel potente EAC (Anway et al. 2005; Siddiqi et al. 2003; Fei et al. 2005; Talsness et al. 2005). Die Exposition wird zum Teil durch Grenzwertregelungen eingeschränkt, diese hängt jedoch stark von der lokalen Gesetzgebung ab. So ist die Verwendung des UV-Absorbers 4-MBC in der EU in Mengen bis zu 4 % und in Kanada erlaubt (*Scientific Committee for Cosmetic Products & Non-Food Products*; Health Canada), nicht jedoch in Japan und USA (*Food and Drug Administration*, FDA).

Humanrelevante EACs können auch natürlichen Quellen wie Nahrung oder Nahrungsergänzungsmitteln entstammen (Mennen et al. 2005; Elnour et al. 1998; Tuohy 2003a; Köhrle et al. 1988). Da viele dieser EAC chemisch stabil und hydrophob sind, können als „Umweltchemikalien bzw. -hormone“ oder „Persistente Organische Schadstoffe“ (*persistant organic pollutants*, POP) z.B. in Fettgewebe von Tier und Mensch oder in der Muttermilch bioakkumulieren (Toppari 2002). Verstärkt durch die Mobilisierung von EAC aus dem Fettgewebe in Schwangerschaft und Stillzeit wird so der Nachwuchs geschädigt. Generationsübergreifende Effekte der EAC können jedoch auch über epigenetische Mechanismen vermittelt werden (Anway et al. 2005). Auch

der adulte Organismus kann durch eine hochkonzentrierte oder chronische EAC-Exposition einem temporären oder dauerhaften Gesundheitsrisiko ausgesetzt sein (Brawer et al. 1978).

1.3.3 Wirkung von EACs auf das Endokrinum

Die gut belegte östrogene/androgene bzw. antiöstrogene/antiandrogene Wirkung von EAC ist durch ihre Strukturähnlichkeit zu Steroidhormonen begründet, durch die EAC an Steroidhormonrezeptoren binden können. Damit beeinflussen sie die Proteinbiosynthese in unterschiedlichen Organen und nehmen direkten Einfluss auf die Feedbackregulation hormoneller Systeme. Dies betrifft nicht nur die gonadotrope, sondern auch die thyreotrope Achse (Shiraishi et al. 2003; Jarry et al. 2004). Die EACs können das Schilddrüsenhormon-System modulieren, indem sie die Synthese der Schilddrüsenhormone, deren Freisetzung, die Plasmabindung, den Transport, die Aufnahme in die hormonrezeptiven Zellen, den Metabolismus sowie ihren Abbau in den Zielzellen/-geweben inhibieren. Dabei wirken EAS nicht nur im adulten, sondern auch im sich entwickelnden Organismus z.B. nach Passage der fetalen Blut-Hirn-Schranke (Schröder-van der Elst et al. 1998). Die fetale Blut-Hirn-Schranke ist noch nicht vollständig ausgereift, so dass EACs Einfluss auf die Entwicklung des Embryos, aber auch auf die Organisation des endokrinen Netzwerkes und die Einstellung der „hormonalen Sollwerte“ (*Setpoint*) nehmen (perinatale Programmierung) (McLachlan 2001).

Schließlich unterliegen die Effekte der EAC - anders als Effekte endogener Hormone - nicht der natürlichen physiologischen Regulation (Aktivierung/Inaktivierung, Abbau/Exkretion). Damit bietet das endokrine System zahlreiche potentielle Ziele für eine Störung durch die EACs.

Auf molekularer Ebene wirken EACs nicht nur über die TRs TR α und TR β (Bogazzi et al. 2003; Xiao et al. 2004), sondern auch durch Bindung an die Transportproteine TTR, Albumin und TBG (van den Berg 1990) sowie TSH-R (Santini et al. 2003). Für einige (Iso-)Flavonoide ist überdies bekannt, dass sie einerseits die Funktion der Schilddrüse wie auch die Hormonsekretion und die Verfügbarkeit von T₃ und T₄ für die Zielgewebe negativ beeinflussen (Hamann et al. 2006). EACs können über NIS in laktierenden Brustzellen den Iodidtransport zwischen der Mutter und dem Neugeborenen beeinträchtigen (van der Heide et al. 2003).

1.3.4 UV-Filter - 4-Methylbenzyliden-campher (4-MBC)

Vor allem die als UV-Filter in Sonnenschutzcremes und verschiedenen anderen Kosmetika eingesetzten EAC wie Benzophenon-2 (BP-2), Octylmethoxycinnamat (OMC) und 4-Methylbenzylidencampher (4-MBC) können in unterschiedlichen Organismen Gesundheit und Reproduktion beeinträchtigen.

Nach topischer Applikation konnten sie photoallergische Kontaktdermatitis und systemische Photoallergie auslösen (de Groot et al. 1987; Buckley et al. 1993) und waren bereits 2h nach dem Auftragen von 10% (w/w) *Essex Cream* (Schering-Plough, Brüssel) im Plasma nachzuweisen (16 ng/ml in weiblichen gegenüber 14 ng/ml in männlichen Probanden) (Janjua et al. 2004). FSH und LH waren im Gegensatz zu Testosteron (leichte Veränderung nach 1-2 Wochen) unverändert (Janjua et al. 2004; Janjua et al. 2008). In Bezug auf die Schilddrüse waren in Mann und Frau nach 2 Wochen FT₄, FT₃ und T₃ erhöht, jedoch kein Effekt auf TSH nachweisbar (Janjua et al. 2007).

Mit Akkumulation von UV-Filtern in Flüssen und Seen (Buser et al. 2006) gelangen UV-Filter in Fische und führten abhängig von Fischart und Biotop zu veränderter Genexpression (Inui et al. 2003). In *Xenopus laevis* (*X. laevis*) beeinträchtigten UV-Filter die Funktion der Schilddrüsen- und Geschlechtshormone in der Metamorphose (Kunz et al. 2004).

Das Gros der beschriebenen Effekte von UV-Filtern ist östrogen. In der Erstbeschreibung wurde der Einfluss auf das Uteruswachstum zur Untersuchung der Östrogenen/Antiöstrogenen Effekte herangezogen (Schlumpf et al. 2001). In der Ratte wirkte 4-MBC sowohl nach transdermaler, oraler und subkutaner Applikation uterotroph (Schlumpf et al. 2001; Tinwell et al. 2002). Die Dokumentation der östrogenen Wirkung von EACs konnte in Zellkultur über die östrogen-abhängige pS2-Genexpression erfolgen, wobei 4-MBC in der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 als Mitogen wirkte (Heneweer et al. 2005). Auf Expressionsebene wirkt 4-MBC präferentiell über ER β und führte zu veränderter Expression von ER α , ER β , PR, IGF-1 und AR im Uterus (Durrer et al. 2005). Neben dem Uterus sind Effekte von 4-MBC auf den Hypothalamus und die männlichen Geschlechtsorgane beschrieben (Maerkel et al. 2007; Durrer et al. 2007). 4-MBC verzögerte die männliche Pubertät und führte zu erhöhtem Gewicht der Hoden bei reduziertem Gewicht der Prostata, die veränderte Expression von AR, IGF-1 und

ER α / β zeigte (Durrer et al. 2007). In *X. laevis* bewirkte die Bindung und Aktivierung von ER durch 4-MBC eine veränderte hepatozytäre Expression. Die Bindung an ER und dessen erhöhte mRNA-Expression könnte die Effekte von 4-MBC auf die Embryonalentwicklung vermitteln (Klann et al. 2005).

In der neueren Literatur wurde neben den östrogenen Effekten erstmals eine Wirkung von UV-Filtern auf die Schilddrüse beschrieben. So inhibieren 4-MBC, OMC und BP-2 die Aktivität der DIO1 in Leber und Niere (Schmutzler et al. 2004). Im Gegensatz zu den Flavonoiden (vgl. 1.3.5) war kein Einfluss von 4-MBC auf TPO nachweisbar (Schmutzler et al. 2007).

1.3.5 Nahrungsmittelbestandteile und -ergänzungsmittel (Soja, Genistein)

Für Soja ist schon in den frühen 60er Jahren eine goitrogene (strumabildende) Wirkung und damit ein starker Effekt auf die thyreotrope Achse beschrieben worden (van Wyk et al. 1959; Hydovitz 1960). Auch heute können Sojaprodukte und deren Inhaltsstoffe insbesondere in Zusammenhang mit der teilweise unzureichenden Iodversorgung in Deutschland die Strumabildung mit bedeutenden Folgekosten für das Gesundheitssystem verstärken.

Genistein (GEN) gehört zur Klasse der Isoflavone und ist beispielsweise in Soja (*Glycine max*) oder Klee (*Trifolium pratense*) enthalten. GEN ist als Phytoöstrogen bekannt und wird u. a. als Alternative zur Hormon-Ersatz-Therapie verwendet, ohne dass die endokrinen Effekte abschließend beurteilt sind (Wuttke et al. 2006). Säuglingen sind bei Fütterung mit Sojaformulierungen als Milchersatz, die meist über bis zu 4 Monate erfolgt, in einer kritischen Entwicklungsphase hohen GEN-Konzentrationen ausgesetzt, die zur Strumenbildung bei Kleinkindern führen kann (Doerge und Sheehan 2002). In der schwangeren Ratte wurde Genistein-Aglycon bei maternalen Serumspiegeln, die auch in menschlichen Probanden auftraten, über die Plazenta auf den Embryo übertragen und war im embryonalen Gehirn nachweisbar. In Erwachsenen konnte bereits kurzzeitige Exposition (eine sojareiche Mahlzeit) Parameter der Schilddrüsenfunktion, wenn auch gering und vorübergehend, verändern (Hampl et al. 2008).

Auf molekularer Ebene wirkt GEN auf T₃-vermittelte Genexpression, verändert die Konzentration an freiem Hormon durch Verdrängung von FT₄ aus der Bindung an TTR (Radovic et al. 2006) und kann zudem Hormonsekretion und die Verfügbarkeit von T₃

und T_4 für die Zielgewebe negativ beeinflussen (Chen und Rogan 2004). GEN blockiert als alternatives Substrat die Tyrosiniodierung durch das Enzym TPO in Konzentrationen, die unter Berücksichtigung der Exposition physiologisch relevant sind (Divi und Doerge 1996). Dabei ist die Inhibition von TPO zumindest in der Ratte nicht mit einem hypothyreoten Effekt assoziiert (Chang und Doerge 2000). Weiterhin wirkt GEN auf Tyrosinkinase und damit einerseits auf den Stoffwechsel von Schilddrüsenhormonen über die Phosphorylierung von Deiodasen (Mori et al. 1996) sowie andererseits auf Signaltransduktion als Antagonist des A1-Adenosin-Rezeptors auf TSH-induzierte Phospholipase C-Aktivierung (Okajima et al. 1994).

In der Gewichtung der molekularen Effekte von Flavonoiden steht die Inhibition der Deiodasen und die hochaffine Verdrängung von LT_4 von TBPA im Vordergrund. Zusätzlich wirken sie als schwache Inhibitoren der Bindung von T_3 an den nukleären TRs (Köhrle et al. 1988).

1.4 Klassische Vergleichssubstanzen

Als Kontrollsubstanzen eignen sich grundsätzlich alle Substanzen, deren Wirkung auf die thyreotrope Achse umfassend charakterisiert ist. Neben den Schilddrüsenhormonen T_4 und T_3 (vgl. 1.1) gehören dazu auch die zur Behandlung von Hyperthyreose eingesetzten Thyreostatika. Eine weitere relevante Substanzklasse bilden die endogenen Steroide, zu denen auch das E_2 gehört, dessen Wirkung auf die hypophysäre Regulation des Feedbacksystems wie auch auf die Schilddrüse in der Literatur beschrieben sind (Seidlova-Wuttke et al. 2006; Lima et al. 2006).

1.4.1 Thyreostatika - Propylthiouracil, Methimazol und Perchlorat

Thyreostatika werden zur Behandlung der Hyperthyreose eingesetzt und können auf unterschiedlicher Ebene die Schilddrüsenfunktion beeinflussen. So inhibieren die Substanzen Methimazol (MMI) und PTU die Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 vor allem durch Blockade der TPO, welche die Umwandlung von T_4 in T_3 katalysiert. Perchlorat ($NaClO_4$) ist ein kompetitiver Inhibitor von NIS, dessen Wirkung insbesondere von der Iodaufnahme abhängt (Schmutzler et al. 1997).

1.4.2 Synthetische Flavonoide - F21388

Das synthetische Flavonoid F21388 hat strukturelle Ähnlichkeit mit T_4 und wurde ursprünglich als T_4 -Analogon entwickelt (Köhrle et al. 1988). Flavonoide wirken auf die Schilddrüsenhormonachse, indem sie T_4 von TTR verdrängen (van der Heide et al. 2003). F21388 inhibiert zusätzlich DIO1 und TPO, sowie die Expression von NIS (Köhrle et al. 1988; Köhrle et al. 1989; Köhrle 1992; Schröder-van der Elst et al. 2004; Hamann et al. 2006).

1.4.3 Endogene Steroide - Estradiolbenzoat (E_2)

Estradiolbenzoat (E_2) bewirkte bereits in Dosen von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nach einer Woche Behandlung einen zweifach erhöhten TSH-Spiegel in männlichen Ratten (De Lean A. und Labrie 1977). Dieser Effekt wurde durch eine Sensibilisierung für TRH vermittelt (Lean et al. 1977). Östrogene und Schilddrüsenhormone wirken antagonistisch, da die negative Wirkung von Schilddrüsenhormone auf die TRH-abhängige Sekretion von TSH durch Östrogene aufgehoben werden kann (De Lean A. und Labrie 1977). Dabei ist der Wirkmechanismus der Östrogene stärker als der der TH auf die Erhöhung der TRH-Rezeptoren in der Hypophyse beschränkt (De Lean A. und Labrie 1977).

1.5 Verwendete Tiermodelle

1.5.1 Ovariectomierte Sprague-Dawley-Ratten

EACs können organspezifisch östrogene Effekte zeigen. Diese östrogene Wirkung wird an der E_2 -substituierten ovariectomierten Ratte untersucht, um einerseits zyklusbedingte Schwankungen auszuschließen, andererseits um sensitiv Östrogenartige Wirkungen nachzuweisen (Maeda et al. 1989). Wenn E_2 substituiert wird, fallen die durch Ovariectomie erhöhten LH-Spiegel, so dass über Messung von LH östrogene Effekte abgelesen werden können (Cagampang et al. 1991).

1.5.2 $TR\alpha^{0/0}$ -Mäuse

Die Verwendung von $TR\alpha$ -defizienten Mäusen ermöglicht die Evaluation einzelner Proteine in Physiologie und Pathophysiologie. Im $TR\alpha^{0/0}$ -Modell sind durch homologe Rekombination alle Splicevarianten des $TR\alpha$ -Locus deletiert (Gauthier et al. 1999).

Trotzdem zeigt das Knockout-Modell zeigt einen normalen basalen Schilddrüsenstatus (Gauthier et al. 1999), der mit einer erhöhten Sensitivität für Schilddrüsenhormone in Hypophyse und Leber assoziiert ist (Macchia et al. 2001). Die $TR\alpha^{0/0}$ -Tiere zeigen eine normale Embryonalentwicklung und sind fertil. Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren sind sie jedoch deutlich kleiner und leichter, obwohl die mRNA-Level von GH in der Hypophyse nicht auffällig verändert sind. Heterozygote Tiere weisen diese Größen- und Gewichtsunterschied nicht auf. Ein phänotypisch sehr auffälliges Merkmal ist die deutlich verminderte Knochenreifung, die sich durch eine herabgesetzte endochondrale Ossifikation auszeichnet. Aufgrund der unbeeinflussten GH-Spiegel, kann man einen Defekt der skeletalen T_3 -Responsivität vermuten, die auf die Deletion des Rezeptors $TR\alpha$ zurückzuführen ist (Gauthier et al. 2001). Die Tiere zeigen einen relativ stark ausgeprägten Darm-Phänotyp, weil die Mucosa des Dünndarms in ihrer Epithelhöhe reduziert ist und die Zahl der Epithelzellen pro Krypte/Villus vermindert ist (Plateroti et al. 2001).

Da die Auswertung unserer Vorversuche in Wildtyp-Mäusen auf zwei unterschiedlichen genetischen Hintergründen (129S2/SvPasCrl- und C57Bl/6) keinen Hinweis auf thyreomimetische Wirkungen der EACs ergaben, war es wichtig, ein Modell zu wählen, in dem man die hauptsächlich inhibitorischen Wirkungen der Substanzen verfolgen kann, die sich in der Regel in einer Zunahme der Serumwerte für TSH und einer Abnahme von T_4 und T_3 im Sinne des negativen Feedbackmechanismus widerspiegeln.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Funktion der Schilddrüsenhormone ist essentiell in Entwicklung, Wachstum, adultem Stoffwechsel. Störungen der thyreotropen Achse auf unterschiedlicher Ebene und pathogenetischer Grundlage führen zu Hypo- oder Hyperthyreose, die als Volkskrankheiten eine wichtige Stellung im Gesundheitssystem einnehmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Wirkprofils ausgewählter EACs hinsichtlich ihrer Effekte auf die thyreotrope Achse. Der Schwerpunkt war die Untersuchung der Feedbackregulation im experimentellen Tiermodell. Die entscheidenden T_3 -regulierten Endpunkte sollten in Bezug auf die Veränderung von Enzymaktivitäten, Genexpression und Morphologie der Schilddrüse ausgewertet werden, um von diesen Parametern ausgehend, den Wirkmechanismus der

ausgewählten EACs aufzuklären. Die zur Analyse ausgewählten Substanzen 4-MBC und GEN repräsentieren als synthetischer UV-Filter bzw. natürlicher Nahrungsmittelbestandteil Verbindungen, deren positive Effekte bisher nicht ausreichend der möglichen schädigenden Wirkung gegenübergestellt wurden. Sie sind in industrialisierten Ländern weit verbreitet, so dass die Exposition unvermeidlich ist und können aufgrund ihrer Struktur beispielsweise im Fettgewebe akkumulieren. Die EACs sollten im Tiermodell subakut und chronisch appliziert werden, um im Vergleich der Geschlechter und von Wildtyp- und TR α -defizienten Tieren den molekularen Mechanismus in Bezug auf die thyreotrope Achse und den Einfluss der gonadotropen Achse zu analysieren.

Da Schilddrüsenhormone eine Schlüsselrolle bei Embryonalentwicklung, Wachstum und Differenzierung übernehmen, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass EACs bei perinataler und postnataler Aufnahme, z.B. über die Muttermilch, die Entwicklung folgeschwer beeinflussen. Ziel der Arbeit ist damit nicht ausschließlich die Untersuchung zum Mechanismus der EACs, sondern auch eine Risikoabschätzung bei akuter und chronischer Exposition zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert im Text vermerkt, in *pro analysis*-Qualität oder in höchstmöglicher kommerziell erhältlicher Reinheit über folgende Firmen bezogen: Bio-Rad Laboratories (München), Boehringer (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim), VWR International (Hannover).

2.1.2 Molekularbiologische Reaktionssysteme

Tab. 3: Molekularbiologische Reaktionssysteme.

Reaktionssystem	Bezugsquelle
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
iScript [™] cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories (München)
MycoAlert [™]	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L. (Verviers/Belgien)
PureYield [™] Plasmid Midiprep System	Promega (Mannheim)
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen (Hilden)
NEBlot [™] Kit N1500L	New England Biolabs (Ipswich, MA/USA)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen A. Hartenstein (Würzburg), B. Braun Biotech International (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Merck Biosciences (Schwalbach), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), peqLab Biotechnologie (Erlangen), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) und VWR International (Hannover) bezogen.

2.1.4 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tab. 4 aufgelistet. Für spezifische Methoden benötigte Geräte werden in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

Tab. 4: Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
Autoklav	VARIOKLAV®	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Elektrophoresekammern	Blue Marine 200	SERVA (Heidelberg)
	Elektrophoresekammer MAXI	Carl Roth (Karlsruhe)
	Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
	PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin ExW S	peqLab Biotechnologie (Erlangen)
	PROTEAN II xi/XL	Bio-Rad Laboratories (München)
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Inkubator	Modell 3033	GFL (Burgwedel)
Magnetrührer	Modell L32	A. Hartenstein (Würzburg)
Mikroskope	Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss (Oberkochen)
	Wilovert 30 Standard	Hund (Wetzlar)
Mikrowellenofen	M501	Whirlpool (Schorndorf)
Netzgeräte	BluePower PLUS	SERVA (Heidelberg)
	EPS 601 Power Supply	Amersham Biosciences (Freiburg)
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW (Weilheim)
Pipetten	Research, versch. Größen	Eppendorf (Hamburg)
	8-Kanal Research 30 - 300 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfen	accu-jet®/accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
	Multipette® plus	Eppendorf (Hamburg)
Plattenschüttler	DELFIA Plateshake	PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
Präparierbesteck		Aesculap (Tuttlingen)
		FST (Heidelberg)
	Hero Knopfkanüle	Robert Helwig (Berlin)
Thermocycler	Primus 25	MWG-Biotech (Ebersberg)
	Primus 96 plus	MWG-Biotech (Ebersberg)
Trockenschrank	ST 6200	Heraeus Holding (Hanau)
Ultraschallstab	Labsonic M	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Ultraschallbad	Sonorex super RK102H	Bandelin (Berlin)
Universalschüttler	Swip SM 25	Edmund Bühler (Tübingen)
UV-Flächenstrahler	N90 M	Benda Laborgeräte (Wiesloch)
Vakuum-Manifold	MultiScreen Vacuum Manifold	Millipore (Schwalbach)
Vakuumpumpe	LABOPORT® N840.3 FT.18	KNF Neuberger (Freiburg)
Vakuumentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Power Mix L46	A. Hartenstein (Würzburg)

Waagen	Laborwaage CP2201-OCE	Sartorius (Göttingen)
	Laborwaage CP323S-OCE	Sartorius (Göttingen)
	Ultramicro 4504MP8	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Schüttelwasserbad 1086	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Cryofuge 5000	Heraeus Sepatech (Osterode)
	Megafuge 1.0R	Heraeus Holding (Hanau)
	Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
	Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
	Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
	VWR Galaxy Mini	VWR International (Hannover)

2.1.5 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, gemäß den Angaben des Handbuchs „*Molecular Cloning*“ (Sambrook und Russell 2001) hergestellt. Zur Herstellung wurde das mit der Anlage EASYpure UV™ (Barnstead International, Dubuque, IA/USA) gewonnene Reinstwasser verwendet, das nachfolgend als H₂O bidest. (*Aqua bidestillata*) bezeichnet wird. Die Sterilisation hitzestabiler Lösungen erfolgte durch Autoklavieren, während hitzelabile Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) wurden.

2.1.6 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für immunhistochemische Untersuchungen sowie Western blot-Analysen verwendet.

Tab. 5: Primäre Antikörper für Immunhistochemie (IHC)/Western blot (WB).

Antikörper	Spezies	Verdünnung (IHC)	Verdünnung (WB)	Bezugsquelle
MCT8	Kaninchen	1:250	-	Atlas Antibodies (Stockholm/Schweden)
NIS	Kaninchen	1:1000 - 1:1200	1:1000	Acris Antibodies (Hiddenhausen)
TG	Maus	1:750	-	Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA/USA)
Antikörper	Spezies	Verdünnung (IHC)	Verdünnung (WB)	Bezugsquelle
TSHβ	Kaninchen	-	1:10000	Dr. A.F. Parlow, Nat. Inst. of Diabetes, Digestive & Kidney Diseases (Torrance, CA/USA)
VEGF	Maus	1:250	-	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA/USA)

Bei speziesbedingten Unterschieden bezüglich der erforderlichen Verdünnung des primären Antikörpers wurde dies durch die Angabe verschiedener Verdünnungsstufen gekennzeichnet.

Tab. 6: Sekundäre Antikörper für Immunhistochemie (IHC).

Antikörper	gekoppelt mit	Verdünnung	Bezugsquelle
LSAB™+ System-HRP	HRP	unverdünnt	DakoCytomation (Carpinteria, CA/USA)

Tab. 7: Sekundäre Antikörper für Western blot (WB).

Antikörper	gekoppelt mit	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen	HRP	1:2000	DakoCytomation Denmark (Glostrup/Dänemark)
Anti-Maus	HRP	1:2000	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)

2.1.7 Enzyme

Soweit nicht anders im Text vermerkt, wurden alle Enzyme für Amplifizierungen, Klonierungen und Sequenzierungen von Bio-Rad Laboratories (München), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt a.M.) oder Promega (Mannheim) bezogen.

2.1.8 Nukleinsäuren

2.1.8.1 DNA-Größenmarker

Folgende DNA-Größenmarker der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M.) wurden gemäß Herstellerangaben verwendet: 50 bp DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder und PCR-Marker. Zur Genotypisierung wurde der 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt.

2.1.8.4 Vektoren

Die Klonierung der Standards für die qPCR sowie der Sonden zur Detektion der mRNA-Expression mittels Northern blot-Analyse erfolgte unter Verwendung des pGEM[®]-T Easy Vektors (Promega, Mannheim). Die Inserts wurden daraufhin mit den Primern SP6 (5'ATTTAGGTGACACTATAG^{3'}) und T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG^{3'}) amplifiziert und mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt, so dass sie zur weiteren Verwendung zur Verfügung standen.

2.1.9 Datenbanken

Tab. 9: Datenbanken.

Bezeichnung	Internetadresse
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
BRENDA	http://www.brenda-enzymes.info/index.php4
ENSEMBL	http://www.ensembl.org/index.html
Expert Protein Analysis System (ExpASy)	http://expasy.org/
Mouse Genome Informatics (MGI)	http://www.informatics.jax.org/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
Rat Genome Database (RGD)	http://rgd.mcw.edu/
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/

2.1.10 Software

Tab. 10: Software.

Bezeichnung	Bezugsquelle
AxioVision Rd. 4.6	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
Beacon Designer 3.0	Premier Biosoft International (Palo Alto, CA/USA)
ChemWindow 6.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA/USA)
Chromas Lite 2.01	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
CorelDRAW 12.0	Corel (Unterschleißheim)
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Prism Software (San Diego, CA/USA)
Hitachi UV Solutions 1.2	Hitachi Instruments (San Jose, CA/USA)

Fortsetzung Tab. 10: Software.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA/USA)
Luminex 100 IS	Luminex (Austin, TX/USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
MultiCalc V 7.2	LKB Wallac (Turku/Finnland)
Optiquant 4.0	Packard Instruments (Meriden, CT/USA)
Primer 3 Version 4.0	http://frodo.wi.mit.edu/
Reference Manager 11.0	ISI ResearchSoft (Berkley, CA/USA)
REST MCS	http://rest.gene-quantification.info
TINA 2.09	Raytest Isotopenmessgeräte (Straubenhardt)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Materialien und Lösungen für die Zellkultur

Alle für die Zellkultur verwendeten sterilen Einwegartikel wurden von der Firma Techno Plastic Products (TPP, Trasadingen/Schweiz) über Biochrom (Berlin) bezogen. Das verwendete Medium COON's-F12 sowie fötales Kälberserum (FBS, fötales bovines Serum) und Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % in 1x PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) wurden ebenfalls über Biochrom (Berlin) bezogen.

2.2.2 Zellkulturmodell

Tab. 11: Herkunft und Kulturbedingungen der Zelllinie FRTL-5.

Bezeichnung	Gewebe	Kulturbedingungen
FRTL-5 (ECACC 91030711)	Schilddrüsenzellen, Ratte	COON's-F12 + 5 % (v/v) FBS + 100 nM Na_2SeO_3 + 6H-Supplement

Diese von F.S. Ambesi-Impiombato im Jahr 1980 aus primären Thyrozyten entwickelte Zelllinie zeigt in Gegenwart von TSH alle typischen Charakteristika euthyreoter Schilddrüsenzellen und stellt somit ein allgemein anerkanntes Modell zur Untersuchung der Iodidaufnahme über das basolateral lokalisierte Transportprotein NIS in das Lumen des Thyrozyten dar (Ambesi-Impiombato et al. 1980; Marcocci et al. 1983).

Das speziell für die Kultivierung von Schilddrüsenzellen entwickelte Medium COON's-F12 enthält im Vergleich zum Medium Ham's F-12 die doppelte Menge an

Aminosäuren und Pyruvat sowie Ascorbinsäure (Ambesi-Impiombato et al. 1980). Die Zugabe von Na_2SeO_3 gewährleistete zudem eine optimale Selenversorgung der Zellen.

2.2.3 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultur der Schilddrüsenzelllinie FTRL-5 erfolgte bei 37 °C in einem CO_2 -begasteten Inkubator (HERACell®, Heraeus Holding, Hanau) bei einem CO_2 -Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in 75 cm²-Kulturflaschen (T75). Die Zellen wurden unter den in Tab. 11 beschriebenen Kulturbedingungen als Monolayer kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 - 90 % ca. alle 7 Tage im Verhältnis 1:4 unter sterilen Bedingungen (Safe 2010 Laminair, Heto-Holten, Allerød/Dänemark) passagiert. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen in kalziumfreiem Puffer (1x PBS), der eine Herabsetzung der Ca^{2+} -abhängigen Zelladhäsion bewirkt, durch Inkubation in 1 ml Dissoziationsmedium (Trypsin/EDTA) von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst. Durch Zugabe frischen Mediums wurde die proteolytische Wirkung des Trypsins zunächst inaktiviert bevor die Zellen anschließend vor der Aussaat in neue Kulturflaschen durch Triturieren vereinzelt wurden. Die Zellen wurden maximal bis Passage 30 verwendet.

6H-Supplement	Glycyl-L-histidyl-L-lysin Acetat	10 ng/ml
	Hydrocortison	10 nM
	Insulin, bovin	10 µg/ml
	Somatostatin	10 ng/ml
	apo-Transferrin	5 µg/ml
	TSH, bovin	100 µU/ml (Lagerung -20 °C).
10x PBS	NaCl	137,0 mM
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,3 mM
	KCl	2,7 mM
	KH_2PO_4	1,4 mM;
	pH 7,4 mit HCl.	
1x PBS	10x PBS	100 ml;
	H_2O bidest. ad 1000 ml.	
Na_2SeO_3	Na_2SeO_3	100 nM.

Die Konservierung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff - die Zellen wurden dazu in ihrem Kulturmedium mit 10 % (v/v) DMSO zum Schutz vor Vitalitätsverlusten sowie 10 % (v/v) FBS zunächst über Nacht bei -80 °C gelagert bevor sie in den Stickstofftank

(ARPEGE 140, Air Liquide Deutschland, Düsseldorf) überführt wurden. Um die toxische Wirkung von DMSO bei der Rekultivierung der Zellen zu minimieren, wurden die Zellen zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 500 x g, 10 Minuten) pelletiert und nach Absaugen des Einfriermediums in frischem Kulturmedium aufgenommen.

2.2.4 Inkubation der FRTL-5-Zellen mit der UV-Filtersubstanz 4-MBC

Um die Wirkung des UV-Filters 4-MBC auf die Expression von NIS in FRTL-5-Zellen zu charakterisieren, wurden die Zellen zunächst entsprechend der in 2.2.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert und je nach geplanter Inkubationsdauer bei einer Konfluenz von 80 - 90 % im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 gesplittet.

Die anschließende Inkubation der Zellen mit der Testsubstanz erfolgte über einen Zeitraum von 3 Tagen bzw. 5 Tagen in 6H-Kulturmedium. Dazu wurde der UV-Filter dem Kulturmedium mit einer Konzentration von 0,1 µM, 1 µM bzw. 5 µM aus einer 100 mM Stocklösung (DMSO) zugesetzt. Bei einem Inkubationszeitraum von 5 Tagen erfolgte ein zusätzlicher Mediumwechsel, jedoch ohne Zugabe des 6H-Supplements. Während die basale Expression von NIS anhand der in 6H-Kulturmedium kultivierten Thyrozyten ermittelt wurde, dienten mit 0,5 % DMSO inkubierte FRTL-5-Zellen als Lösungsmittelkontrolle. Thyrozyten, die in Gegenwart von 1 µM *all-trans*-Retinsäure (RA) kultiviert wurden, stellten dagegen die Positivkontrolle dar, da RA als spezifischer Inhibitor des Iodidtransports die Akkumulation von Iodid in euthyreoten Thyrozyten hemmt (Schmutzler et al. 1997). Die anschließende Isolation der RNA wie auch die Herstellung von Proteinhomogenaten erfolgte entsprechend der in der in den jeweiligen Abschnitten beschriebenen Vorgehensweise.

2.2.5 Mycoplasmenkontrolle

In regelmäßigen Abständen durchgeführte Mycoplasmenkontrollen gewährleisteten eine gleichbleibende Qualität und Effektivität der Zellkulturarbeiten. Dazu wurde das Testsystem MycoAlert™ (Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers/Belgien) gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.3 Bakterienkultur

2.3.1 Bakterienstämme

Tab. 12: Bakterienstämme.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> One Shot [®] Stbl3 [™]	F ⁻ mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str ^R) xyl-5 λ ⁻ leu mtl-1	Invitrogen (Karlsruhe)

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α wurden zunächst 2 ml einer Über Nacht-Kultur (ÜN-Kultur) in 100 ml ϕ a-Medium überimpft und bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, durch Zentrifugation (4 °C, 5.000 x g, 10 Minuten) pelletiert und anschließend in 40 ml TfbI resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubationsphase auf Eis wurden die Zellen wiederum durch Zentrifugation konzentriert und nach Entfernen des Überstandes in 4 ml TfbII erneut resuspendiert. Aliquots der Zellen wurden nach einem 15-minütigen Inkubationsschritt auf Eis zur langfristigen Aufbewahrung bei -80 °C gelagert.

ϕa-Medium	Hefeextrakt (Difco, Augsburg)	0,5 % (w/v)
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 % (w/v)
	Bacto Trypton (Difco, Augsburg)	0,2 % (w/v);
	pH 7,6 mit KOH (Lagerung 4 °C).	
TfbI	RbCl	100 mM
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	50 mM
	KAc	30 mM
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mM
	Glycerol	15 % (v/v);
	pH 5,8 mit CH ₃ COOH, Sterilfiltration (Lagerung 4 °C).	
TfbII	CaCl ₂ ·2H ₂ O	75 mM
	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerol	15 % (v/v);
	pH 6,5 mit KOH, Sterilfiltration (Lagerung 4 °C).	

2.3.2 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte auf Luria Broth (LB)-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C. Zur Vermehrung einzelner Bakterienkolonien für nachfolgende Plasmidpräparationen wurden Suspensionskulturen in LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Ampicillin angesetzt, die über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert wurden. Aliquots der jeweiligen Suspensionskulturen wurden zur längerfristigen Aufbewahrung mit 25 % (v/v) sterilem Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wurden entsprechend der im Handbuch „*Molecular Cloning*“ (Sambrook und Russell 2001) beschriebenen Protokolle durchgeführt. Bezüglich der in Tab. 3 gelisteten Reaktionssysteme wurde den Angaben der Hersteller Folge geleistet.

2.4.1 Isolation genomischer DNA

Zur Genotypisierung der TRα^{0/0}-Mäuse wurde Gewebe aus Ohrlochstanzen (ø 2 mm) verwendet, das bei der Kennzeichnung der Tiere anfiel. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte durch Aufreinigung über eine Silicamatrix, an die die DNA in Gegenwart von chaotropen Salzen spezifisch bindet (Vogelstein und Gillespie 1979). Nach Entfernung von Verunreinigungen durch Verwendung einer Ethanol (EtOH)-basierten Waschlösung wurde die DNA in H₂O bidest. aufgenommen.

Die Ohrlochstanzen wurden zunächst mindestens 2 Stunden bei 50 °C, besser aber über Nacht bei 37 °C mit Proteinase K verdaut.

Ansatz Verdau	2x DNA-Isolationspuffer	50 µl
	H ₂ O bidest.	40 µl
	Proteinase K (10 µg/µl)	10 µl.

Die Proben wurden anschließend mit 1 ml NaI-Bindelösung und 10 µl Glasmilch (50 %, v/v) versetzt, so dass die DNA während einer 15-minütigen Inkubationsphase bei RT an die Silicamatrix der Glasmilch binden konnte. Die Suspension wurde durch Zentrifugation (4 °C, 8.000 x g, 1 Minute) pelletiert, in 250 µl NaI-Bindelösung

resuspendiert und erneut durch Zentrifugation konzentriert. Durch Zugabe von 3 x 500 µl NEET-Waschlösung wurden noch in der Suspension vorhandene Ial-Reste entfernt. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge ca. 30 Minuten bei 30 °C getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 30 µl sterilem H₂O bidest. im Heizblock bei 50 °C. Nach Pelletieren der Silicapartikel (4 °C, 14.000 x g, 5 Minuten) konnte die in H₂O bidest. gelöste DNA als Template für Genotypisierungen eingesetzt werden.

2x DNA-Isolationspuffer	SDS	70 mM
	EDTA, pH 8,0	50 mM
	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	NaCl	10 mM;
	pH 7,5 - 8,0 mit NaOH.	
Glasmilch	SiO ₂ (1 - 5 µm)	50 % (w/v).
	Der Ansatz wurde nach einer 60-minütigen Ruhephase durch Zentrifugation (4 °C, 8.000 x g, 5 Minuten) pelletiert, in 50 ml H ₂ O bidest. resuspendiert und nach Zugabe von 50 ml HNO ₃ konz. kurz aufgekocht. Durch Waschen und Resuspendieren der Suspension in H ₂ O bidest. wurde pH 7,0 erreicht (Lagerung 4 °C).	
Ial-Bindelösung	Ial	6,01 M
	NaSO ₃	0,12 M (Lagerung 4 °C).
NEET-Waschlösung	EtOH	50 % (v/v)
	NaCl	100 mM
	Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM (Lagerung 4 °C).

2.4.2 Genotypisierung der TRα^{0/0}-Mäuse

Die Genotypisierung der TRα^{0/0}-Mäuse erfolgte gemäß des etablierten Protokolls der AG Prof. Dr. J. Samarut, École normale supérieure de Lyon (ENS), Lyon/Frankreich (Primersequenzen siehe Anhang Tab. 20). Dabei konnten das TRα-Wildtyp- und das TRα-Knockout-Allel in einem parallelen PCR-Ansatz dargestellt werden, während der Nachweis des TRβ-Wildtyp-Allels in einem separaten Ansatz erfolgte. Für die PCR, deren Prinzip in 2.4.3 erläutert ist, wurden die folgenden Pipettierschemata und Thermocycler-Programme verwendet.

TRα-Wildtyp- (115 bp)/Knockout-Allel (660 bp)		Programm		
10x PCR-Puffer ^a	2,50 μ l	Denaturieren	95 °C	5 min
MgCl ₂ (25 mM)	0,75 μ l	Denaturieren	94 °C	20 sec
dNTP (2 mM) ^b	1,25 μ l	Annealing	60 °C	20 sec
FF9828 (250 ng/ μ l)	0,30 μ l	Elongation	72 °C	60 sec
FF9829 (250 ng/ μ l)	0,30 μ l	Denaturieren	94 °C	20 sec
FF9830 (250 ng/ μ l)	0,30 μ l	Annealing	56 °C	20 sec
FF9831 (250 ng/ μ l)	0,30 μ l	Elongation	72 °C	60 sec
<i>Taq</i> -Polymerase ^a	0,20 μ l	Elongation	72 °C	2 min
Template-DNA	1,00 μ l		8 °C	∞
H ₂ O bidest. ad	25,00 μ l			

TRβ-Wildtyp-Allel (600 bp)		Programm		
10x PCR-Puffer ^a	2,50 μ l	Denaturieren	94 °C	2 min
MgCl ₂ (25 mM)	0,75 μ l	Denaturieren	94 °C	20 sec
dNTP (2 mM) ^b	1,25 μ l	Annealing	58 °C	20 sec
beta forward (250 ng/ μ l)	0,30 μ l	Elongation	72 °C	60 sec
beta reverse (250 ng/ μ l)	0,30 μ l	Denaturieren	94 °C	20 sec
<i>Taq</i> -Polymerase ^a	0,20 μ l	Annealing	56 °C	20 sec
Template-DNA	1,00 μ l	Elongation	72 °C	60 sec
H ₂ O bidest. ad	25,00 μ l	Elongation	72 °C	2 min
			8 °C	∞

^a Genecraft (Lüdinghausen); ^b Amersham (Freiburg)

Die elektrophoretische Trennung der mit einer entsprechenden Menge an 6x DNA-Probenpuffer versetzten PCR-Produkte erfolgte im 2 %igen (w/v) SB-Agarosegel bei 220 V. Zur Visualisierung der *double stranded* DNA (dsDNA)-Fragmente wurde dem hier verwendeten 1x SB-Elektrophoresepuffer 0,1 μ g/ml des dsDNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde der 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) parallel mitgeführt. Die Detektion der dsDNA erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems CN-UV/WL der Firma Vilber Lourmat Deutschland (Eberhardzell).

6x DNA-Probenpuffer	Glycerol	50,0 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v) (Lagerung 4 °C).
20x SB-Elektrophoresepuffer	H ₃ BO ₃	36,5 mM
	NaOH	10,0 mM;
		pH 8,5 mit H ₃ BO ₃ .
1x SB-Elektrophoresepuffer	20x SB	50 ml;
	H ₂ O bidest. ad	1000 ml.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dieses auf einer enzymatischen Reaktion basierende *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz wurde zur Amplifikation und Herstellung von cDNA-Sonden wie auch zur Überprüfung der qPCR-Primer verwendet. Die Reaktionen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt, wobei sich die Menge an einzusetzender Template-DNA an den entsprechenden Vorhaben orientierte.

Pipettierschema		Programm	
10x PCR-Puffer ^a	2,50 µl	Denaturieren	95 °C 5 min
MgCl ₂ (25 mM)	0,75 µl	Denaturieren	95 °C 20 sec
dNTP (2 mM) ^b	1,25 µl	Annealing	60 °C 20 sec
Primer_forward (10 µM)	0,75 µl	Elongation	72 °C 60 sec
Primer_reverse (10 µM)	0,75 µl	Elongation	72 °C 2 min
<i>Taq</i> -Polymerase ^a	0,20 µl		8 °C ∞
Template-DNA	50 ng		
H ₂ O bidest. ad	25,00 µl		

^a Genecraft (Lüdinghausen); ^b Amersham (Freiburg)

Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C. Die folgenden 30 Zyklen beinhalteten einen Denaturierungsschritt bei 95 °C, ein den Primerpaaren entsprechendes Annealing, das in der Regel bei 60 °C erfolgte, sowie einen Elongationsschritt bei 72 °C, dessen Länge von der Größe des zu erwartenden PCR-Produktes bestimmt wurde (Richtwert - 1 Minute/kb). Abschließend folgte ein finaler Syntheseschritt bei 72 °C; danach wurde die Reaktion auf 8 °C gekühlt. Zur Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurde die „Wallace-Regel“ verwendet, die sich bei Oligonukleotiden von weniger als 25 Basen einsetzen lässt (Suggs et al. 1992). Entsprechend ergibt sich T_m wie folgt aus dem GC-Gehalt des Primers:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times (\Sigma_C + \Sigma_G) + 2 \times (\Sigma_A + \Sigma_T) \quad (1)$$

Zur Optimierung der Ergebnisse bezüglich Produktausbeute und Spezifität mussten im Einzelfall ausgewählte Parameter der jeweiligen Reaktion angepasst werden.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung von dsDNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese, indem Gemische unterschiedlich großer DNA-

Fragmente ihrer Molekülgröße nach im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Wanderungsverhalten der Moleküle wird dabei nicht nur durch die Molekülgröße, sondern auch durch deren Ladung und Konfiguration sowie durch die Feldstärke und die Porengröße der Matrix bestimmt.

Die Auftrennung der mit 6x DNA-Probenpuffer versetzten Proben erfolgte abhängig von der Größe der zu erwartenden Fragmente in einem 1 - 2 %igen (w/v) TAE-Agarosegel unter Verwendung der in Tab. 4 aufgeführten horizontalen Elektrophoresekammern (Herstellung 6x DNA-Probenpuffer siehe 2.4.2). Dazu wurde die Agarose zunächst in 1x TAE durch Erhitzen gelöst bevor der Lösung zur späteren Visualisierung der dsDNA im UV-Licht 0,1 µg/ml EtBr zugesetzt wurde. Die im Anschluss durchgeführte elektrophoretische Trennung der Proben wie auch des parallel mitgeführten DNA-Größenmarkers erfolgte in Gegenwart von 1x TAE bei 80 - 120 V. Die Visualisierung der dsDNA erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems CN-UV/WL der Firma Vilber Lourmat Deutschland (Eberhardzell).

50x TAE	Tris-Base	2,00 M
	EDTA, pH 8,0	50,00 mM
	CH ₃ COOH	5,71 % (v/v);
	pH 7,5 mit HCl.	
1x TAE	50x TAE	20 ml;
	H ₂ O bidest. ad 1000 ml.	

2.4.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Gelextraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte entweder unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben oder aber in Anlehnung an die in 2.4.1 beschriebene Methode zur Isolation von DNA (Vogelstein und Gillespie 1979).

Die aus der Gelmatrix des Agarosegels ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden zunächst in einem entsprechenden Volumen NaI-Bindelösung (300 µl/100 mg Gel) im Heizblock bei 50 °C gelöst. Die anschließend mit 3 µl Glasmilch (50 %, v/v) versetzten Proben wurden nach einem 5-minütigen Inkubationsschritt bei RT wie beschrieben durch Zentrifugation pelletiert, in NaI-Bindelösung resuspendiert und zur Entfernung der NaI-Reste durch Zugabe von NEET-Waschlösung gereinigt. Die DNA des in der Vakuumzentrifuge getrockneten Pellets wurde durch Zugabe von 30 µl TE₁₀ bzw. H₂O

bibdest. im Heizblock bei 50 °C gelöst. Nach Pelletieren der Glasmilch (4 °C, 14.000 x g, 5 Minuten) konnte die gelöste DNA als Template zur Ligation bzw. als Sonde zur Detektion der mRNA-Expression mittels Northern blot-Analyse eingesetzt werden.

TE₁₀	Tris-HCl, pH 7,5	1,0 mM
	EDTA, pH 8,0	0,1 mM;
	pH 7,5 mit HCl.	

2.4.6 Ligation

Die Ligation gereinigter PCR-Produkte mit dem pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) erfolgte unter Verwendung des Enzyms T₄ DNA-Ligase gemäß Herstellerangaben. Im Regelfall wurde für die Ligation ein Verhältnis von 1:3 zwischen Insert und Vektor gewählt. Die Ligation erfolgte für 2 - 4 Stunden bei RT oder aber über Nacht bei 4 °C. Für einzelne Reaktionen musste das Standardprotokoll optimiert werden.

2.4.7 Transformation

Die Transformation kompetenter Zellen mittels Hitzeschock erfolgte nach Standardverfahren (Sambrook und Russell 2001).

2.4.8 DNA-Isolation aus Plasmidpräparationen

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach alkalischer Lyse über Adsorptionsaufreinigung an Silicagel-Membranen unter Verwendung der in Tab. 3 aufgeführten molekularbiologischen Reaktionssysteme.

Bei geringen DNA-Konzentrationen wurde zusätzlich eine Fällung der DNA mit Isopropanol durchgeführt. Durch Zugabe monovalenter Salze wurde den in der Lösung enthaltenen Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen, was zu deren Präzipitation führte, wohingegen Nukleotide und Salze in Lösung blieben. Dazu wurde zunächst 1 Volumen (Vol.) der isolierten DNA mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und anschließend mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationsphase bei RT wurde die DNA durch Zentrifugation (4 °C, 20.000 x g, 30 Minuten) pelletiert und dann nachfolgend in 500 µl 70 %igem (v/v) EtOH gewaschen. Das in der Vakuumzentrifuge

getrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in einem geeigneten Volumen H₂O bidest. aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Die Sequenzen isolierter DNA aus Plasmidpräparationen wurden mit Hilfe der in 2.4.11 beschriebenen Sequenzierung überprüft.

2.4.9 Restriktionsverdau

Beim analytischen Restriktionsverdau, der zur Überprüfung von Plasmidpräparationen eingesetzt wurde, spalten Restriktionsendonukleasen innerhalb spezifischer Basensequenzen, die als DNA-Erkennungssequenzen bezeichnet werden, die Phosphodiester-Bindungen doppelsträngiger DNA-Moleküle durch Hydrolyse. Je nach Art der Erkennungssequenz sowie der Spezifität der Spaltungsreaktion werden drei Typen von Restriktionsendonukleasen (Typ I, II und III) unterschieden, wobei in molekularbiologischen Ansätzen vorrangig Enzyme des Typs II zum Einsatz kommen, da hier die oftmals palindromischen DNA-Bindungsstellen und Schnittstellen der Enzyme identisch sind. Bei der Spaltung entstehen entweder DNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) oder einander komplementären 5'- bzw. 3'-überhängenden Enden (*sticky ends*) (Sambrook und Russell 2001).

Die Durchführung des Restriktionsverdaus erfolgte nach molekularbiologischer Standardmethode. Bezüglich der verwendeten Enzym- und Puffermengen sowie der Reaktionszeit und -temperatur, die üblicherweise bei 60 Minuten und 37 °C lag, wurde den Angaben der Hersteller Folge geleistet.

Pipettierschema Einfachverdau		Pipettierschema Doppelverdau	
10x Restriktionspuffer	2,0 µl	10x Restriktionspuffer	2,0 µl
Enzym (10 U/µl)	0,5 µl	Enzym 1 (10 U/µl)	0,5 µl
		Enzym 2 (10 U/µl)	0,5 µl
DNA	1,0 µg	DNA	1,0 µg
H ₂ O bidest. ad	20,0 µl	H ₂ O bidest. ad	20,0 µl

Die Visualisierung der durch den Restriktionsverdau erzeugten Fragmente spezifischer Größe erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese im Geldokumentationssystem CN-UV/WL der Firma Vilber Lourmat Deutschland (Eberhardzell).

2.4.10 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wässriger Lösungen erfolgte über die Messung der Extinktion (E) bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm (E_{260}), dem Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren. Die UV/Vis-Spektren wurden mit Hilfe des NanoDrop® UV/Vis Spektralphotometers ND-1000 (peqLab Biotechnologie, Erlangen) über einen Messbereich von 220 nm bis 750 nm aufgezeichnet, wobei die bei E_{260} gemessene Extinktion des jeweiligen Lösungsmittels als Referenz diente.

Bei E_{260} entspricht ein gemessener Extinktionswert von 1 näherungsweise einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ für dsDNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ für *single stranded* DNA (ssDNA) bzw. RNA oder 20 $\mu\text{g/ml}$ für einzelsträngige Oligonukleotide. Zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration (c) einer verdünnten Lösung gilt daher:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{E_{260} * x * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \quad (2)$$

Der molare Extinktionskoeffizient (x) unterscheidet sich dabei spezifisch für DNA, RNA und Oligonukleotide.

Zur Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurde das Verhältnis der bei E_{260} bzw. E_{280} gemessenen Extinktionskoeffizienten herangezogen, wobei die bei E_{280} detektierte Extinktion dem Extinktionsmaximum aromatischer Aminosäuren entspricht. Während reine DNA-Lösungen einen Quotienten von 1,8 aufweisen, deuten niedrigere Quotienten eine Verunreinigung mit Proteinen an; höhere Quotienten weisen dagegen auf eine Verunreinigung mit RNA oder ssDNA hin. RNA-Lösungen haben im Idealfall einen Quotienten von 2,0; dabei sind niedrigere Werte ein Anzeichen für das Vorhandensein von Proteinen, wohingegen höhere Quotienten aus Verunreinigungen mit Phenol resultieren können.

2.4.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte nach der Kettenabbruch- oder auch Dideoxyribonukleosidtriphosphat (ddNTP)-Methode nach Sanger und wurde unter Verwendung des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt (Sanger et al. 1977). Dieser Mix enthält fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die in den DNA-Strang zufällig integriert werden und somit die DNA-Synthese abbrechen.

Sequenzierungsansatz		Programm		
5x Sequenzierungs-Puffer	1,0 µl	Denaturieren	95 °C	1 min
BigDye® Terminator v3.1 Mix	1,0 µl	Denaturieren	95 °C	30 sec
Primer (5 µM)	1,0 µl	Annealing	55 °C	15 sec
Plasmid-DNA	x ng	Elongation	60 °C	4 min
H ₂ O bidest. ad	5,0 µl		8 °C	∞

} x 30

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten einer Länge von 100 - 300 bp wurden 50 - 200 ng DNA eingesetzt, während für die Sequenzierung von Plasmiden 10 ng/100 bp des jeweiligen Plasmids eingesetzt wurden. Die PCR-Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden zunächst durch Zugabe von 2 µl 1,5 M Na-Acetat (pH 5,5) und 20 µl 100 %igem (v/v) EtOH gefällt und anschließend durch Zentrifugation (4 °C, 12.000 x g, 30 Minuten) pelletiert. Das Pellet wurde in 70 %igem (v/v) EtOH gewaschen und bei 60 °C in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die DNA wurde abschließend in 10 µl LiCrosolv® H₂O (Merck, Darmstadt) eluiert. Die Sequenzierung der Proben erfolgte im Kapillarsequencer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) durch die AG Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich der Pädiatrischen Endokrinologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Chromas Lite 2.01.

2.4.12 Aufarbeitung und Aufbewahrung von Gewebeproben

Gewebeproben wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Gewebe geringer Größe wie Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse wurden direkt zur RNA-Isolation oder zur Herstellung von Proteinhomogenaten eingesetzt, wohingegen alle anderen Gewebe zunächst mit Hilfe eines Mikrodismembrators (B. Braun Biotech International, Melsungen) in vorgekühlten Teflonbehältern durch die bidirektionale Bewegung einer Metallkugel pulverisiert wurden. Aliquots der pulverisierten Gewebe wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4.13 RNA-Isolation

Für die Isolation der gesamten zellulären RNA aus Geweben wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet. Die RNA-Präparation aus Leber, Niere und Herz erfolgte nach optimierter Guanidinisothiocyanat (GTC)-Methode mit integrierter

phenolischer Extraktion unter Verwendung von peqGOLD Trifast™ (peqLab Biotechnologie, Erlangen) (Chomczynski und Sacchi 1987).

Zur RNA-Isolation aus Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse wurde aufgrund der erwarteten geringeren RNA-Mengen und zur Vermeidung von Gewebepools das RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die RNA-Isolation aus Zelllysaten der kultivierten FRTL-5-Zellen erfolgte generell unter Verwendung des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden). Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der erhaltenen Nukleinsäurelösungen erfolgte mit Hilfe des NanoDrop® UV/Vis Spektralphotometers ND-1000 (peqLab Biotechnologie, Erlangen) entsprechend der in 2.4.10 beschriebenen Vorgehensweise.

2.4.13.1 RNA-Isolation mit peqGOLD Trifast™

Diese auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation beruhende Methode wurde für alle Gewebe verwendet, die aufgrund ihrer Größe einen hohen RNA-Gehalt versprochen. Dazu wurden ca. 50 mg Gewebepulver mit 1 ml peqGOLD Trifast™-Reagenz versetzt und im TissueLyser (Qiagen, Hilden) mit Hilfe einer ¼"-Keramikkugel (MP Biomedicals Europe, Illkirch/Frankreich) homogenisiert. Durch das chaotrope GTC wurden Gewebestandteile lysiert, Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert, während durch das enthaltene Phenol im sauren Milieu denaturierte Proteine und kleinere DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt wurden. Zur vollständigen Lyse wurde die Suspension 5 Minuten bei RT inkubiert, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform je 1 ml peqGOLD Trifast™-Reagenz wurden die Proben durch Vortexen homogenisiert und erneut für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Phasentrennung wurde durch den nachfolgenden Zentrifugationsschritt (4 °C, 10.000 x g, 5 Minuten) erreicht, wobei die RNA ausschließlich in der oberen wässrigen Phase angereichert wurde. Zur Präzipitation der RNA wurde diese mit 500 µl Isopropanol versetzt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss zur Sedimentation des Pellets zentrifugiert (4 °C, 12.000 x g, 10 Minuten). Nach Entfernung des Isopropanolüberstandes wurde das RNA-Pellet in 2 x 1 ml 75 %igem (v/v) EtOH durch Vortexen mit anschließender Zentrifugation (4 °C, 12.000 x g, 10 Minuten) gewaschen. Das in der Vakuumzentrifuge bei 30 °C getrocknete Pellet wurde je nach Größe in 20 - 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.4.13.2 RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits

Die Extraktion der RNA aus Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse wie auch aus den Zelllysaten der FRTL-5-Zellen (5×10^5 Zellen) wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt und erfolgte nach Herstellerangaben. Der Vorteil dieses Systems ist, dass durch die Verwendung von speziellen Hochsalzpuffern die meisten RNA-Moleküle mit weniger als 200 Nukleotiden (5.8SrRNA, 5SrRNA, tRNA) selektiv entfernt werden, wodurch es zu einer Erhöhung des isolierten mRNA-Anteils kommt (Angabe des Herstellers).

Hypothalamus, Hypophyse und Schilddrüse wurden zunächst entweder mit Hilfe eines Glashomogenisators (Wheaton Science Products, Millville, NJ/USA) oder des Ultra Turrax (IKA Analysentechnik, Staufen) nach Zugabe des GTC-haltigen Lysepuffers homogenisiert. Zur Verringerung der Viskosität der Lysate wurden die Proben mit Hilfe einer Spritze sowie einer 26G x 1" Gauge-Kanüle (B. Braun Biotech International, Melsungen) homogenisiert bevor sie mit einem entsprechenden Volumen an 70 %igem (v/v) EtOH versetzt wurden. Die Isolation der RNA erfolgte nach Auftragen des Lysats auf die Silicamembran der Säulen entsprechend der Anleitung des Herstellers. Für Hypothalamusextrakte betrug das Elutionsvolumen 20 µl, während Hypophysen- und Schilddrüsenextrakte in 30 µl DEPC-H₂O eluiert wurden. Die eluierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die RNA-Isolation aus Gewebefragmenten des mediobasalen Hypothalamus (MBH), dessen Präparation in 2.6.5 näher erläutert ist, erfolgte entsprechend des nachfolgend beschriebenen Protokolls durch die AG Prof. Dr. W. Wuttke der Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen. Das Gewebe wurde zunächst in Lysepuffer aufgenommen und durch Ultraschall sowie anschließende Verwendung der QIAshredder™-Säulen (Qiagen, Hilden) homogenisiert bevor das Eluat auf die Extraktionssäule aufgetragen wurde. In der Präparation vorhandene DNA wurde durch einen enzymatischen DNase-Verdau mit 27,3 Kunitz Units RNase-freier DNase (Qiagen, Hilden) je Probe entfernt. Die nach Herstellerangaben gereinigte RNA wurde mit 20 µl DEPC-H₂O eluiert und bei -80 °C gelagert.

Die Schilddrüsenzellen der Linie FRTL-5 wurden nach Absaugen des Kultur- bzw. Inkubationsmediums in 2 x 5 ml 1x PBS gewaschen, durch Zugabe des Lysepuffers von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst und auf die Silicamembran der Säulen

übertragen. Die nach Herstellerangaben präparierte RNA wurde in 30 µl DEPC·H₂O eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.4.14 Überprüfung der RNA-Qualität im denaturierenden Formaldehydgel

Die Qualität der RNA-Präparationen wurde mittels Gelelektrophorese im denaturierenden Formaldehydgel überprüft. Dazu wurden zunächst je 3 µg der isolierten RNA mit einer entsprechenden Menge 5x RNA-Probenpuffer sowie „Bluejuice“-Farbpuffer versetzt, anschließend bei 65 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. Für die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde die durch Erhitzen in DEPC·H₂O gelöste Agarose zur späteren Visualisierung der RNA mit 0,1 µg/ml EtBr versetzt bevor der Lösung zusätzlich 10 % (v/v) 10x MOPS sowie 10 % (v/v) 37 %iges Formaldehyd hinzugefügt wurden. Unter Verwendung der in Tab. 4 aufgeführten horizontalen Elektrophoresekammern erfolgte die Trennung nach Äquilibrieren des Gels in 1x MOPS bei 80 V über einen Zeitraum von 3 Stunden. Im Gel enthaltenes Formaldehyd wurde durch 2-stündige Lagerung in H₂O bidest. ausgewaschen bevor die Visualisierung der denaturierten RNA mit Hilfe des Geldokumentationssystems CN-UV/WL der Firma Vilber Lourmat Deutschland (Eberhardzell) erfolgte. Die densitometrische Auswertung zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA erfolgte mittels der Software Optiquant 4.0 (Packard Instruments, Meriden, CT/USA). Der dabei aus den Intensitäten von 18SrRNA und 28SrRNA gebildete Quotient dient als Indikator der Integrität der präparierten RNA und sollte einen Wert von wenigstens 1,9 haben.

20x MOPS	MOPS	0,40 M
	NaOAc	0,10 M
	NaOH	0,09 M
	EDTA, pH 8,0	0,01 M;
	pH 7,0 mit NaOH, Sterilisation durch Autoklavieren.	
10x MOPS	20x MOPS	250 ml;
	DEPC·H ₂ O ad 500 ml.	
1x MOPS	20x MOPS	50 ml;
	DEPC·H ₂ O ad 1000 ml.	
5x RNA-Probenpuffer	10x MOPS	14,0 % (v/v)
	Formamid	62,5 % (v/v)
	37 % Formaldehyd	23,5 % (v/v) (Lagerung -20 °C).

„Bluejuice“-Farbpuffer	Glycerol	50 % (v/v)
	H ₂ O bidest.	50 % (v/v)
	EDTA, pH 8,0	1,0 mM
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v) (Lagerung -20 °C).

2.4.15 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels reverser Transkription unter Verwendung des iScript™ cDNA Synthese Kits der Firma Bio-Rad Laboratories (München) gemäß Herstellerangaben. Die verwendete modifizierte reverse Transkriptase (RT) aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit RNase H(+)-Aktivität. Das System eignet sich durch die Verwendung von Oligo-dT- sowie *random hexamer*-Primern zur Synthese von Fragmenten mit einer Länge von maximal 1 kb.

Tab. 13: Übersicht der zur cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Mengen.

Gewebe	RNA aus Maus [µg]	RNA aus Ratte [µg]
Hypothalamus	0,5	0,5
Hypophyse	1,0	1,0
Schilddrüse	1,0	0,5
Herz	1,0	-
Leber	1,0	1,0
Niere	1,0	1,0

Je nach Nukleinsäurekonzentration der Präparationen wurden 500 - 1000 ng RNA (Tab. 13) zur cDNA-Synthese eingesetzt, die nach dem Prinzip einer *two-step* RT-PCR aufgebaut ist.

Pipettierschema		Programm		
5x iScript™ Reaction Mix	4,0 µl	Annealing	25 °C	5 min
iScript Reverse Transcriptase	1,0 µl	Elongation	42 °C	30 min
RNA-Template (250 - 1000 ng)	x µl	Denaturieren	85 °C	5 min
DEPC-H ₂ O ad	20,0 µl		8 °C	∞

2.4.16 Quantitative Real-time RT-PCR (qPCR)

Die quantitative Real-time RT-PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der in 2.4.3 beschriebenen PCR, ermöglicht aber durch Verwendung des dsDNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I auch die Quantifizierung der mRNA niedrig

exprimierter Gene. Im Verlauf der Reaktion kommt es während der Amplifikation des Zielgens zu einer direkt proportionalen Erhöhung der Intensität des Fluoreszenzsignals. Der zur Auswertung der Genexpressionsanalyse eingesetzte *threshold cycle* (C_T) stellt dabei den Zyklus dar, bei dem ein konstant definiertes Fluoreszenzsignal gegenüber der Hintergrundfluoreszenz erstmals signifikant erhöht ist.

Die Durchführung der qPCR erfolgte in Duplikaten unter Verwendung des IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, München) im 96-Well-Format des iCycler IQ (Bio-Rad Laboratories, München) gemäß Herstellerangaben. Die in Tab. 21 und Tab. 22 aufgeführten Primer zur Analyse der mRNA-Expression in Maus und Ratte wurden nach erfolgter Validierung und Optimierung mittels der in 2.4.3 beschriebenen PCR in Konzentrationen zwischen 100 - 500 nM eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Mix aller verwendeten cDNAs je Gewebe, während DEPC·H₂O anstelle des cDNA-Templates als Negativkontrolle eingesetzt wurde.

Pipettierschema		Programm
2x IQ™ SYBR® Green Supermix	12,5 µl	Denaturieren 95 °C 3 min
Primer_forward (10 µM)	x µl	Denaturieren 95 °C 30 sec
Primer_reverse (10 µM)	x µl	Annealing 60 °C 45 sec
Template-cDNA (1:9)	5,0 µl	Elongation 72 °C 30 sec
DEPC·H ₂ O ad	25,0 µl	Elongation 72 °C 3 min
		8 °C ∞

Nach einem initialen Denaturierungsschritt zur Aktivierung der *Taq* DNA-Polymerase bei 95 °C, folgten 40 Zyklen, die einen Denaturierungsschritt bei 95 °C, ein den Primerpaaren entsprechendes Annealing, das in der Regel bei 60 °C erfolgte, sowie einen Elongationsschritt bei 72 °C beinhalteten. Zum Abschluss folgte ein finaler Syntheseschritt bei 72 °C; danach wurde die Reaktion auf 8 °C gekühlt. Das im Reaktionsmix enthaltene Fluoreszein diente der Normalisierung, beeinflusste aber weder Reaktionseffizienz noch Sensitivität der Reaktion. Mit Hilfe der nachfolgenden Schmelzkurvenanalyse wurde sichergestellt, dass der detektierte Fluoreszenzanstieg auf die spezifische Amplifikation des Zielgens zurückzuführen ist, da während der Reaktion gebildete mögliche Artefakte (Primer-Dimere) einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen. Darüber hinaus wurden Stichproben der Reaktionsansätze im 1 %igen (w/v) TAE-Agarosegel wie bereits in 2.4.4 beschrieben analysiert.

Das Mitführen einer Standardreihe bekannten DNA-Gehalts erlaubte mittels der Steigung (m) der Standardkurve die Berechnung der Effizienz (E) der jeweiligen Reaktion, die in der Regel bei 85 - 100 % lag.

$$E = 10^{-1/m} - 1 \quad (3)$$

Die relative Quantifizierung der Genexpression einschließlich der Berechnung der Signifikanzen erfolgte nach Normalisierung auf ein ubiquitär homogen exprimiertes Referenzgen (18SrRNA, Gapdh, Hprt) mit Hilfe der Software REST MCS (Relative Expression Software Tool Multiple Condition Solver) (Pfaffl et al. 2002).

$$R = \frac{E_{(\text{Zielgen})}^{\frac{\Delta C}{T} \text{ Zielgen (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}}{E_{(\text{Referenzgen})}^{\frac{\Delta C}{T} \text{ Referenzgen (MW Kontrolle - MW Behandlung)}}} \quad (4)$$

Die Software fasst die Einzelwerte der jeweiligen Gruppen als Mittelwerte (MW) zusammen und berechnet anhand dieser die mittleren Expressionsunterschiede (R) sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen; die Fehlerrechnung erfolgte dabei mit Hilfe der Taylorserie. Die statistische Analyse beruht auf einem von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest (Pfaffl et al. 2002).

2.4.17 Northern blot-Analyse

Bei diesem Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von Transkripten wird die RNA nach elektrophoretischer Auftrennung aus der Gelmatrix eines denaturierenden Trenngels zunächst auf eine geeignete Trägerschicht aus aktiviertem Nylon übertragen und dort immobilisiert. Nach Hybridisierung der Trägermembran mit markierter DNA, welche der nachzuweisenden mRNA komplementär ist, erfolgt die Visualisierung der Transkripte durch Autoradiographie der Trägerschicht.

Probenvorbereitung - Die isolierte RNA wurde nach gelelektrophoretischer und densitometrischer Überprüfung zur Quantifizierung der zu untersuchenden Transkripte zunächst gruppenweise gepoolt, um ein Gesamtbild der Expression der jeweiligen Kontrollgruppen bzw. der mit den Testsubstanzen behandelten Gruppen abzubilden.

Gelelektrophorese und Blotten - Die elektrophoretische Auftrennung der Proben (15 - 20 µg RNA) erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im Formaldehydgel wie in 2.4.14 beschrieben. Zur Entfernung des enthaltenen Formaldehyds wurde das Gel über Nacht bei 4 °C in H₂O bidest. gelagert. Der Transfer der fraktionierten mRNA vom

Gel auf die Trägermembran erfolgte mit Hilfe eines Kapillarblotsystems. Die RNA wurde unter Ausnutzung der Kapillarkräfte in Gegenwart des Hochsalzpuffers 10x SSC auf eine Nylonmembran (Nytran NY 12N, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen und anschließend durch UV-Bestrahlung kovalent an die Nylonmarix gebunden (UV-Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, CA/USA) gebunden. Zur Durchführung mehrfacher Hybridisierungsreaktionen wurde die Membran nach erfolgter Hybridisierung jeweils 30 Minuten bei 80 °C in 0,5 % (w/v) SDS gewaschen.

³²P-Sondenherstellung und Hybridisierung - Die zur Quantifizierung der mRNA-Expression eingesetzten und durch Sequenzierung überprüften cDNA-Sonden (Tab. 8) wurden als Inserts des Vektorsystems pGEM[®]-T Easy (Promega, Mannheim) mit Hilfe der Primer SP6 und T7 amplifiziert und anschließend unter Verwendung des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt, so dass sie für die Hybridisierung zur Verfügung standen.

Die ³²P-Markierung der cDNA-Sonden (25 ng/Reaktion) mit [α -³²P]dCTP (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA/USA) erfolgte mit Hilfe des *random priming*-Kits NEBlot[™] N1500L (New England Biolabs, Ipswich, MA/USA) gemäß Herstellerangaben. Zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide wurde die cDNA-Sonde über eine Sephadexsäule (Microspin[™] G-50 Columns, Amersham Biosciences, Freiburg) gereinigt, anschließend in 100 μ l Prähybridisierungslösung aufgenommen und nach erfolgter Hitzedenaturierung als Einzelstrangsonde zur Detektion der mRNA-Expression eingesetzt. Die Hybridisierung der kovalent an die Nylonmembran gebundenen RNA mit der ³²P-markierten cDNA-Sonde erfolgte nach vorangegangener Prähybridisierung zur Absättigung freier Bindungsstellen über Nacht bei 40 °C im Hybridisierungssofen (GFL, Burgwedel). Zur Entfernung unspezifisch gebundener ³²P-Fragmente folgten drei Waschschrte mit SSPE jeweils sinkender Salzkonzentration: 15 Minuten bei 50 °C, 15 Minuten bei 55 °C und 30 Minuten bei 60 °C.

Die radiografischen Signale der spezifisch markierten RNA wurden durch die „*storage phosphor*“-Technik (Johnston et al. 1990) mittels PhosphorImager (Cyclone Storage Phosphor Screen, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA/USA) visualisiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe der Software Optiquant 4.0 (Packard Instruments, Meriden, CT/USA). Die Signale aller Hybridisierungsreaktionen wurden auf die Expression des Referenzgens 18SrRNA normalisiert.

20x SSC	NaCl	3,0 M
	Na-Citrat	0,3 M;
	pH 7,0 mit HCl, Sterilisation durch Autoklavieren.	
10x SSC	20x SSC	500 ml;
	H ₂ O bidest. ad 1000 ml.	
20x SSPE	NaCl	3,00 M
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,20 M
	EDTA, pH 8,0	0,02 M;
	pH 7,5 mit NaOH, Sterilisation durch Autoklavieren.	
(Prä)Hybridisierungslösung	Formamid	50,0 % (v/v)
	20x SSPE	30,0 % (v/v)
	H ₂ O bidest.	14,0 % (v/v)
	SDS	0,50 % (w/v)
	<i>salmon sperm</i> DNA	100 µg/ml (Lagerung 4 °C).
Waschlösung „Double“	20x SSPE	10,0 % (v/v)
	SDS	0,3 % (w/v).
Waschlösung „Single“	20x SSPE	5,0 % (v/v)
	SDS	0,3 % (w/v).
Waschlösung „Half“	20x SSPE	2,5 % (v/v)
	SDS	0,3 % (w/v).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Proteinhomogenaten

Im Allgemeinen erfolgte die Herstellung von Proteinhomogenaten zur Bestimmung von Enzymaktivitäten bzw. zur Durchführung von Western blot-Analysen nach dem hier beschriebenen Protokoll, während abweichende Formen der Aufarbeitung in den jeweiligen Abschnitten detailliert erläutert werden. Dazu wurde dem hier verwendeten Homogenisationspuffer unmittelbar vor Gebrauch 1 mM DTT aus einer 1 M Stocklösung zugesetzt. Darüber hinaus erfolgten alle der nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte auf Eis bei 4 °C.

Zur Herstellung von Proteinhomogenaten aus Leber, Niere und Herz wurden ca. 50 mg Gewebepulver, dessen Herstellung in 2.4.12 beschrieben ist, zunächst in 500 µl

Homogenisationspuffer aufgenommen und mit Hilfe einer Spritze sowie einer 24G x 1" Gauge-Kanüle (B. Braun Biotech International, Melsungen) auf Eis homogenisiert. Nach einem Ultraschallaufschluss (2 x 10 Pulse, 0,6 Sekunden bei 200 W) wurde die Membranfraktion durch Zentrifugation (4 °C, 10.000 x g, 10 Minuten) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Analyse zytosolischer Proteine bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde in 350 - 400 µl Homogenisationspuffer erneut resuspendiert und nochmals wie beschrieben sonifiziert.

Schilddrüsen wurden in 120 - 200 µl Homogenisationspuffer aufgenommen und mit Hilfe des Ultra Turrax (IKA Analysentechnik, Staufen) auf Eis homogenisiert und anschließend unter den bereits aufgeführten Bedingungen sonifiziert. Schilddrüsengewebe aus Maus wurde als Gesamthomogenat verwendet, während Schilddrüsengewebe aus Ratte einer weiteren Fraktionierung, wie für die peripheren Organe beschrieben, unterzogen wurde. Hypophysengewebe aus Maus wurde zur Herstellung von Proteinhomogenaten nach Zugabe von 120 µl Homogenisationspuffer direkt wie beschrieben sonifiziert und als Gesamthomogenat verwendet.

Zur Herstellung von Zelllysaten aus FRTL-5-Zellen wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zweimalig in 5 ml 1x PBS gewaschen (Herstellung 10x PBS siehe 2.2.3). Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 300 µl Homogenisationspuffer mit Hilfe eines Gummischabers von der Oberfläche der Kulturschalen gelöst und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Ultraschallaufschluss wurde die durch Zentrifugation (4 °C, 10.000 x g, 10 Minuten) pelletierte Membranfraktion in 100 µl Homogenisationspuffer resuspendiert und erneut wie beschrieben sonifiziert, während der Überstand zur Analyse zytosolischer Proteine bei -20 °C gelagert wurde.

Homogenisationspuffer	D(+)-Saccharose	250 mM
	Hepes	20 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM
	DTT	1 mM;
	pH 7,4 mit NaOH (Lagerung 4 °C). Die Zugabe von 1 mM DTT erfolgte direkt vor Gebrauch aus einer 1 M Stocklösung (Lagerung -20 °C).	

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford erfolgte gemäß der in 2.5.2 beschriebenen Vorgehensweise, so dass die für die jeweiligen Assays benötigten Proteinkonzentrationen berechnet und mit Hilfe des zur Aufarbeitung der Proben verwendeten Homogenisationspuffers eingestellt werden konnten. Anschließend

wurden die aliquotierten Homogenate bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford basiert auf einer Farbreaktion, bei der durch Bildung eines Protein-Farbstoff-Komplexes das Absorptionsmaximum des Farbstoffes „Coomassie brilliant blue G-250“ auf eine Wellenlänge (λ) von 595 nm verschoben wird (Bradford 1976). Dabei ist die bei dieser Wellenlänge gemessene Extinktion der Proteinkonzentration in der Lösung proportional.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des 5x Protein Assay-Reagenz der Firma Bio-Rad Laboratories (München) im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) gemäß Herstellerangaben, wobei das jeweilige Lösungsmittel als Referenz diente. Die Proteinkonzentration der in Duplikaten gemessenen Proben wurde anhand einer mitgeführten Standardreihe eines bovinen IgG-Standards (Bio-Rad Laboratories, München) definierter Konzentration (1,34 - 1,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), die in der Regel in der Darstellung der Standardkurve einen Korrelationskoeffizienten (R^2) $\geq 0,95$ erreichte, nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

$$E = \epsilon_{\lambda} * c * d \quad (5)$$

Die Extinktion (E) ist somit proportional zur Konzentration (c) der absorbierenden Lösung wie auch zur Schichtdicke (d) der Küvette in Abhängigkeit des von der Wellenlänge beeinflussten molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{λ}).

2.5.3 T₄-Bindungsassay

Mit Hilfe des T₄-Bindungsassays kann die Bindungsaffinität der untersuchten EACs gegenüber den Transportproteinen TBG und TTR im Serum charakterisiert werden (Young et al. 1982). Der Assay wurde von Dr. B. Radovic, Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, gemäß der in Radovic et al. beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt (Radovic et al. 2006).

2.5.4 Deiodase-Assay

Mit Hilfe des Deiodase-Assays kann die enzymatische Aktivität der 5'-Deiodasen DIO1 und DIO2 durch Freisetzung eines in 5'-Position am phenolischen Ring lokalisierten Iodatoms (^{125}I) aus radioaktiv markiertem $r\text{T}_3$ ($^{125}\text{I-rT}_3$) bestimmt werden (Leonard und Rosenberg 1980; Moreno et al. 1994). Zur Unterscheidung der beiden Isoenzyme wird PTU als spezifischer Inhibitor der DIO1 eingesetzt, der die Aktivität der DIO2 in den hier verwendeten Konzentrationen allerdings nicht beeinträchtigte (Visser et al. 1983). Somit konnte die Aktivität beider 5'-Deiodasen in einem parallelen Ansatz durch Differenzmessung bestimmt werden.

Probenaufarbeitung - Die Herstellung der Proteinhomogenate mit anschließender Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie bereits beschrieben. Entsprechend der in Tab. 14 gelisteten Übersicht wurden im Anschluss Homogenate mit einer Konzentration von x μg Protein/40 μl Homogenisationspuffer hergestellt und als Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die in Tab. 14 aufgeführten Bedingungen sind das Ergebnis vorangegangener Optimierungsreaktionen und an das jeweilige Tiermodell sowie die zu analysierenden Gewebe angepasst.

Tab. 14: Spezies- und Gewebeunterschiede im Deiodase-Assay.

Spezies	Gewebe	Protein/100 μl [μg]	$r\text{T}_3$	Inkubationszeit [min]
Ratte	Schilddrüse	2,5	1 μM	45
	Herz	100,0	2 nM	180
	Leber	20,0	1 μM	60
	Niere	20,0	1 μM	60
Maus	Hypophyse	50,0	10 nM	60
	Schilddrüse	2,5	1 μM	45
	Leber	20,0	1 μM	60
	Niere	40,0	1 μM	60

Vorbereitung und Durchführung - Zur Aktivitätsbestimmung der 5'-Deiodasen wurde $^{125}\text{I-rT}_3$ (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA/USA) mit einer spezifischen Aktivität von 800 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (750 - 1250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) als Substrat verwendet. Um während der Lagerung durch spontane Deiodierung oder radiolytischen Abbau entstandenes freies Iodid zu entfernen, wurde der Tracer zunächst chromatographisch über eine Sephadex LH-20-Säule gereinigt. Zur Herstellung der Säule wurden 600 μl des Trägermaterials Sephadex LH-20 auf eine mit einem Filter (Porengröße 10 μm , MoBiTec, Göttingen) abgedichtete Sarpettenspitze (Sarstedt, Nümbrecht) aufgetragen. Nach Äquilibrieren

der Säule mit 0,1 N HCl wurde das Substrat $^{125}\text{I-rT}_3$ zunächst mit 3 x 1 ml 0,1 N HCl, anschließend mit 3 x 1 ml H_2O bidest. gewaschen. Die Elution des Tracers erfolgte durch Zugabe von 1 ml Elutionslösung (EtOH: NH_3 im Verhältnis 49:1) mit nachfolgender Zentrifugation (4 °C, 1.000 x g, 5 Minuten). Das Eluat wurde zur Entfernung des EtOH: NH_3 -Gemisches mit Stickstoff im ~ 50 °C warmen Wasserbad vollständig eingedampft und anschließend in 2x Substratmix resuspendiert.

2x Substratmix	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 6,8	100 mM
	DTT	20 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM
	NaOH	0,164 mM
	rT_3	siehe Tab. 14 (Lagerung 4 °C).

Die Aktivität des Substratmixes sollte innerhalb eines Toleranzbereiches von 30000 - 80000 cpm/50 μl Ansatz, idealerweise jedoch bei 55000 cpm/50 μl Ansatz liegen. Anhand dieses Wertes wurde die theoretisch denkbare 100 %ige Freisetzung von $^{125}\text{I}^-$ im Reaktionsansatz ermittelt, die in die abschließende Berechnung der 5'-Deiodaseaktivitäten eingeht.

Die Aktivitätsbestimmung der 5'-Deiodasen erfolgte im Triplikate mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 100 μl . Die resuspendierten Membranfraktionen bekannter Proteinkonzentration wurden zur Bestimmung der Gesamtaktivität beider 5'-Deiodasen mit 10 μl H_2O bidest. bzw. zur spezifischen Hemmung der DIO1 mit 10 μl 10 mM PTU versetzt. Nach dem Start der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 50 μl 2x $^{125}\text{I-rT}_3$ -Substratmix wurden die Proben im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 μl BSA-Stopplösung sowie 400 μl 10 %iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA), wodurch die in der Lösung enthaltenen Proteine gefällt wurden. Nach Zentrifugation (20 °C, 14.000 x g, 5 Minuten) wurden 480 μl des Überstandes auf Dowex-50 WX-2-Säulen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA/USA) aufgetragen. Das durch die Reaktion freigesetzte $^{125}\text{I}^-$ wurde durch Zugabe von 2 ml 10%iger CH_3COOH eluiert. Die anschließende Messung der Proben erfolgte im Gammacounter (Gammamaster, LKB Wallac, Turku/Finnland). Die Bedingungen des enzymatischen Tests wurden so gewählt, dass die Deiodierung des Substrats letztlich bei weniger als 15 % des $^{125}\text{I-rT}_3$ -Substratmixes lag. Die mitgeführten Kontrollen zur Bestimmung der Hintergrundaktivität (*Background*) enthielten lediglich 10 μl H_2O bidest. im Triplikate, wobei den Kontrollen erst nach Zugabe der BSA-Stopplösung 40 μl einer Proteinlösung zugefügt wurden. Als Interassaykontrolle diente vergleichbar aufgearbeitetes Leberhomogenat der Maus mit einer Proteinkonzentration

von 20 µg Protein/40 µl. Nach Abschluss des Assays wurde eine weitere Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt, deren Ergebnisse zur Berechnung der spezifischen 5'-Deiodaseaktivitäten herangezogen wurden.

Berechnung der Enzymaktivität - Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] beider 5'-Deiodasen wurde zunächst die Hintergrundaktivität, die den radiolytischen Zerfall von $^{125}\text{I-rT}_3$ darstellt, von der gemessenen Aktivität der Proben subtrahiert und zur Menge und Aktivität des eingesetzten Substrats rT_3 ins Verhältnis gesetzt.

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmenge sowie der Reaktionszeit wurde die spezifische Aktivität der 5'-Deiodasen berechnet. Dabei entspricht die Aktivität der Ansätze mit H_2O bidest. der Summe beider 5'-Deiodaseaktivitäten während die spezifischen Aktivitäten der durch PTU gehemmten Ansätze der Aktivität der DIO2 entsprechen. Die spezifische Aktivität der DIO1 ergibt sich daher durch Differenzbildung der spezifischen Aktivitäten ungehemmter und durch den Inhibitor PTU gehemmter Ansätze.

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{2 \cdot n_{\text{rT}_3} [\text{nmol}] \cdot (\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Background}}) \cdot 1000}{\text{cpm}_{100\%} \cdot m_{\text{Protein}} [\text{mg}] \cdot t [\text{min}] \cdot 480/550} \quad (6)$$

cpm	<i>counts per minute</i>
$\text{cpm}_{100\%}$	theoretisch mögliche 100 %ige Deiodierung von $^{125}\text{I-rT}_3$ im Reaktionsansatz
$\text{cpm}_{\text{Background}}$	^{125}I -Freisetzung durch nichtenzymatische Deiodierung
$\text{cpm}_{\text{Probe}}$	^{125}I -Freisetzung durch 5'-Deiodierung
m_{Protein}	Menge an Protein [mg]
n_{rT_3}	Stoffmenge an unmarkiertem rT_3 im Reaktionsansatz [nmol]
t	Reaktionszeit [min]

Erläuterungen zur Berechnung - Das im Assay verwendete Substrat rT_3 ist an 5'-Position mit ^{125}I markiert - allerdings besteht durch die freie Drehbarkeit des phenolischen Rings um die Diphenylether-O-C1'-Bindung die Möglichkeit, dass die 5'-Deiodasen mit gleicher Wahrscheinlichkeit das 3'- wie auch das 5'-Iodatome während der enzymatischen Spaltung entfernen. Statistisch kommt also auf ein ^{125}I - ein unmarkiertes I-Atom, was in der Formel durch den Faktor 2 berücksichtigt wird.

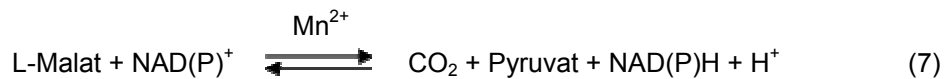
Durch den Faktor 480/550 wird die auf die Dowex-50 WX-2-Säulen aufgetragene Menge des Überstandes (480 µl) im Verhältnis zum Gesamtvolumen (550 µl)

ausgedrückt. In die Berechnung der spezifischen Aktivität geht weiterhin die in den Substratmix eingesetzte Stoffmenge an unmarkiertem rT_3 ein, die entsprechend der erwarteten Aktivität des jeweiligen Isoenzym gewählt wird, wobei die Stoffmenge an ^{125}I - rT_3 zu vernachlässigen ist.

AG 50W-X2 Säulen	AG 50W-X2 Die Substanz wurde in 10 %iger (v/v) CH_3COOH gelöst und in Sarpettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht) gefüllt, die mit Filtern (Porengröße 10 μM ; MoBiTec, Göttingen) abgedichtet wurden.	60 % (w/v).
BSA-Stopplösung	BSA (Faktion V) PTU-Stammlösung H_2O bidest. ad 10 ml (Lagerung $-20\text{ }^\circ C$).	10 % (w/v) 10 mM;
Elutionslösung	EtOH NH_3	98 % (v/v) 2 % (v/v).
Kaliumphosphatpuffer	K_2HPO_4 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ pH 9,4 mit NaOH (Puffer A). KH_2PO_4 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ pH 4,4 mit HCl (Puffer B). Puffer A vorlegen, dann durch Zugabe des Puffers B bis zum Erreichen von pH 6,8 titrieren.	1 M 10 mM; 1 M 10 mM;
PTU-Stammlösung	PTU in 40 mM NaOH suspendieren und durch Zugabe von 0,1 M NaOH lösen, pH $\leq 9,0$. Verdünnungen der PTU-Stammlösung wurden in 40 mM NaOH angefertigt (Lagerung $-20\text{ }^\circ C$).	50 mM;
rT_3-Stammlösung	rT_3 (Formula, Berlin) in 40 mM NaOH. 1 mM Gebrauchslösungen wurden in 40 mM NaOH hergestellt (Lagerung $-20\text{ }^\circ C$). Die Konzentration der Lösung wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge (λ) von 322 nm bestimmt, wobei für T_3 $\epsilon_{322} = 4660 [l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$ ist.	10 mM;
Sephadex LH-20	Sephadex LH-20 in 100 mM HCl. Direkt vor Gebrauch durch Schütteln homogenisieren.	20 % (w/v);

2.5.5 Malatenzym-Assay

Mit Hilfe dieses Assays kann die enzymatische Aktivität des Malatenzyms bestimmt werden, das in Gegenwart des Cofaktors NAD(P)⁺ sowie des 2-wertigen Metallions Mn²⁺ die oxidative Decarboxylierung von L-Malat zu Pyruvat katalysiert, wobei die Quartärstruktur des zytosolischen Proteins durch Mn²⁺ während der Reaktion stabilisiert wird (Chang und Tong 2003). Bei diesem zweistufigen Reaktionsprozess wird der geschwindigkeitsbestimmende erste Teilschritt der Reaktion, die Reduktion von NAD(P)⁺ zu NAD(P)H, zur Bestimmung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt.



Probenaufarbeitung - Zur Herstellung der Proteinhomogenate wurden ca. 50 mg Gewebepulver in 300 µl S-Tris-EDTA aufgenommen und mit Hilfe einer Spritze sowie einer 24G x 1" Gauge-Kanüle (B. Braun Biotech International, Melsungen) auf Eis homogenisiert. Nach Zentrifugation (4 °C, 10.000 x g, 10 Minuten) wurde die im Überstand enthaltene Proteinkonzentration zytosolischer Proteine entsprechend der in 2.5.2 beschriebenen Vorgehensweise bestimmt. Aliquots der Homogenate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Vorbereitung und Durchführung - Nach Inkubation des Referenz- bzw. Substratmixes bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe des Proteinhomogenats gestartet. Dazu wurden nach Optimierung 500 µg Protein der aufgearbeiteten Proben bzw. 500 µg Protein der Kontrolle (Mausleber) eingesetzt. Die Bestimmung der Malatenzymaktivität erfolgte bei einer Wellenlänge (λ) von 340 nm mit Hilfe des Programms Hitachi UV Solutions 1.2 (Hitachi Instruments, San Jose, CA/USA) im Spektralphotometer U-2001 (Hitachi High-Technologies, Workingham, Berkshire/UK).

Substratmix		Referenzmix	
Triethanolamin-Puffer	166,6 µl	Triethanolamin-Puffer	166,6 µl
1x L-Malat	49,8 µl	1x L-Malat	49,8 µl
MnCl ₂	33,2 µl	MnCl ₂	33,2 µl
NADP ⁺	400,0 µl		
Protein	500,0 µg	Protein (Mausleber)	500,0 µg
H ₂ O bidest. ad	1000,0 µl	H ₂ O bidest. ad	1000,0 µl

Berechnung der Enzymaktivität - Die Messung der Proben erfolgte in Triplikaten über einen Zeitraum von 10 Minuten, wobei ausschließlich die im linearen Bereich im Zeitraum von 320 - 700 Sekunden gemessene Extinktionsänderung (ΔE_{340}) bei der Auswertung berücksichtigt wurde.

$$\Delta c = \frac{\Delta E_{340} [\text{min}^{-1}] * V_{\text{Ansatz}} [\text{ml}]}{\epsilon_{340} [\text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}] * d [\text{cm}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} \quad (8)$$

Δc	Konzentrationsänderung [$\text{mmol} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
ΔE_{340}	Extinktionsänderung bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ [min^{-1}]
ϵ_{340}	molarer Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{340} = 6230 [\text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$)
m_{Protein}	Proteinmenge [mg]
V_{Ansatz}	Gesamtvolumen [ml]

Die Berechnung der Malatenzymaktivität [$\text{mmol NAD(P)H} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$] erfolgte unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADP^+ mit Hilfe der oben aufgeführten Formel.

10x L-Malat	α -Malat pH 7,4 mit KOH (Lagerung $-20 \text{ }^\circ\text{C}$).	300 mM;
MnCl₂	MnCl ₂	0,12 mM.
NADP⁺	NADP ⁺	3,4 mM (Lagerung $-20 \text{ }^\circ\text{C}$).
S-Tris-EDTA	Succrose Tris-HCl, pH 7,4 EDTA	250 mM 50 mM 0,1 mM; Sterilfiltration.
Triethanolamin-Puffer	Triethanolamin pH 7,4 mit KOH.	69,9 mM;

2.5.6 Iodid-Aufnahme-Assay

Mittels des *in vitro* durchgeführten Iodid-Aufnahme-Assays kann über die Bestimmung der Aufnahmerate extrazellulär über das Medium zur Verfügung gestellten radioaktiv markierten Natriumiodids (^{125}NaI) der Iodidtransport in das Lumen von Thyrozyten charakterisiert werden (Marcocci et al. 1983; Weiss et al. 1984). Um den Einfluss von 4-MBC auf den Iodidtransport zu untersuchen sowie direkt kompetitive Effekte und Effekte, die Transkription und Translation von NIS betreffen, zu unterscheiden, wurden

Schilddrüsenzellen der Linie FRTL-5 unmittelbar vor Durchführung der Messung oder aber nach einer 5-tägigen Inkubationszeit mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert.

Die Zellen wurden zunächst im Verhältnis 1:4 gesplittet, in 24-well-Platten ausgesät und entsprechend der in 2.2.3 beschriebenen Kulturbedingungen gehalten. Zur Analyse des Inkubationseffektes wurden die Zellen in Gegenwart der Kontroll- bzw. Testsubstanzen kultiviert, indem serielle Verdünnungen der UV-Filtersubstanz 4-MBC in einem Konzentrationsbereich von 10 nM - 100 µM aus einer 100 mM Stocklösung hergestellt und dem Kulturmedium zugesetzt wurden. Thyrozyten, die mit 1 % DMSO inkubiert wurden, dienten als Lösungsmittelkontrolle; dagegen wurden mit 1 µM RA bzw. 100 mM NaClO₄ inkubierte FRTL-5-Zellen als Positivkontrollen mitgeführt (Schmutzler et al. 1997; Spitzweg et al. 1999). Die von Furlanetto et al. nachgewiesene Expression von ERs in FRTL-5-Zellen wie auch die Responsivität von NIS gegenüber Östrogenen erforderten zusätzlich die Inkubation mit E₂, um mögliche östrogene Effekte der Testsubstanz 4-MBC auf den Iodidtransport beurteilen zu können (Furlanetto et al. 1999). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 0,5 ml HBSS wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Assaypuffer gestartet. Zur Untersuchung direkt kompetitiver Effekte wurden die Kontrollsubstanzen bzw. die Testsubstanzen erst dem Assaypuffer der obigen Beschreibung entsprechend zugesetzt.

Zur Bestimmung der Aufnahmerate radioaktiv markierten Natriumiodids wurde Na¹²⁵I (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA/USA) mit einer spezifischen Aktivität von 100 µCi/µl als Substrat verwendet - durch Verdünnung in 1 mM NaOH wurde eine Endkonzentration von 10 - 20 µCi/µl erreicht. Die Aufnahme des Substrats erfolgte während einer 30-minütigen Inkubationsphase bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Entfernen des Assaypuffers sowie einem direkt angeschlossenen Waschschrift mit BSA-haltigem Waschpuffer beendet bevor die Zellen mit 1 ml eiskaltem EtOH überschichtet und 20 Minuten bei -20 °C inkubiert wurden. Auf diese Weise wurde das im Thyrozyten akkumulierte ¹²⁵I⁻ extrahiert und nachfolgend mit 100 µl Na-Dithionit, das die Oxidation von I⁻ zu flüchtigem Iod verhindert, in den zur Messung verwendeten Zählröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) vereinigt. Parallel wurden zur Bestimmung der Hintergrundaktivität leere wells in der gleichen Weise behandelt. Die Detektion der aufgenommenen Konzentration an ¹²⁵I⁻ erfolgte in Triplikaten im Gammacounter (LKB Wallac, Turku/Finnland). Zur Berechnung der Aufnahmerate des akkumulierten ¹²⁵I⁻ wurden die Resultate der Messung nach Abzug der Hintergrundaktivität auf die Proteinkonzentration der Zellen normiert. Dazu wurden die Zellen nach Abschluss der

Reaktion zunächst mit 300 µl 100 mM NaOH/well 1 Stunde auf Eis inkubiert bevor 30 µl des Ansatzes zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford eingesetzt wurden.

Assaypuffer	HBSS	15,0 ml
	NaI	10,0 µM
	¹²⁵ NaI	10 - 20 µCi/µl
	BSA (Fraktion V)	0,1 % (w/v).

HBSS	NaCl	137,0 mM
	Hepes	10,0 mM
	Glucose	5,5 mM
	KCl	5,4 mM
	CaCl ₂	1,3 mM
	MgSO ₄	0,4 mM;
	pH 7,3 mit NaOH.	

Waschpuffer	HBSS	30 ml
	BSA (Fraktion V) (Stock 10 mg/ml)	1 % (w/v) (Lagerung -20 °C).

2.5.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli werden Proteine ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt (Laemmli 1970). Durch Zusatz eines Reduktionsmittels werden die Disulfidbrücken zwischen den Peptidketten, die für die Ausbildung der Tertiär- und Quartärstruktur im Protein benötigt werden, reduziert. Die aus der Interaktion mit Natriumdodecylsulfat (SDS) resultierenden Komplexe erhalten durch Sulfatgruppen eine gleichmäßig negative Ladung und werden somit im elektrischen Feld gemäß ihrem *Stokes*-Radius, der das Molekulargewicht der Proteine widerspiegelt, aufgetrennt.

Probenaufarbeitung - Die Herstellung der Proteinhomogenate mit anschließender Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte gemäß der in 2.5.1 und 2.5.2 beschriebenen Vorgehensweise. Abhängig vom Gewebe wurden nach erfolgter Optimierung 25 - 100 µg Protein zunächst mit der entsprechenden Menge 4x Probenpuffer versetzt bevor die Proben bei 96 °C im Heizblock denaturiert wurden. Eine Ausnahme bildeten die zur Detektion von NIS eingesetzten Proben, die zur Verwendung des in Tab. 5 aufgeführten Antikörpers den Herstellerangaben entsprechend bei 40°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten

wurden. Dabei führt das im Probenpuffer enthaltene Reduktionsmittel DTT durch Spaltung der Disulfidbrücken zur Auflösung der Sekundärstruktur, wodurch der Einfluss der räumlichen Gestalt des Proteins auf das Laufverhalten minimiert wird. Zusätzlich werden auf diese Weise durch die intakte Struktur des Proteins verborgene Epitope desmaskiert.

Vorbereitung und Durchführung - Vor Durchführung der SDS-PAGE wurden unter Verwendung der in Tab. 4 aufgeführten vertikalen Elektrophoresekammern zunächst abhängig von der Größe des untersuchten Proteins 1 mm starke Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 10 - 15 % hergestellt, die nach Polymerisation mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet wurden.

	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
20 % Gellösung	50 %	75 %	25 %
Sammelgelpuffer	-	-	25 %
Trenngelpuffer	25 %	25 %	-
H ₂ O bidest.	25 %	-	50 %
10 % APS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED	1,0 %	1,0 %	1,0 %

Nach Konzentration im Sammelgel bei 60 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bis zum Austreten der Lauffront des 4x Probenpuffers in Gegenwart von 1x Laufpuffer bei 120 V. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteingemische wurden folgende parallel mitgeführte *prestained*-Marker verwendet, anhand derer die Auftrennung im zeitlichen Verlauf verfolgt werden konnte: Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, München), Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Roth) sowie Serva Recombinant SDS PAGE Protein Marker 10 - 150 KDa Plus (Serva Feinbiochemika, Heidelberg). Im Anschluss wurden die Gele entsprechend der in 2.5.8 erläuterten Vorgehensweise geblottet, um die Expression der Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachzuweisen.

4x Probenpuffer	Glycin	50,0 % (v/v)
	Tris-HCl, pH 7,5	200 mM
	DTT	125 mM
	SDS	4,00 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,04 % (w/v);
	H ₂ O bidest. ad 50 ml (Lagerung -20 °C).	
10x Laufpuffer	Glycin	1,92 M
	Tris	0,25 M mit 1 % (w/v) SDS.

1x Laufpuffer	10x Laufpuffer H ₂ O bidest. ad 1000 ml.	100 ml;
10 % APS	APS H ₂ O bidest. ad 1 ml (Lagerung -20 °C).	10 % (w/v);
20 % Gellösung	Rotiphorese [®] Gel A Rotiphorese [®] Gel B H ₂ O bidest. ad 250 ml.	64,92 % (v/v) 26,00 % (v/v);
Sammelgelpuffer	Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M mit 0,4 % (w/v) SDS.
Trenngelpuffer	Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M mit 0,4 % (w/v) SDS.

2.5.8 Western blot-Analyse

Mit Hilfe der Western blot-Analyse werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische unter Einfluss eines vertikal zur Membran angelegten elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dadurch immobilisiert. Dabei wird das SDS ausgewaschen, so dass die Proteine teilweise renaturieren und somit wieder ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur einnehmen. Der Nachweis der Proteine erfolgt mittels spezifischer Antikörper, die mit Hilfe Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierter Sekundärantikörper detektiert und unter Verwendung des „*enhanced chemiluminescence*“ (ECL)-Systems visualisiert werden.

Der Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische auf eine Nitrocellulosemembran (OPTITRAN[®] BA-S 85, Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte nach Äquilibrieren der Membran in 1x Transferpuffer bei einer Spannung von 25 V und einer Stromstärke von ca. 1 mA/cm² mit Hilfe eines Semi-Dry-Blot-Systems (Transblot[®] SD, Bio-Rad Laboratories, München). Die Transferleistung wurde im Anschluss durch Färbung mit Ponceau-S überprüft bevor die Membran zur Reduktion unspezifischer Hintergrundreaktionen 45 Minuten in Blockierungslösung inkubiert wurde. Parallel dazu wurde das SDS-Gel mit Coomassie-*Blue* gefärbt und nach Zugabe der Entfärbelösung über einen Zeitraum von 1 - 2 Stunden bei RT entfärbt. Die Färbung der im Gel verbliebenen Proteine erlaubt eine zusätzliche Aussage bezüglich der Effizienz des Transfers. Der initiale Schritt der Immundetektion zur quantitativen Beurteilung der Proteinexpression erfolgte gemäß Herstellerangaben durch die Reaktion der in Tab. 5 aufgeführten primären Antikörper mit dem Epitop des Antigens in Blockierungspuffer

über Nacht bei 4 °C. Nach 60-minütiger Inkubation bei RT sowie dreimaligem Waschen der Membran in 1x TBST folgte die Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes durch Zugabe der in Tab. 7 aufgeführten HRP-konjugierten Sekundärantikörper entsprechend der angegebenen Verdünnung.

Blockierungslösung	Trockenmilchpulver 1x TBST ad 50 ml.	5 % (w/v);
Coomassie Blue	H ₂ O bidest. Methanol CH ₃ COOH mit 5 % Coomassie R-250; Filtration.	45,45 % (v/v) 45,45 % (v/v) 9,10 % (v/v);
Entfärberlösung	Methanol CH ₃ COOH H ₂ O bidest. ad 1000 ml.	45 % (v/v) 10 % (v/v);
Ponceau-S-Färbelösung	CH ₃ COOH Ponceau-S H ₂ O bidest. ad 500 ml.	5,0 % (v/v) 0,1 % (w/v);
10x TBST	NaCl Tris Tween 20 pH 8,0 mit HCl.	1,25 M 0,25 M 3 % (v/v);
1x TBST	10x TBST H ₂ O bidest. ad 1000 ml.	100 ml;
10x Transferpuffer	Glycin Tris pH 8,3 mit HCl.	190 mM 25 mM;
1x Transferpuffer	10x Transferpuffer Methanol H ₂ O bidest. ad 1000 ml.	100 ml 10 % (v/v);

Die Visualisierung der Proteinexpression erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran in 1x TBST durch Zugabe von ECL-Lösung (ECL-Western Blotting Detection Reagent™ GE Healthcare, München), wobei das in der Lösung enthaltene Luminol unter alkalischen Bedingungen in einer Peroxidase/H₂O₂-katalysierten Reaktion oxidiert wird. Die mit Hilfe eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare,

München) im Entwicklungsautomaten (X-OMAT 1000, Kodak Company, Rochester, NY/USA) detektierten Chemilumineszenzsignale wurden Hilfe der Software TINA 2.09 (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt) ausgewertet.

2.6 Tierexperimentelle Praxis

Alle unter der Leitung von Prof. Dr. W. Wuttke (Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen) bzw. PD Dr. F. Götz (Experimentelle Endokrinologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin) durchgeführten Experimente erfolgten nach Genehmigung durch die zuständigen örtlichen Behörden und wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

2.6.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die zur Untersuchung chronischer Effekte von EACs verwendeten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten stammten aus der Zucht der AG Prof. Dr. W. Wuttke der Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen, während die zur Analyse subakuter Effekte benötigten Tiere über die Firma Winkelmann (Borchen) bezogen wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 ± 1 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % in Typ IV Makrolon[®]-Käfigen in der Tierhaltung der Universitätsmedizin Göttingen.

Die für die Experimente zur Dosisfindung verwendeten 129S2/SvPasCrl-Wildtypmäuse wurden über die Firma Charles River Laboratories (L'Arbresle/Frankreich) bezogen, während die benötigten C57BL/6-Mäuse aus der Zucht der AG Dr. U. Schweizer, Neurobiologie des Selens, Charité - Universitätsmedizin Berlin, stammten.

Zur Untersuchung TR-vermittelter Effekte von EACs wurden TR α -defiziente Tiere (TR α ^{0/0}) verwendet, die zunächst durch die AG Prof. Dr. J. Samarut, École normale supérieure de Lyon (ENS), Lyon/Frankreich, zur Verfügung gestellt wurden. Zucht und Haltung der für die Durchführung des Experiments benötigten Tiere erfolgten unter Standardbedingungen bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus in Typ III IVC-Käfigen (*individually ventilated cages*) in der Tierhaltung des „Center for Cardiovascular Research“ (CCR) der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

2.6.2 Futtermittel

Die Tiere erhielten eine über die Firma Ssniff Spezialdiäten (Soest) bezogene phytoöstrogenarme pelletierte Spezialdiät, die im Gegensatz zu herkömmlichen Futtermischungen keine Soja- und Luzernenprodukte enthält und daher durch einen sehr geringen Gehalt an Genistein, Daidzein und Coumestrol - sogenannten Phytosteroiden - charakterisiert ist, jedoch weiterhin eine ausreichende Versorgung mit Iod (2,1 mg/kg Futter) bzw. Selen (0,4 mg/kg Futter) gewährleistete. Zur Untersuchung chronischer Effekte von EACs wurde Futter auf Basis der beschriebenen phytoöstrogenarmen Spezialdiät zusätzlich mit den in Tab. 15 und Tab. 16 aufgeführten Referenz- bzw. Testsubstanzen versetzt und als Sonderanfertigung über die Firma Ssniff Spezialdiäten (Soest) bezogen. Dies gewährleistete eine homogene Aufnahme der Substanzen über den gesamten Versuchszeitraum. Parallel wurde der Einfluss der regulär im Haltungsfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest) enthaltenen Phytoöstrogene untersucht, indem dieses ebenfalls mit den in Tab. 15 und Tab. 16 gelisteten Referenz- und Testsubstanzen versetzt wurde. (Phytoöstrogenarmes) Futter und Trinkwasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.6.3 Ovariectomie

Die Ovariectomie (OVX) weiblicher Sprague-Dawley-Ratten erfolgte nach Erreichen der Geschlechtsreife, um den Einfluss endogener Östrogene und somit zyklusbedingte Schwankungen bezüglich des Steroidniveaus auszuschließen. Die Ovariectomie der zur Analyse chronischer Effekte exogener Substanzen eingesetzten Tiere erfolgte im Alter von 4 Monaten nach kurzer Anästhesie mit CO₂ und anschließender intraperitonealer Applikation des Narkotikums - 62,5 mg Ketamin/kg b.w. (Hostaket[®], Hoechst, Frankfurt a.M.) und 7,5 mg Xylazin/kg b.w. (Rompun[®], Bayer, Leverkusen), während die zur Untersuchung subakuter Effekte verwendeten Tiere im Alter von 2 Monaten unter leichter Ethernarkose ovariectomiert wurden. Zum Schutz der Augen wurde ein hydratisierendes Gel (Thilo-Tears[®], Alcon Pharma, Freiburg) verwendet. Nach Rasur und Desinfektion der Flanken erfolgte anschließend die abdominale Inzision 2 cm caudal der Rippenbögen. Zur bilateralen Entfernung der Ovarien wurden diese nach erfolgter Präparation mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt) ligiert und schließlich entfernt. Nach Reposition des Uterus wurden die verletzte Muskelschichten mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Die Haut wurde im Anschluss mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Supramid[®], Braun-

Aeskulap, Tuttlingen) verschlossen und zusätzlich mit Michel-Klammern[®] (Martin-Medizintechnik, Tuttlingen) gesichert. Zur Vorbeugung postoperativer Dehydratation wurden subkutan 5 ml einer 0,9 %igen (w/v) NaCl-Lösung (B. Braun Biotech International, Melsungen) injiziert. Zur schnelleren Regeneration erhielten die Tiere eine einmalige Dosis von 0,5 mg Atipamezol-HCl/kg b.w. (Antisedan[®], Pfizer, Zürich). Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose beobachtet. Die Ovariectomien wurden durch die AG Prof. Dr. W. Wuttke der Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.6.4 Dosierung der Referenz- und Testsubstanzen

2.6.4.1 Referenzsubstanzen und Lösungsmittelkontrollen

Tab. 15: Referenzsubstanzen und Lösungsmittelkontrollen.

Substanz	Abkürzung	Konzentration	Applikation	Bezugsquelle
Chronische Applikation in Sprague-Dawley-Ratten				
17β-Estradiol-3-benzoat	E ₂	2,56 mg/kg b.w. ^a	Futter	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Subakute Applikation in Sprague-Dawley-Ratten				
Olivenöl (<i>O. olivae</i>)	Kontrolle		Gavage	Caesar & Loretz (Hilden)
17β-Estradiol-3-benzoat	E ₂	0,6 mg/kg b.w.	Gavage	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin	T ₄	0,040 % (w/v) 0,024 % (w/v)	Trinkwasser Gavage	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Methimazol	MMI	1,0 % (w/v)	Gavage	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Vorversuche im Wildtyp-Mausmodell und chronische Applikation im TRα^{0/0}-Modell				
Erdnussöl (<i>O. arachidis</i>)	Öl		s.c./Gavage	Caesar & Loretz (Hilden)
Dimethylsulfoxid	DMSO	max. 1,5 % (v/v)	s.c./i.p.	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
1x PBS	PBS		i.p.	Eigenherstellung
3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin	T ₄	0,3 mg/kg b.w.	i.p.	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Methimazol NaClO ₄	MMI/NaClO ₄	0,1 % (w/v) 1,0 % (w/v)	Trinkwasser	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)

^a Aufgrund der hohen Varianzen bezüglich des Futtermittelsverbrauchs wie auch des Körpergewichts wurden in regelmäßigen Abständen Gewichtskontrollen und Futtermittellrückwaagen durchgeführt. Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde für E₂ eine Konzentration von 0,61 mg/Tier/Tag berechnet.

2.6.4.2 *Endokrin aktive Substanzen*

In Tab. 16 sind die zur Untersuchung endokriner Effekte eingesetzten Testsubstanzen aufgeführt. Dabei ist zu beachten, dass 4-MBC zur Analyse chronischer Exposition im Rattenmodell in zwei Konzentrationsbereichen eingesetzt wurde, die nachfolgend entsprechend ihrer Konzentration jeweils als „low“ bzw. „high“ bezeichnet wurden.

Tab. 16: Testsubstanzen.

Substanz	Abkürzung	Konzentration [mg/kg b.w.]		Applikation	Bezugsquelle
		low	high		
Chronische Applikation in Sprague-Dawley-Ratten					
4-Methylbenzyliden-campher	4-MBC	234,0 ^a	1220,0 ^a	Futter	Merck (Darmstadt)
Subakute Applikation in Sprague-Dawley-Ratten					
4-Methylbenzyliden-campher	4-MBC	10 - 600		Gavage	Merck (Darmstadt)
Vorversuche im Wildtyp-Mausmodell					
4-Methylbenzyliden-campher	4-MBC	10,0 - 185,0		s.c./Gavage	Merck (Darmstadt)
F21388	F21388	2,5 - 15,0		s.c.	Prof. Dr. P. Schreier (Universität Würzburg)
Genistein	GEN	2,5 - 15,0		s.c.	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Chronische Applikation im TR$\alpha^{0/0}$-Modell					
F21388	F21388	7,5		s.c.	Prof. Dr. P. Schreier (Universität Würzburg)
Genistein	GEN	7,5		s.c.	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)

^a Aufgrund der hohen Varianzen bezüglich des Futtermittelsverbrauchs wie auch des Körpergewichts wurden in regelmäßigen Abständen Gewichtskontrollen und Futtermittelrückwaagen durchgeführt. Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde für 4-MBC low eine Konzentration von 66 mg/Tier/Tag und für 4-MBC high eine Konzentration von 310 mg/Tier/d berechnet.

2.6.4.3 *Applikation*

Sprague-Dawley-Ratten

Zur initialen Beurteilung möglicher Effekte von EACs auf die thyreotrope Achse wurden adulte weibliche Sprague-Dawley-Ratten nach bilateraler Ovariectomie über einen Zeitraum von 12 Wochen mit Substanzen bekannter gonadotroper Wirkung behandelt (Abb. 5). Die in Tab. 15 und Tab. 16 aufgeführten Referenz- bzw. Testsubstanzen wurden als Sonderanfertigung der Firma Ssniff Spezialdiäten (Soest) regulärem

Haltungsfutter bzw. einer phytoöstrogenarmen Spezialdiät zugesetzt, um eine möglichst gleichmäßige Aufnahme der EACs zu gewährleisten. Neben unbehandelten ovariectomierten Tieren dienten auch Tiere, denen die Referenzsubstanz E₂ entsprechend der in Tab. 15 aufgeführten Konzentration verabreicht wurde, als Kontrollen. Aufgrund der hohen Varianz bezüglich des Futtermittels wie auch des Körpergewichts innerhalb der jeweiligen Gruppen wurden in regelmäßigen Abständen Gewichtskontrollen durchgeführt. Darüber hinaus wurde der tägliche Futtermittelverbrauch der Tiere ermittelt, der in der Regel bei 18 - 22 g/Tag lag, um die tatsächlich aufgenommenen Konzentrationen der Referenz- bzw. Testsubstanzen, die in mg/kg b.w. angegeben werden, anhand des durchschnittlichen Körpergewichts (250 - 300 g) der Tiere sowie deren Futtermittelverbrauch näherungsweise berechnen zu können. Mögliche Einflüsse variierender Konzentrationen der aufgenommenen Substanzen auf Metabolismus und Bioverfügbarkeit wurden somit dokumentiert.

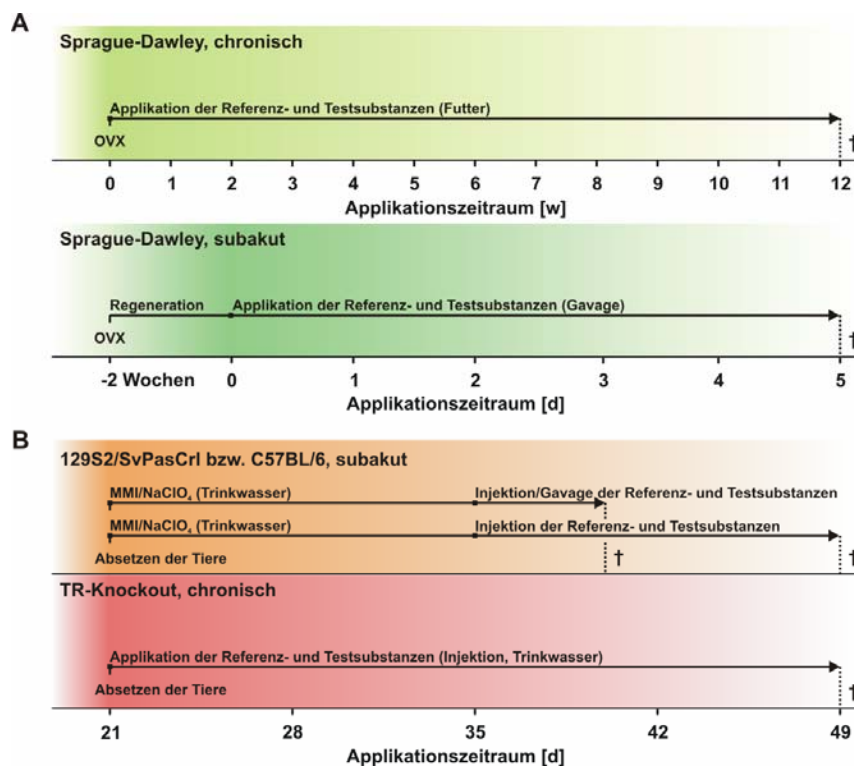


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der *in vivo*-Experimente in Ratte und Maus.

(A) Die Experimente zur Untersuchung chronischer Effekte von 4-MBC wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen in weiblichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Applikation der Referenz- und Testsubstanzen erfolgte nach bilateraler Ovariectomie oral über speziell angefertigte (phytoöstrogenarme) Futtermittel. Die Charakterisierung subakuter Effekte von 4-MBC erfolgte nach bilateraler Ovariectomie (OVX) und zweiwöchiger Rekonvaleszenz durch tägliche Gavage weiblicher Sprague-Dawley-Ratten über einen Zeitraum von 5 Tagen. (B) Im Wildtyp-Mausmodell (129S2/SvPasCrl bzw. C57BL/6) durchgeführte Experimente zur Dosisfindung erfolgten im Alter von 35 Tagen nach zweiwöchiger Adaptation durch subkutane Injektion der Substanzen bzw. orale Applikation über das Trinkwasser oder aber mittels Gavage über einen Zeitraum von 5 - 14 Tagen. Die chronische Applikation von GEN und F21388 im

TR α ^{0/0}-Modell erfolgte direkt nach dem Absetzen über einen Zeitraum von 4 Wochen durch subkutane/intraperitoneale Injektion oder orale Applikation über das Trinkwasser, um die chronischen Effekte der getesteten Substanzen in Abhängigkeit des Geschlechts zu charakterisieren. ▫ Applikationsstart; † Tötung der Tiere mit anschließender Blut- und Organentnahme.

Anhand der nachfolgend durchgeführten Experimente zur Beurteilung subakuter Effekte von 4-MBC sollte deren (ant-)agonistische Wirkungsweise im Hinblick auf Veränderungen im Feedbackmechanismus sowie der Biosynthese und Wirkung der Schilddrüsenhormone T₄ und T₃ näher charakterisiert werden. Die verwendeten Sprague-Dawley-Ratten wurden nach bilateraler Ovariectomie mit anschließender zweiwöchiger Rekonvaleszenz zu Gruppen von jeweils 12 Tieren mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 - 250 g zusammengefasst. Die Applikation der in Tab. 15 und Tab. 16 gelisteten Kontroll- bzw. Testsubstanzen erfolgte in 24 Stunden-Intervallen *per gavage* (Knopfkanülen, Robert Helwig, Berlin). Das Applikationsvolumen der in Olivenöl suspendierten Substanzen betrug 1 ml, wobei die tägliche Bestimmung des Körpergewichts eine genaue Dosierung der über einen Zeitraum von 5 Tagen behandelten Tiere ermöglichte. Als Kontrolle zur Interpretation möglicher gonadotroper Effekte wurde ein (semi)synthetischer Ester des Estradiols entsprechend der in Tab. 15 aufgeführten Konzentrationen verwendet - E₂. Als klassische Referenzsubstanzen der thyreotropen Achse wurden T₄ und MMI entsprechend der angegebenen Konzentrationen jedoch über einen erweiterten Zeitraum von 10 Tagen verabreicht, um die Induktion einer klassischen Hyperthyreose bzw. Hypothyreose sicherzustellen.

Die Experimente zur Untersuchung endokriner Effekte nach Langzeitexposition wie auch die Untersuchungen zur subakuten Applikation wurden im Rahmen eines EU geförderten Verbundprojektes („EURISKED - Multi-organic Risk Assessment of selected Endocrine Disrupters“) in Kooperation mit der AG Prof. Dr. W. Wuttke der Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen, durchgeführt.

Wildtyp- und TR α ^{0/0}-Mäuse

Mit Hilfe der im Anschluss durchgeführten Untersuchungen im TR α -Knockout-Modell sollten mögliche Interaktionen mit den Schilddrüsenhormonrezeptoren TR α bzw. TR β in Bezug auf das Geschlecht nach chronischer Applikation der Testsubstanzen analysiert werden. In Experimenten zur Dosisfindung wurden männliche Wildtypiere (129S2/SvPasCrl) nach einer zweiwöchigen Adaptationsphase bei phytoöstrogenarmer

Ernährung zu Gruppen von jeweils 5 Tieren mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 15 - 20 g zusammengefasst. Die zunächst in max. 1,5 % DMSO und anschließend in Erdnussöl gelösten in Tab. 15 und Tab. 16 aufgeführten Kontroll- und Testsubstanzen wurden mittels subkutaner bzw. intraperitonealer Injektionen über einen Zeitraum von 5 - 14 Tagen appliziert, wobei tägliche Kontrollen des Körpergewichts eine genaue Dosierung der Testsubstanzen (Injektionsvolumen $\leq 200 \mu\text{l}$) ermöglichten. Unbehandelte Tiere sowie mit DMSO bzw. Erdnussöl als Vehikel behandelte Tiere dienten als Kontrollen. Hypothyreote Kontrollen wurden über einen Zeitraum vom 21 Tagen durch im Trinkwasser gelöstes MMI/NaClO₄ mit 5 % Himbeersirup erzeugt (Zavacki et al. 2004). Die Applikation von T₄ zur Erzeugung hyperthyreoter Kontrollen erfolgte nach Verdünnung einer 10x Stocklösung in 1x PBS mittels intraperitonealer Injektion (Schomburg und Bauer 1995). In einem weiteren Versuch zur Dosisfindung wurden unter Einsatz der bereits beschriebenen Kontrollen C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter zusätzlich *per gavage* behandelt, um mögliche Stammunterschiede der verwendeten Wildtypiere sowie den Einfluss des Geschlechts bezüglich des Metabolismus von Xenobiotika auszuschließen. Die Untersuchungen zum Einfluss chronisch applizierter EACs in Abhängigkeit vom Geschlecht wurden im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell durchgeführt. Tiere aus eigener Zucht wurden nach dem Absetzen im Alter von 21 Tagen zu Gruppen von jeweils 10 Tieren zusammengefasst und über einen Zeitraum von 4 Wochen wie beschrieben mit den in Tab. 15 und Tab. 16 gelisteten Kontroll- bzw. Testsubstanzen behandelt. Während der Durchführung aller tierexperimentellen Arbeiten wurden die Versuchstiere täglich auf mögliche klinische Anzeichen toxischer Wirkungen der Testsubstanzen hin untersucht.

2.6.5 Tötung

Die Tötung der weiblichen Sprague-Dawley-Ratten erfolgte unter CO₂-Narkose durch Dekapitation mit Hilfe einer Guillotine, während die in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle zunächst durch CO₂-Narkose getötet wurden bevor die Blutentnahme aus der *V. cava* erfolgte. Die Tötungen erfolgten stets morgens 3 - 4 Stunden nach der letzten Substanzgabe bzw. 24 Stunden nach der letzten Injektion im Mausmodell, um eine Beeinträchtigung der Serumspiegel durch die zirkadiane Sekretion des TSH auszuschließen. Für die nachfolgende Bestimmung verschiedener Serumparameter wurde das durch Zentrifugation (4 °C, 10.000 x g, 10 Minuten) vom Blutkuchen getrennte Serum bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Untersuchung molekularbiologischer und biochemischer Parameter wurden folgende Organe direkt

nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert: Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse, Herz, Leber und Niere. Die Gehirne der im Versuch zur subakuten Applikation behandelten Sprague-Dawley-Ratten wurden nach der Entnahme zunächst auf Trockeneis gelagert, dann aber ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt. Die zur histologischen Analyse präparieren Organe wurden in 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Zur Präparation des MBH der im Subakutversuch behandelten Ratten wurden aus gefrorenen Gehirnen mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Frigomobil, Reichert-Jung, Bielefeld) Serienschnitte von 600 µm Dicke angefertigt. Die Isolation des MBH erfolgte nach Palkovits (Palkovits 1973), wobei die entsprechenden Koordinaten nach Paxinos (Paxinos und Watson 1998) ermittelt wurden. Die Präparation der Gewebeproben wurde von Frau C. Neitzel der AG Prof. Dr. W. Wuttke der Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen, durchgeführt.

2.7 Messung von Serumparametern

2.7.1 Serumanalyse von Hormonen

Die Serumanalyse der Hypophysen- und Schilddrüsenhormone erfolgte mittels Radioimmunoassay (RIA). Bei diesem kompetitiven Verfahren konkurrieren das in der Probe enthaltene Antigen sowie ein radioaktiv markierter Indikator um die freien Bindungsstellen eines spezifischen Primärantikörpers. Nach Fällung des Primärantikörperkomplexes wird die Aktivität der Probe, die sich umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten verhält, anhand einer parallel mitgeführten Standardkurve ausgewertet. Zur Bestimmung der Hypophysenhormone LH, Prolaktin und TSH in Sprague-Dawley-Ratten wurde entsprechend der angegebenen Literaturverweise verfahren, während zur Bestimmung der Serumkonzentrationen T₄ und T₃ die in Tab. 17 aufgeführten kommerziell erhältlichen Kits gemäß Herstellerangaben verwendet wurden (Baur et al. 2000; Roth et al. 2001). Die Serumanalysen erfolgten in der AG Prof. Dr. W. Wuttke der Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen.

Tab. 17: Reaktionssysteme zur Bestimmung von T₄ und T₃ in der Ratte.

Reaktionssystem	Bezugsquelle
T ₃ (Active [®] T ₃)	DSL (Sinsheim)
T ₄ (Active [®] Thyroxin)	DSL (Sinsheim)

Die Messung der Serumparameter TSH, T₄ und T₃ der in Wildtyp- und TRα^{0/0}-Tieren durchgeführten Analysen erfolgte durch Dr. M.O. Klein, Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy, Nancy/Frankreich, und Dr. R. Sapin, Hôpital Civil, Strasbourg/Frankreich, gemäß der in Streckfuß et al. beschriebenen Vorgehensweise (Streckfuß et al. 2005).

2.7.2 Serumanalyse proinflammatorischer Zytokine

Die Serumanalyse proinflammatorischer Zytokine erfolgte mit Hilfe des Multiplex-Immunoassays (Luminex), dessen Prinzip auf der konventionellen Sandwich-Assay-Technologie basiert - durch Nutzung der Luminex xMAP™ (*multiple analyte profiling*)-Technologie jedoch die simultane Messung diverser Serumparameter auch in kleinen Probenvolumina ermöglicht. Dazu werden monoklonale Antikörper nach Aktivierung durch EDC/Sulfo-NHS über Carboxylgruppen kovalent an die Oberfläche sogenannter „beads“ (*polystyrene microspheres*) gekoppelt, an die das entsprechende Antigen bindet. Die Detektion des Antigens erfolgt nach Zugabe des biotinylierten und im Folgeschritt durch Streptavidin-Phycoerythrin markierten Detektionsantikörpers durch Messung der Fluoreszenz im Luminex 200 System (Luminex, Austin, TX/USA). Die Verwendung eines Doppel-Laser-Systems in Kombination mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt zum einen die spezifische Erkennung der „beads“ und zum anderen die Detektion und Quantifizierung des emittierten Fluoreszenzsignals durch den Reporterkomplex. Die Auswertung der Daten erfolgte anhand einer Standardkurve mit Hilfe der Software Luminex 100 IS (Luminex, Austin, TX/USA).

Zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von IL-1β, IL-6 und TNFα der im Versuch zur subakuten Applikation mit 4-MBC behandelten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurde das LINCOp_{lex}™ Kit RCYTO-80K (Linco Research, St. Charles, MO/USA) gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.8 Histologische Methoden

2.8.1 Präparation von Organen zur histologischen Analyse

Die Präparation der in einer zweiblättrigen Bindegewebskapsel liegenden Schilddrüse zur histologischen Analyse erfolgte nach Entfernung der infrahyalen Muskulatur entweder an der Trachea verbleibend oder aber in Form einzelner Seitenlappen. Die

Präparate wurden mittels Immersionsfixation in 4 % (w/v) PFA fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Die Schilddrüsen der im Subakutversuch mit 4-MBC behandelten weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurden nach der Präparation jedoch zunächst bei -80 °C gelagert bevor sie in 4 % (w/v) PFA fixiert wurden.

4 % PFA	PFA	8 % (w/v); zunächst in 500 ml H ₂ O bidest. lösen, dann mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4 ad 1000 ml (Lagerung -20 °C).
NaH₂PO₄/Na₂HPO₄	0,2 M Na ₂ HPO ₄ , pH 8,8 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 4,1 pH 7,4 durch Titrieren mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 4,1.	80 % (v/v) 20 % (v/v)

2.8.2 Einbetten von Paraformaldehydpräparaten

Zur Herstellung von Paraffinpräparaten wurden die in 4 % (w/v) PFA fixierten Schilddrüsen zunächst in Einbettkassetten überführt und zum Auswaschen der Fixierlösung in 1x PBS gelagert (Herstellung 10x PBS siehe 2.2.3).

Die Entwässerung der Gewebe erfolgte durch eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe gemäß eines Standardprotokolls im Einbettautomaten (Leica Microsystems, Nussloch). Nach Inkubation in Intermedium (Xylol) wurden die Paraffin-getränkten Präparate parallel zur Schnittfläche orientiert, mit Hilfe einer Paraffinausgießstation (Leica Microsystems, Nussloch) eingebettet und nach Aushärten des Paraffins bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.8.3 Präparation der Gewebeschnitte

Die Anfertigung der 2 µm dicken Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Schilddrüsen erfolgte mit Hilfe des Rotationsmikrotoms RM2125 RT der Firma Leica Microsystems (Nussloch). Die Schnitte wurden bei 45 °C im Warmwasserbad (Medax, Kiel) gestreckt, anschließend auf beschichtete Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel, Braunschweig) aufgezogen und über Nacht bei 37 °C im Inkubator (Memmert, Schwabach) getrocknet. Die Schnitte wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert.

2.8.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ermöglichte als klassische Übersichtsfärbung eine initiale morphologische Beurteilung der Schilddrüsen. Das Prinzip der Färbung beruht auf der sogenannten Elektroadsorption, deren Grundlage der amphotere Charakter der Proteine ist.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst nach folgendem Protokoll entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert bevor die Kernfärbung mit einer 1:10 in H₂O bidest. verdünnten Hämatoxylinlösung erfolgte. Nach dem „Bläuen“ der Färbung unter fließendem Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte in H₂O bidest. gespült und anschließend zur Darstellung der zytoplasmatischen Bestandteile mit einer in der gleichen Weise verdünnten Eosinlösung gefärbt.

Alkoholreihe, absteigend	
Xylol	2 x 10 Minuten
EtOH 100 %	2 x 3 Minuten
EtOH 96 %	3 Minuten
EtOH 70 %	3 Minuten
EtOH 40 %	3 Minuten
HE-Färbung	
Hämatoxylin	5 Minuten
Leitungswasser, fließend	3 Minuten
H ₂ O bidest.	1 Minute
Eosin	5 Minuten
H ₂ O bidest.	1 Minute
Alkoholreihe, aufsteigend	
EtOH 70 %	3 Minuten
EtOH 96 %	3 Minuten
EtOH 100 %	2 x 3 Minuten
Xylol	2 x 5 Minuten

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe und Inkubation in Intermedium mit dem Einschlussmedium Entellan® Neu (Merck, Darmstadt) eingedeckt und über Nacht getrocknet.

Eosinlösung	Eosin Yellowish (Chroma, Münster)	1,25 % (w/v)
	EtOH	70,0 % (v/v);
der Lösung wurden direkt vor Gebrauch 4 % (v/v) Eisessig zugesetzt.		

Hämatoxylinlösung	Mayer's Hämatoxylin (Chroma, Münster)	0,200 % (w/v)
	Kalialaun	6,250 % (w/v)
	Chloralhydrat	6,250 % (w/v)
	Zitronensäure, kristallin	0,125 % (w/v)
	NaIO ₃	0,025 % (w/v).

2.8.5 Immunhistochemische Analyse

Die immunhistochemische Analyse dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten. Der hier eingesetzte indirekte Nachweis des entsprechenden Antigens durch das LSAB (*Labeled (Strept-)Avidin-Biotin*)-System, beruht auf einem dreistufigen Verfahren, das die hohe Bindungsaffinität von (Strept-)Avidin zu Biotin ausnutzt (Hsu und Raine 1981). Nach Reaktion des unkonjugierten Primärantikörpers mit einem Epitop des Antigens wird dieser Immunkomplex zunächst durch einen biotinylierten Sekundärantikörper gebunden, was zur Erhöhung der Sensitivität des Nachweises beiträgt. Mit Hilfe eines HRP-konjugierten (Strept-)Avidin-Biotin-Komplexes wird der Sekundärantikörper im nachfolgenden Schritt detektiert und durch Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)/Chromogen visualisiert, indem dieses Substrat durch HRP zu einem in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslichen braunen Niederschlag umgesetzt wird, der die Lokalisation des Proteins im Gewebeschnitt ermöglicht und darüber hinaus einen semiquantitativen Nachweis bezüglich der Expression des Proteins liefert.

Vor Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte zur hitzeinduzierten Antigen-Demaskierung unter Verwendung von 1x Citratpuffer (10x Target Retrieval Solution, DakoCytomation, Carpinteria, CA/USA) in der Mikrowelle erhitzt. Um unspezifische Färbungen im weiteren Verlauf der Analyse zu verhindern, wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation in 3 % (v/v) H₂O₂ blockiert. Nach zwei jeweils kurzen Waschschritten unter Verwendung der Waschlösungen A und B erfolgte die Proteinblockierung zur Reduktion unspezifischer Hintergrundreaktionen durch Inkubation in Blockierungsmedium (DakoCytomation, Carpinteria, CA/USA mit 0,3 % Tween 20). Die anschließende Inkubation der Gewebeschnitte mit den in Tab. 5 aufgeführten Primärantikörpern erfolgte unter Berücksichtigung der angegebenen Verdünnungen gemäß Herstellerangaben (Antibody Diluent, DakoCytomation, Carpinteria, CA/USA mit 0,3 % Tween 20). Im Anschluss folgten drei Waschschrritte - 1 Minute Waschlösung B, 3 x 5 Minuten Waschlösung A, 1 Minute Waschlösung B. Die Inkubation der Schnittpräparate mit dem

biotinylierten Sekundärantikörper und auch die Zugabe des HRP-konjugierten (Strept-)Avidin-Biotin-Komplexes erfolgten unter Verwendung des in Tab. 6 gelisteten LSAB™+ Systems-HRP (DakoCytomation, Carpinteria, CA/USA) gemäß Herstellerangaben, allerdings wurde die angegebene Inkubationszeit auf 30 Minuten verlängert. Zur Detektion des Immunkomplexes wurden die Gewebeschnitte abhängig vom verwendeten Primärantikörper 5 - 10 Minuten in DAB/Chromogen-Lösung (DakoCytomation, Carpinteria, CA/USA) inkubiert.

Zur Darstellung der Zellkerne wurde der immunhistochemischen Färbung eine Gegenfärbung mit Mayer's saurem Hämalaun angeschlossen. Die Gewebeschnitte wurden dazu mit einer 1:5 in H₂O bidest. verdünnten Hämalaunlösung 2 Minuten gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser „gebläut“ (Herstellung Hämatoxylinlösung siehe 2.8.4). Abschließend wurden die in H₂O bidest. gewaschenen Schnitte entsprechend der in 2.8.4 beschriebenen Vorgehensweise nach Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe und Inkubation in Intermedium mit Hilfe des Einschlussmediums Entellan® Neu (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

Waschlösung A 1x PBS (Herstellung 10x PBS siehe 2.2.3) mit 1 % (w/v) BSA, 0,2 % (v/v) Tween 20 und 0,8 % (w/v) NaCl.

Waschlösung B 1x PBS (Herstellung 10x PBS siehe 2.2.3) mit 1 % (w/v) BSA und 0,8 % (w/v) NaCl.

2.9 Statistik

Die im Ergebnisteil in Text und Graphiken aufgeführten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) bzw. Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). Zunächst wurde mit Hilfe des D'Agostino-Pearson-Tests überprüft, ob eine Normalverteilung der Daten sowie eine Homogenität der Varianzen vorliegen. Die nachfolgende statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einer Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*). Abhängig von der der Anzahl der zu untersuchenden Parameter erfolgte diese als einfaktorische Varianzanalyse (*one-way-ANOVA*) mit nachfolgendem Dunnett's Multiple Comparison-Test bzw. als zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way-ANOVA*) mit nachfolgendem Bonferroni-Post-Test. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA/USA).

Die statistische Auswertung der Genexpressionsdaten, die auf einem von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest beruht, erfolgte mit Hilfe der Software REST MCS (Pfaffl et al. 2002). Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert $< 0,05$ bezeichnet ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***). Bei kombinierter Applikation von sojahaltigem Futtermittel und Testsubstanz wurden als Kontrollen einerseits unbehandelte Tiere gleicher Diätintervention und andererseits unbehandelte Tiere, die auf sojafreier Diät gehalten wurden, betrachtet. Bei Untersuchungen zur Identifikation geschlechtsspezifischer Unterschiede wurden zusätzlich zum direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe desselben Geschlechts die weiblichen Tiere aller Gruppen mit der jeweiligen männlichen Kontrollgruppe verglichen.

Zur Darstellung von Dosis-Wirkungskurven sowie der zugehörigen IC_{50} -Werte wurden die Messwerte nach erfolgter logarithmischer Transformation zunächst normalisiert, indem die Messwerte der Kontrolle einem Maximalwert von 100 % gleichgesetzt wurden. Anschließend konnte mit Hilfe der Funktion „*sigmoidal dose-response*“ eine Kurvenanpassung berechnet werden (GraphPad Prism Software, San Diego, CA/USA).

3 Ergebnisse

Die Wirkungen von EACs auf die gonadotrope Achse sind in der Literatur umfassend dokumentiert (Toppari 2002; Naciff und Daston 2004; Guillette 2006). Erst kürzlich wurde ein zusätzlicher Einfluss von EACs auf die thyreotrope Achse gezeigt (O'Connor et al. 2002; Kloas und Lutz 2006; Köhrle 2008). Da Östrogene die Pathophysiologie der Schilddrüse beeinflussen, was beispielsweise durch die erhöhte Inzidenz von Schilddrüsenerkrankungen belegt ist, könnte die Wirkung von EACs auf die Schilddrüse direkt oder als östrogenen Effekt erfolgen. Entsprechend stellen Östrogene und die partiell noch immer unzureichende Iodversorgung in Europa weitere Risikofaktoren bei Exposition gegenüber thyreostatisch wirksamen Substanzen dar (Kumar et al. 1999; Knudsen et al. 2002b).

In der vorliegenden Arbeit wurde das endokrine Potential ausgewählter Substanzen mit hoher Humanrelevanz hinsichtlich der Effekte auf die thyreotrope Achse experimentell charakterisiert und auf molekularbiologischer sowie proteinbiochemischer Ebene analysiert. Dazu wurden unterschiedliche Versuchsansätze verfolgt, die sowohl Untersuchungen im Tiermodell als auch *in vitro*-Analysen beinhalten. Die Charakterisierung der Effekte von 4-MBC auf das Feedbacksystem sowie die Untersuchungen zum Einfluss auf Biosynthese und Metabolismus der Schilddrüsenhormone erfolgten in weiblichen, bilateral ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten nach chronischer bzw. subakuter Applikation der Testsubstanz. Die Analysen zur Charakterisierung TR-vermittelter sowie geschlechtsspezifischer Effekte von GEN und F21388 erfolgten nach Vorversuchen zur Dosisfindung mittels chronischer Applikation der Testsubstanzen im TR $\alpha^{0/0}$ -Mausmodell.

3.1 Charakterisierung chronischer Effekte von 4-MBC und Soja

Schwerpunkt der bisherigen Untersuchungen war die Charakterisierung der östrogenen Effekte des Kampferderivats 4-MBC. Wirkungen auf die thyreotrope Achse wurden zum Zeitpunkt der Betrachtung als Nebenbefunde bei der Analyse der gonadotropen Achse beschrieben. Die nachfolgend erläuterten Ergebnisse stammen aus einem Experiment mit weiblichen, ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten, die über einen Zeitraum von 12 Wochen mit der Testsubstanz behandelt wurden, um die Effekte chronischer Applikation zu untersuchen. Die Applikation erfolgte oral über

speziell pelletiertes Futtermittel, was eine homogene Aufnahme der Testsubstanz über den Versuchszeitraum gewährleistete. Die gewählte Konzentration von 4-MBC wurde anhand vorangegangener Versuche zur Dosisfindung ermittelt. Eine Konzentration von 2,5 g/kg Futter wurde im Folgenden mit „4-MBC *low*“ bezeichnet, während eine Konzentration von 12,5 g/kg Futter mit „4-MBC *high*“ betitelt wurde. Parallel wurde der Einfluss von Soja, das in herkömmlichen Futtermittelmischungen als Proteinquelle enthalten ist, analysiert, da seit den 60er Jahren eine goitrogene Wirkung für diese Stoffklasse beschrieben ist. Dabei ist Soja-Futter als phytoöstrogenhaltig und sojafreies Futter als phytoöstrogenarm einzustufen und damit weniger ligandenhaltig.

Die erhobenen Daten beschreiben den Einfluss von 4-MBC auf die Feedbackregulation der thyreotropen Achse sowie die Effekte auf Synthese, Transport und Metabolismus von Schilddrüsenhormonen. Die Applikation von E_2 diente als Referenzsubstanz, die im ovariectomierten Tier die Interpretation der Daten hinsichtlich der thyreotropen und HGP-Achse zulässt.

3.1.1 Einfluss auf das Körpergewicht und die Konstitution der Tiere

Um den Einfluss der Testsubstanz 4-MBC auf die Konstitution der Tiere auch während des 12-wöchigen Behandlungszeitraumes beurteilen zu können, wurde neben visuellen Kontrollen regelmäßig das Körpergewicht der Tiere sowie deren Futterverbrauch bestimmt. Die Konzentrationen der täglich über das Futter aufgenommenen Referenz- bzw. Testsubstanzen wurden anhand des durchschnittlichen Körpergewichts sowie der aufgenommenen Futtermittelmenge näherungsweise berechnet. Somit wurde für die Referenzsubstanz E_2 eine Konzentration von 2,56 mg/kg Körpergewicht ermittelt, während die Konzentrationen der Testsubstanz 4-MBC mit 234 mg/kg Körpergewicht (4-MBC *low*) bzw. 1220 mg/kg Körpergewicht (4-MBC *high*) beziffert wurden. Damit wurden die bei der Planung der Experimente veranschlagten Konzentrationen annähernd/ in guter Näherung erreicht.

Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere von 250 - 300 g konnte nach Applikation der Referenzsubstanz E_2 unabhängig von der Diät ein signifikant vermindertes Wachstum der Tiere gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Langzeiteffekte dieser Art sind für ovariectomierte Tiere nach Substitution mit E_2 in der Literatur beschrieben (D'Eon et al. 2005). Darüber hinaus konnte nach Applikation von 4-MBC *high* ± Soja bereits 4 Wochen nach Versuchsbeginn eine Reduktion des

Körpergewichts auf ~ 80 % des durchschnittlichen Ausgangsgewichts detektiert werden, während die Applikation von 4-MBC *low* keinen signifikanten Einfluss auf Wachstum und Körpergewicht hatte. Zwischen phytoöstrogenarmer Diät und Haltungsfutter konnte kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das Auftreten der toxischen Effekte machte eine Reduktion der Dosis erforderlich. Im Verlauf der weiteren 8 Wochen bis Versuchsende erhielten die Tiere 4-MBC mit einer Konzentration von 2,5 g/kg Futter.

3.1.2 Einfluss auf Feedback-assoziierte Parameter in der Hypophyse

Die Serumanalyse von TSH, T₄ und T₃ diente der initialen Charakterisierung der Wirkung von 4-MBC auf die thyreotrope Achse, da die an der Feedbackregulation beteiligten Hormone Interferenzen mit dem System verlässlich abbilden. Der Bestimmung der Serumparameter wurden Expressionsanalysen Feedback-assoziiierter Gene in der Hypophyse angeschlossen. Die mittels qPCR erhobenen Expressionswerte wurden auf das mittlere Expressionsniveau der Kontrollen bezogen, denen der relative Wert 1,0 zugeordnet wurde.

Die Bestimmung der Serumkonzentrationen von TSH zeigte nach Applikation von E₂ eine marginale Erhöhung gegenüber dem in den Kontrolltieren ermittelten Basalwert von 1,8 ng/ml. Die Applikation von 4-MBC führte nach einem Behandlungszeitraum von 12 Wochen konzentrationsunabhängig zu einem signifikanten Anstieg der TSH-Konzentration auf $\geq 3,4$ ng/ml. Soja hatte innerhalb der Kontrollgruppen keinen Effekt auf die TSH-Konzentration im Serum, zeigte aber nach Applikation von 4-MBC *high* im Vergleich zur sojafreien Gruppe einen marginal stärkeren Effekt mit einer Erhöhung der Serumwerte auf 3,7 ng/ml (Abb. 6 A). Die T₄-Konzentrationen der Referenzgruppe E₂ zeigten ausschließlich vor dem Hintergrund einer sojahaltigen Diät einen deutlichen Effekt gegenüber der zugehörigen Kontrolle, die ihrerseits mit einer Konzentration von 1,8 µg/dl gegenüber der (sojafreien) Kontrolle mit 4,4 µg/dl signifikant erniedrigt war. 4-MBC hatte in beiden Konzentrationen eine (signifikante) Reduktion der Serumkonzentration auf etwa 50 % zur Folge. Dahingegen wurde nach Applikation von 4-MBC *high* + Soja gegenüber den sojafrei gehaltenen Kontrolltieren eine signifikant verringerte Konzentration von T₄ festgestellt, die aber im Vergleich zu den Kontrolltieren der Sojagruppe keinen Effekt zeigte (Abb. 6 B). Mit Ausnahme einer leichten Erhöhung nach Applikation von 4-MBC *low* konnten keine Veränderungen der T₃-Konzentration im Serum festgestellt werden (Abb. 6 C). Die Expressionsanalyse von

Tshb (Abb. 6 D) und Dio2 (Abb. 6 E) zeigte keine Effekte durch die Referenzsubstanz E₂ auf die mRNA-Spiegel, während 4-MBC unabhängig von Konzentration und Diät die Transkription um Faktor $\leq 2,2$ verstärkte.

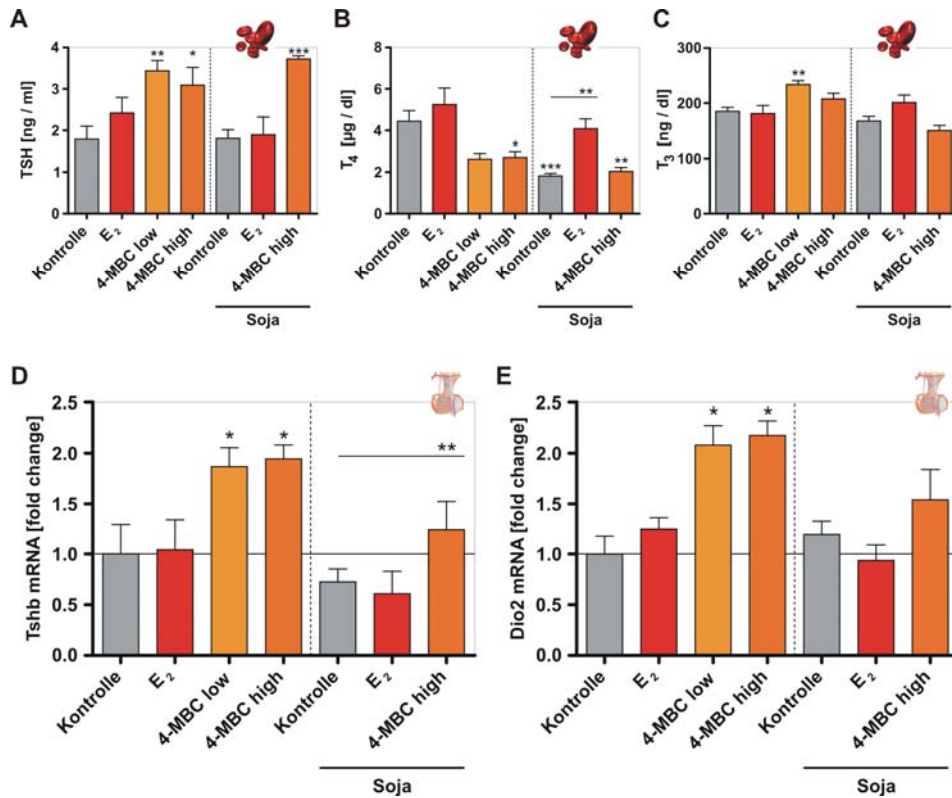


Abb. 6: Feedbackregulation nach chronischer Applikation von 4-MBC.

Die mittels RIA bestimmten Serumkonzentrationen von TSH, T₄ und T₃ wurden jeweils auf die Basalwerte der ovariektomierten Kontrollen \pm Soja bezogen. (A) Die Applikation von 4-MBC führte in beiden Konzentrationen unabhängig von der Diät zu signifikant erhöhten TSH-Konzentrationen im Serum. (B) Nach Gabe von 4-MBC war die Serumkonzentration von T₄ vermindert. Die Applikation von Soja allein hatte eine signifikante Reduktion der T₄-Konzentration zur Folge. (C) Die T₃-Spiegel zeigten ausschließlich nach Applikation von 4-MBC low einen signifikanten Anstieg, blieben aber nach Gabe von 4-MBC high unbeeinflusst. In der Hypophyse konnte nach Behandlung mit 4-MBC eine signifikante Erhöhung der Expression von Tshb (D) und Dio2 (E) nachgewiesen werden. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen \pm Soja normalisiert. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 4-8 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh (REST MCS). Die Serumparameter repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Die Resultate der Serumanalysen wie auch der Transkriptanalyse zeigten nach chronischer Applikation der Testsubstanz 4-MBC deutliche Veränderungen gegenüber der Kontrolle \pm Soja. Die Erhöhung der TSH-Konzentrationen im Serum wie auch die erniedrigten Serumkonzentrationen von T₄ deutet eine thyreostatische Wirkungsweise an. Darüber hinaus hatte die Referenzsubstanz E₂ mit Ausnahme des für T₄

nachgewiesenen Effekts keine signifikanten Effekte auf die untersuchten Parameter der thyreotropen Achse. Dieser Effekt ist aber vermutlich auf das im Futter enthaltene Soja zurückzuführen, da die Kontrolltiere gegenüber den phytoöstrogenarm gefütterten Tieren signifikant erniedrigte T_4 -Konzentrationen im Serum zeigten. Die Analyse der Feedback-assoziierten Gene *Tshb* und *Dio2* bestätigte diese ersten Ergebnisse.

3.1.3 Einfluss auf TSH- und T_3 -regulierte Zielgene der Schilddrüse

Sowohl die Aufnahme von Iodid ins Lumen des Thyrozyten als auch die Biosynthese der Schilddrüsenhormone erfolgt in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration im Serum und wird über den basolateral lokalisierten G-Protein gekoppelten TSH-Rezeptor reguliert.

Die Applikation der Referenzsubstanz E_2 hatte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle \pm Soja keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Transkripte. Dagegen hatte die Testsubstanz 4-MBC unabhängig von Konzentration und Diät einen reprimierenden Effekt auf die mRNA-Spiegel von *Tshr* (Abb. 7 A). Die Applikation von 4-MBC hatte bei der Konzentration 4-MBC *high* eine signifikante Reduktion des Expressionsniveaus auf 55 % der in den Kontrolltieren beobachteten Transkriptmenge zur Folge. Im Futter enthaltene Soja hatte einen signifikanten Effekt auf die basale Expression von *Nis* mit entsprechend geringeren Transkriptmengen nach Applikation von 4-MBC (Abb. 7 B). Die Expression der *Tpo* wurde in gleicher Weise beeinflusst, allerdings mit einem signifikanten Effekt von 4-MBC *low* und 4-MBC *high* gegenüber der phytoöstrogenarm gehaltenen Kontrolle (Abb. 7 C). Die Analyse zeigte nach einem Behandlungszeitraum von 12 Wochen bei signifikant erhöhten Serumkonzentrationen von TSH sowie erniedrigten T_4 -Spiegeln und unveränderter T_3 -Konzentration eine reprimierte Genexpression der an Iodidaufnahme und Biosynthese beteiligten Gene der Schilddrüse.

Die Auswertung der morphometrischen Analyse zeigte nach Behandlung mit 4-MBC ein leicht, aber nicht signifikant erhöhtes Schilddrüsengewicht bei signifikant erniedrigtem Anteil an Epithel sowie signifikant vermindertem Stroma [mm^3] (Daten nicht gezeigt, in Zusammenarbeit mit Prof. L. Malendowicz, Posen/Polen).

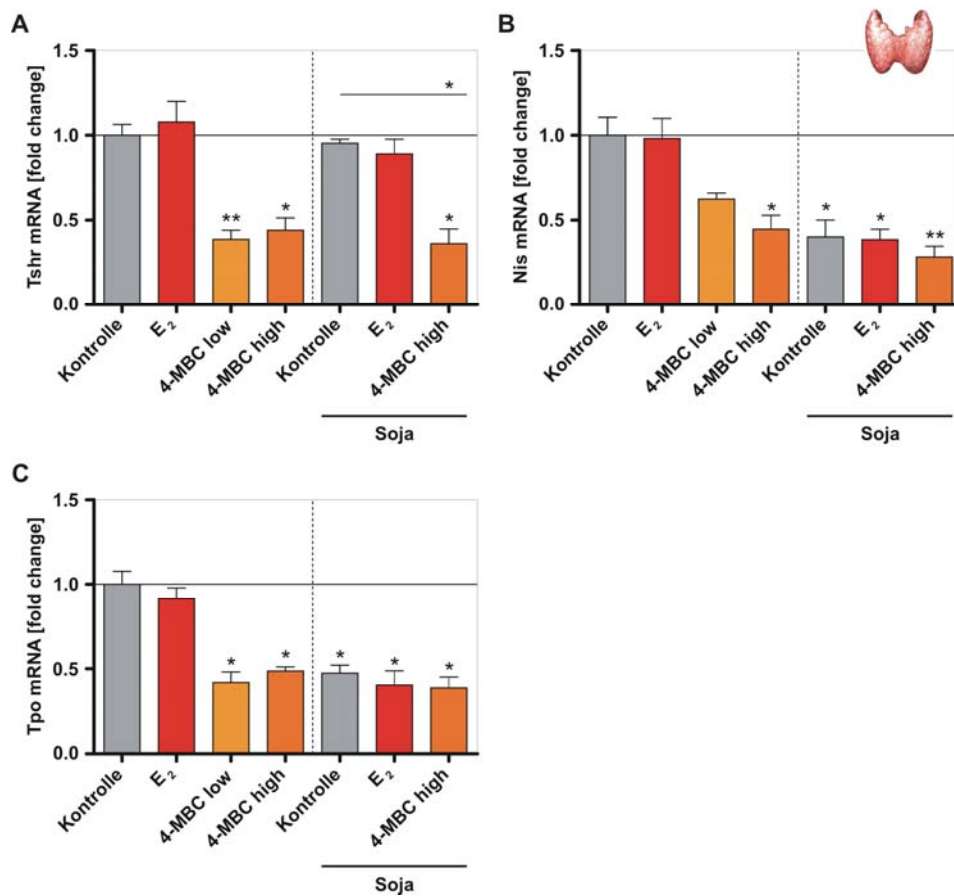


Abb. 7: Iodidtransport und Hormonbiosynthese nach chronischer Applikation von 4-MBC. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen \pm Soja bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. (A) Nach Applikation der Testsubstanz 4-MBC konnte unabhängig von der Diät eine signifikant erniedrigte Expression von Tshr nachgewiesen werden, während die Referenzsubstanz E₂ keinen Einfluss hatte. Die Expression von Nis (B) und Tpo (C) wurde in gleicher Weise durch Applikation von 4-MBC beeinflusst, allerdings zeigte die sojahaltige Diät einen Einfluss auf die basale Expression der Zielgene, die gegenüber den Kontrollen der sojafreien Gruppe erniedrigt war. Somit blieb der Einfluss von 4-MBC in Gegenwart von Soja ohne signifikanten Effekt. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 8 - 10 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Hprt ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

3.1.4 Einfluss auf den Transport von Schilddrüsenhormonen

Nach Freisetzung von T₄ und T₃ aus dem Thyrozyten erfolgt die Bindung an Transportproteine, da im Serum in der Regel >99 % der Schilddrüsenhormone in proteingebundener Form vorliegen. Neben den in der Literatur beschriebenen Effekten von Soja bzw. der endokrin aktiven Komponente GEN auf das Bindungsverhalten, wurden Seren der mit 4-MBC behandelten Tiere gewonnen und deren Bindungsaffinität für die Transportproteine TTR und Albumin überprüft (van der Heide et al. 2003). Im T₄-

Bindungsassay konnte kein Effekt auf die Bindung des extrazellulär zur Verfügung gestellten radioaktiv markierten T_4 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 Einfluss auf T_3 -regulierte Endpunkte peripherer Organe

Zur Beurteilung der Stoffwechselsituation der peripheren Gewebe nach chronischer Applikation von 4-MBC wurde die Expression T_3 -regulierter Gene auf Protein- und Transkriptionsebene analysiert. Exemplarisch werden hier die enzymatischen Aktivitäten sowie die Expressionsprofile der DIO1 in Leber und Niere dargestellt. Die DIO1 konvertiert das von der Schilddrüse sezernierte T_4 zu thyreomimetisch wirksamen T_3 .

In der Leber konnte nach Applikation der Referenzsubstanz E_2 ein signifikanter Effekt festgestellt werden, der sich aber auf die Gruppe der phytoöstrogenarm gehaltenen Tiere beschränkte. Die Kontrolltiere der Sojagruppe zeigten keine Veränderungen bezüglich der basalen Aktivität von $\sim 6,5 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gegenüber der Kontrolle. Die Applikation von 4-MBC führte unabhängig von Konzentration und Diät zu einer leichten Reduktion der Aktivität gegenüber der jeweiligen Kontrolle, erreichte aber keine signifikanten Unterschiede (Abb. 8 A). Die Expression der hepatischen Dio1 wurde sowohl durch Applikation von E_2 als auch durch die Testsubstanz 4-MBC unabhängig von Konzentration und Diät um Faktor $\leq 0,68$ signifikant reprimiert. Die Ausnahme bildeten die E_2 -behandelten Tiere in der Sojagruppe, die lediglich minimal reduzierte Transkriptlevel zeigten (Abb. 8 B). Im Vergleich mit der hepatischen Enzymaktivität wurde in der Niere mit $8,3 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ein etwas höherer Basalwert detektiert. 4-MBC hatte in beiden Konzentrationen eine signifikante Reduktion der enzymatischen Aktivität auf ca. $5,0 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ zur Folge. Die im Haltungsfutter enthaltene Sojakonzentration hatte einen signifikanten Effekt auf die basale Aktivität der Dio1, die mit $12,1 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gegenüber der Kontrolle um $\sim 50 \%$ erhöht war. Die Applikation von 4-MBC high + Soja zeigte gegenüber der Kontrolle + Soja eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität (Abb. 8 C). Die Expressionsanalyse der DIO1 zeigte eine verminderte Expressionsstärke nach Applikation von E_2 und eine dosisabhängige Reduktion der Transkriptlevel um Faktor $\leq 0,38$ nach Behandlung mit 4-MBC (Abb. 8 D). Die in Leber und Niere nach chronischer Applikation von 4-MBC detektierten Effekte zeigten neben gewebespezifischen Unterschieden auch einen stärkeren Effekt auf die Transkription.

Die Analyse von Malatenzym, dessen Aktivität und Transkription nicht ausschließlich durch T_3 sondern auch durch andere Parameter wie zum Beispiel die Ernährung wesentlich beeinflusst wird (Mariash et al. 1980; Song et al. 1988), zeigte keinen Effekt nach Applikation von 4-MBC auf die Enzymaktivität oder die mRNA-Menge in Leber und Niere (Daten nicht gezeigt).

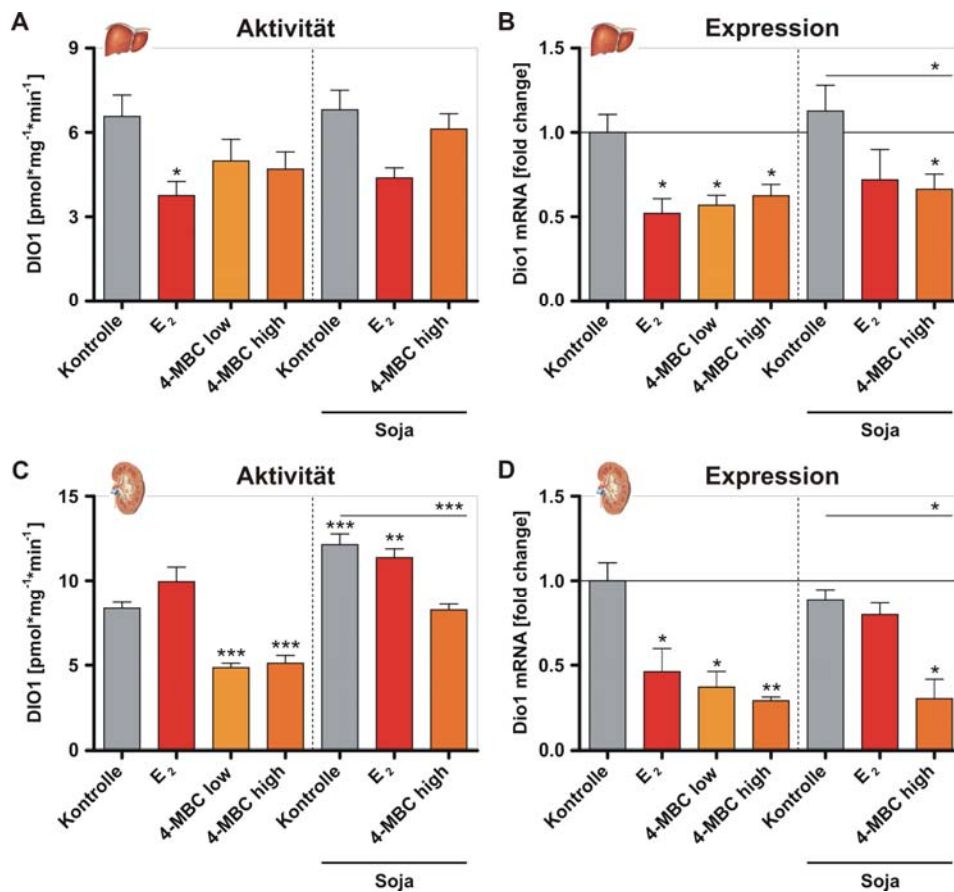


Abb. 8: Regulation der peripheren DIO1 nach chronischer Applikation von 4-MBC. Der linke Teil der Abbildung zeigt die in den peripheren Organen Leber und Niere bestimmte enzymatische Aktivität der Dio1; im rechten Teil der Abbildung sind die zugehörigen Expressionsdaten aufgeführt. (A) Die Applikation der Testsubstanz 4-MBC hatte in der Leber keinen signifikanten Effekt auf die enzymatische Aktivität der DIO1, während die mit der Referenzsubstanz E₂ behandelten Tiere eine reduzierte Aktivität zeigten. (B) Die mittels qPCR analysierte Genexpression der DIO1 zeigte eine signifikante Reduktion der Transkriptlevel nach Gabe von 4-MBC. (C) In der Niere wurde gegenüber der Leber eine basal höhere Aktivität der Dio1 festgestellt, wobei dieser Effekt bei sojahaltiger Diät verstärkt war. Die Applikation von 4-MBC führte zu signifikant verminderter Deiodaseaktivität, die entsprechend auch auf mRNA-Ebene beobachtet wurde (D). Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariectomierten Kontrollen \pm Soja bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 8-10 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Hprt (REST MCS). Die dargestellten Aktivitäten zeigen die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

3.2 Charakterisierung subakuter Effekte von 4-MBC

Die Ergebnisse der initial durchgeführten Analyse der thyreotropen Achse zur Untersuchung chronischer Effekte von 4-MBC wurden in einem weiterführenden Experiment verifiziert, um den zugrunde liegenden Mechanismus der thyreostatischen Wirkung der Testsubstanz näher zu charakterisieren. Zur Analyse der nachfolgend erörterten subakuten Effekte erhielten weibliche Sprague-Dawley-Ratten, die auf einer phytoöstrogenarmen Spezialdiät gehalten wurden, zwei Wochen nach bilateraler Ovariectomie 10 - 600 mg/kg b.w. der UV-Filtersubstanz. Im Gegensatz zu der vorangehend beschriebenen Untersuchung chronischer Exposition erfolgte die subakute Applikation der Referenz- und Testsubstanzen über einen Zeitraum von 5 Tagen oral *per gavage*, um eine möglichst genaue Dosierung zu gewährleisten. Als Referenzsubstanzen wurden E₂ zur Klassifizierung östrogenen Effekte sowie T₄ und MMI zur Analyse thyreomimetischer bzw. thyreostatischer Effekte eingesetzt.

3.2.1 Validierung des Modells zur Analyse der thyreotropen Achse

Bevor die Ergebnisse des Subakutversuchs hinsichtlich der Wirkung von 4-MBC im Einzelnen erläutert werden, soll die Validität des Tiermodells zur Interpretation thyreomimetischer bzw. thyreostatischer Effekte durch Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI überprüft werden. Dazu werden im folgenden Abschnitt die in Hyper- und Hypothyreose maßgeblich gegenüber der Kontrolle veränderten Parameter exemplarisch dargestellt.

Die mittels RIA bestimmten Serumkonzentrationen von TSH, T₄ und T₃ dienen auch in der Klinik der initialen Analyse einer möglicherweise vorliegenden Schilddrüsenerkrankung. In ovariectomierten Kontrolltieren wurde mit 3,3 ng/ml ein den Literaturdaten entsprechender Basalwert für die Serumkonzentration von TSH ermittelt (Biro et al. 1984). Die durch Applikation von T₄ erzeugte Hyperthyreose führte zu einem Absinken der TSH-Konzentration auf 0,3 ng/ml, während die mit dem Thyreostatikum MMI behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren eine um Faktor 6,4 erhöhte Serumkonzentration zeigten, die bei 21,1 ng/ml lag (Abb. 9 A). Der supprimierten TSH-Konzentration hyperthyreoter Tiere entsprechend wurde im Serum T₄-behandelter Tiere mit 9,6 µg/dl eine im Vergleich zur Kontrolle um Faktor 2,7 erhöhte Konzentration von T₄ nachgewiesen. Dagegen hatte die Applikation von MMI mit 1,2 µg/dl eine statistisch signifikante Reduktion der T₄-Konzentration im Serum zur Folge (Abb. 9 B). Die

Serumkonzentration von T₃ blieb nach Applikation von T₄ gegenüber dem mit 237 ng/dl detektierten Basalwert der Kontrolle unverändert, während die durch MMI induzierte Hypothyreose zu einem deutlichen Absinken der T₃-Konzentration auf 142 ng/dl führte (Abb. 9 C).

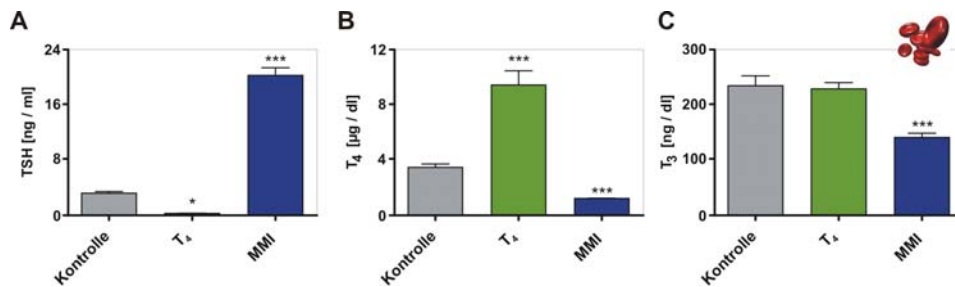


Abb. 9: Serumparameter der thyreotropen Achse nach Applikation von T₄ und MMI. Zur Validierung des verwendeten Tiermodells hinsichtlich der Interpretation thyreomimetischer bzw. thyreostatischer Effekte exogener Substanzen wurden durch Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI hyper- bzw. hypothyreote Tiere erzeugt. Die mittels RIA bestimmten Serumkonzentrationen der an der Regulation des negativen Feedbacks beteiligten Hormone TSH, T₄ und T₃ wurden jeweils auf die Basalwerte der ovariektomierten Kontrollen bezogen. (A) Erwartungsgemäß bedingte die durch T₄ induzierte Hyperthyreose eine Reduktion der Serumkonzentration von TSH, während eine Hypothyreose zu einem signifikanten Anstieg der TSH-Konzentration führte. Die Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T₄ (B) und T₃ (C) wurden in Hyper- und Hypothyreose invers beeinflusst, wobei die Serumkonzentration von T₃ nach Applikation von T₄ in diesem Modell unverändert blieb. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe ± SEM (p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***; Dunnett's Test).

Die morphologische Analyse der Schilddrüsen zeigte nach Applikation von T₄ vor allem im Randbereich des Gewebes stark vergrößerte, mit einem flachen Epithel umgebene Thyrozyten, während die Behandlung mit MMI und die daraus resultierende Hypothyreose zu einer deutlichen Reduktion des Kolloidgehalts führte. Die Zunahme der Epithelzellhöhe wie auch die Ausbildung von Mikrovilli im apikalen Bereich des Thyrozyten, die allerdings nur bei starker lichtmikroskopischer Vergrößerung der Schnitte zu erkennen war, entsprachen den erwarteten morphologischen Veränderungen im hypothyreoten Tier (Abb. 10 A).

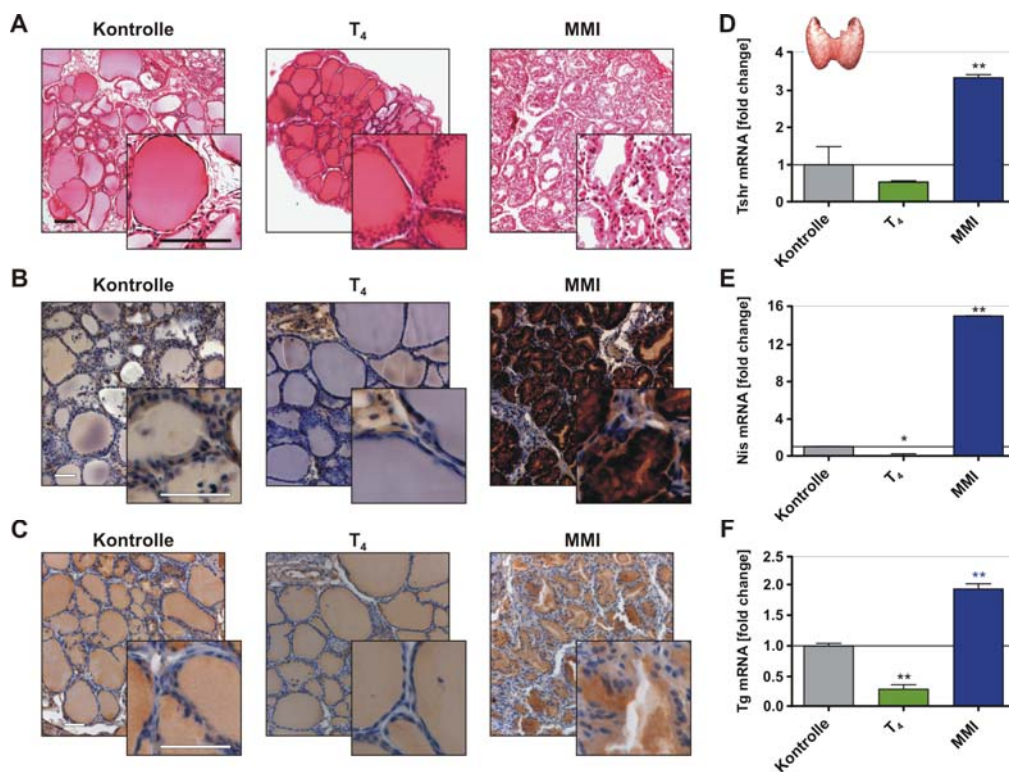


Abb. 10: Morphologische und molekulare Analyse der Schilddrüse nach Applikation von T₄ und MMI.

(A) Die morphologische Analyse der Schilddrüsen erfolgte nach HE-Färbung von Paraffinschnitten. Hyperthyreote Tiere zeigten gegenüber den Kontrollen vor allem im Randbereich des dargestellten Schilddrüsenlappens stark vergrößerte, mit einem flachen Epithel umgebene Follikelzellen. Hypothyreose bedingte eine deutliche Reduktion des Kolloidgehalts sowie eine Zunahme der Epithelzellhöhe der den Follikel umgebenden Thyrozyten. (B, D, E) Expressionsanalysen sowie immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten zeigten in T₄-behandelten Tieren eine verminderte mRNA-Konzentration von Tshr sowie eine Reduktion des für NIS detektierten Signals auf Protein- und Transkriptebene. Eine durch Applikation von MMI induzierte Hypothyreose führte dagegen zu einer erhöhten Expression beider an der Schilddrüsenhormonbiosynthese beteiligten Gene. (C, F) Entsprechend der morphologischen Befunde zeigte die immunhistochemische Färbung von TG eine erhöhte Proteinmenge des Speicherproteins nach Applikation von T₄, während das Transkript erwartungsgemäß invers reguliert war. Parallel zu der Reduktion des Kolloidgehalts wurden in hypothyreoten Schilddrüsen nach Applikation von MMI erhöhte Transkriptmengen von Tg detektiert. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS). In HE-Färbungen sind die Zellkerne blau angefärbt, während Proteine und Zytoplasma rosa erscheinen. In immunhistochemischen Färbungen wird die Expression des Zielgens durch einen spezifischen braunen Niederschlag angezeigt; die Größenbalken entsprechen 50 μ m.

Die immunhistochemische Analyse der für den Iodidtransport und die Speicherung von Schilddrüsenhormonen erforderlichen Proteine NIS (Abb. 10 B) und TG (Abb. 10 C) zeigte, dass die Applikation von T₄ im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion der für NISspezifischen Färbung zur Folge hatte, gleichzeitig jedoch einen verstärkten Nachweis von TG im Follikellumen bewirkte. Dagegen konnte nach Behandlung mit

MMI ein stark erhöhtes Signal von NIS in der Membran der Thyrozyten detektiert werden, während TG vor allem im apikalen Bereich des Follikellumens nachweisbar war. Zudem zeigte die Transkriptanalyse T₄-behandelter Tiere signifikant reduzierte mRNA-Konzentrationen von Tshr (Abb. 10 D) und Nis (Abb. 10 E), während in hypothyreoten Tieren die Expression von Tshr um den Faktor 3,3 und die Transkriptmenge von Nis um den Faktor 15,1 erhöht war. Konsistent mit den Ergebnissen des immunhistochemischen Nachweises von TG war die invers regulierte Transkription der mRNA in hyperthyreoten Tieren reprimiert, während in den Schilddrüsen hypothyreoter Tiere eine Induktion der Expression nachgewiesen wurde (Abb. 10 F).

Die Analyse gewebespezifischer Unterschiede der 5'-Deiodasen DIO1 und DIO2 beinhaltete einerseits den direkten Vergleich der jeweiligen Basalwerte auf Protein- und Transkriptebene und andererseits die nähere Charakterisierung deren Modulation bei Hyper- bzw. Hypothyreose. Um die Expressionsstärke von Dio1 und Dio2 innerhalb eines Gewebes miteinander vergleichen zu können, wurden die für die Expression der Dio2 ermittelten mRNA-Konzentrationen zusätzlich auf die mit dem Wert 1 festgelegte Expression der Dio1 bezogen. Zunächst wurde konsistent mit den in der Literatur publizierten Daten mit Ausnahme der Hypophyse in allen hier untersuchten Geweben für Dio1 im Vergleich zur Dio2 ein höheres basales Expressionsniveau nachgewiesen (Abb. 11). So führte die Applikation von T₄ und die daraus resultierende Hyperthyreose in der Hypophyse bei verstärkter Expression der Dio1 zu einer Reduktion der im Feedbacksystem negativ regulierten Transkription der Dio2. Im Gegensatz dazu wurde nach Applikation des Thyreostatikums MMI eine verminderte Transkriptmenge der Dio1 festgestellt, wohingegen die Expression der Dio2 signifikant verstärkt wurde (Faktor 26,4 vs. Kontrolle Dio1; Faktor 3,2 vs. Kontrolle Dio2) (Abb. 11A).

In der Schilddrüse wurde eine stark erhöhte Expression der Dio1 nach Behandlung mit MMI nachgewiesen, während hyperthyreote Tiere eine verminderte Expression zeigten. Die Transkription der Dio2 verhielt sich dabei invers zu den für Dio1 gezeigten Daten (Abb. 11 B). In Leber, Niere und Herz wurde die Expression der Dio1 durch Applikation von T₄ signifikant erhöht, während die MMI-induzierte Hypothyreose eine verminderte mRNA-Konzentration zur Folge hatte (Abb. 11 C, E, G). Die Expression der Dio2 wurde in der Leber sowohl durch Hyperthyreose als auch durch Hypothyreose reprimiert, während in der Niere eine Induktion der Dio2-Expression in den T₄-behandelten Tieren sowie eine reduzierte Transkriptmenge nach Behandlung mit MMI nachweisbar waren (Abb. 11 C, E). Die im Herzen detektierte Expression nach Hyper- und Hypothyreose

entsprach den in der Niere beobachteten Veränderungen (Abb. 11 G). Die in Leber, Niere und Herz bestimmte enzymatische Aktivität der DIO1 zeigte hinsichtlich der basalen Werte der Kontrolltiere deutliche gewebespezifische Unterschiede. So wurde in der Leber mit einer Aktivität von $16,9 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ im Vergleich zur Niere mit $21,2 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ eine geringere Aktivität innerhalb der Kontrollgruppen festgestellt, während im Herzen gegenüber Leber und Niere eine wesentlich geringere Aktivität im fmolaren Bereich detektiert wurde (Abb. 11 D, F, H).

In Leber, Niere und Herz konnte nach Induktion einer Hyperthyreose eine signifikant erhöhte Enzymaktivität festgestellt werden, während die Applikation des Thyreostatikums MMI zu einer Reduktion der enzymatischen Aktivität führte (Abb. 11 D, F, G).

Die gezeigten Ergebnisse der Validierung bestätigten im Modell der ovariektomierten Ratte die nach Applikation der Referenzsubstanzen T4 und MMI bei Hyper- und Hypothyreose auf Protein- und Transkriptebeine erwarteten Veränderungen. Somit konnte die im folgenden Teil untersuchte Wirkung von 4-MBC anhand der Referenzsubstanzen T4 und MMI bezüglich ihrer Interferenz mit der thyreotropen Achse eingeordnet werden.

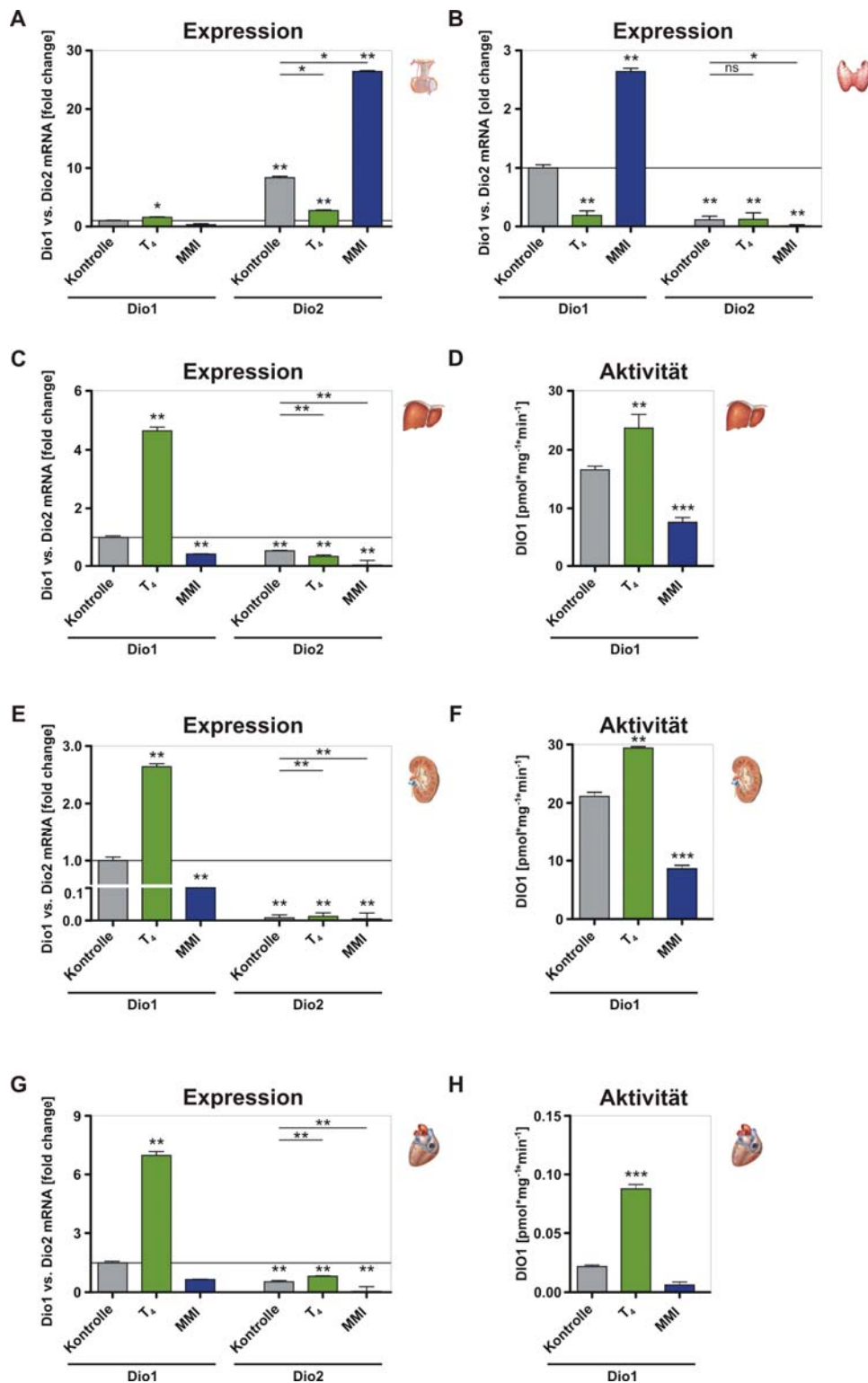


Abb. 11: Gewebespezifische Unterschiede der 5'-Deiodasen nach Applikation von T₄ und MMI.

Zur Charakterisierung gewebespezifischer Unterschiede der basalen Expressionsstärke der 5'-Deiodasen DIO1 und DIO2 sowie ihrer durch Hyper- und Hypothyreose hervorgerufenen Veränderungen wurden Expressionsanalysen und Aktivitätsassays in Hypophyse (A), Schilddrüse (B), Leber (C, D), Niere (E, F) und Herz (G, H) durchgeführt. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression der Dio1 dem

relativen Wert 1. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh (REST MCS). Die dargestellten Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe \pm SEM ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Dunnett's Test).

3.2.2 Beeinflussung von Körpergewicht und Konstitution der Tiere

Um den Einfluss des UV-Filters 4-MBC auf die Konstitution der Tiere auch während des 5-tägigen Behandlungszeitraumes beurteilen zu können, wurde neben täglichen visuellen Kontrollen das Körpergewicht der Tiere sowie deren Futterverbrauch bestimmt.

Das über den gesamten Versuchszeitraum detektierte Körpergewicht der Tiere zeigte bei einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von 300 g mit Ausnahme der E₂-behandelten Tiere nach Applikation der Referenzsubstanzen keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle (Abb. 12 A). Dieser bereits von D'Eon beschriebene Effekt von Östrogenen auf das Körpergewicht wurde durch die signifikante Gewichtsabnahme nach Applikation von E₂ bestätigt (D'Eon et al. 2005). Die Applikation der Testsubstanz 4-MBC hatte in Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. eine signifikante Reduktion des Körpergewichts auf bis zu 87,7 % des durchschnittlichen Ausgangsgewichts zur Folge (Abb. 12 B). In den Kontrollgruppen wurde sowohl nach Applikation von E₂ als auch nach Gabe des Thyreostatikums MMI ein verminderter Futterverbrauch festgestellt, der durch tägliches Rückwiegen der verbleibenden Futtermittelmenge ermittelt wurde. Die Applikation des UV-Filters 4-MBC führte dosisabhängig zu einer Reduktion der aufgenommenen Futtermittelmenge, die jedoch ausschließlich bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. signifikant erniedrigt war (Daten nicht gezeigt).

Tägliche visuelle Kontrollen zeigten, dass 4-MBC in der höchsten Konzentration toxische Effekte verursachte, die sich durch Apathie sowie epileptische Anfälle äußerten. Infolge dessen wurde die Dosis am zweiten Behandlungstag von anfänglich 1000 mg/kg b.w. auf 600 mg/kg b.w. reduziert. Darüber hinaus erhielten Tiere dieser Gruppe täglich eine 0,9 %ige (w/v) NaCl-Lösung mit 5% (w/v) Glucose zur Stabilisierung ihrer Konstitution.

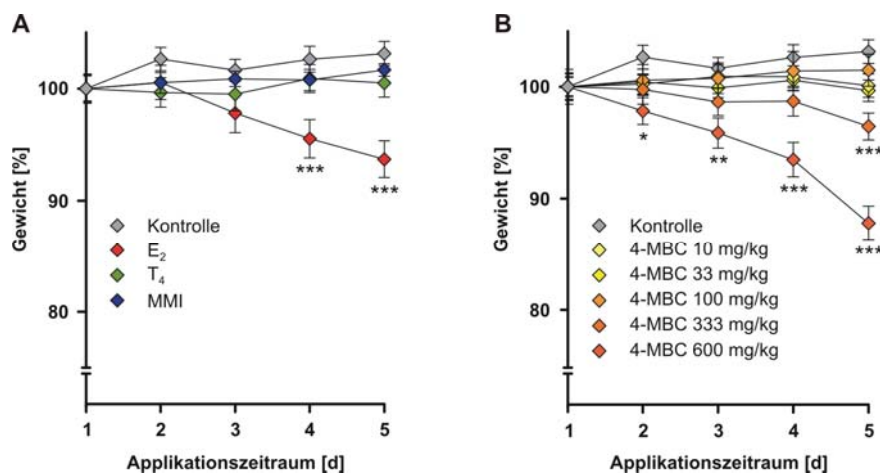


Abb. 12: Veränderung des Körpergewichts nach subakuter Applikation von 4-MBC. Das über den 5-tägigen Applikationszeitraum detektierte Körpergewicht der Tiere wurde auf das Ausgangsgewicht der jeweiligen Gruppe bezogen. (A) Die ovariectomierten Kontrollen sowie die mit den Referenzsubstanzen behandelten Tiere zeigten mit Ausnahme der E₂-behandelten Tiere ein über den gesamten Versuchszeitraum konstantes Körpergewicht. (B) Nach Applikation von 4-MBC wurde ausschließlich bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. eine statistisch signifikante Reduktion des Körpergewichts festgestellt. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe \pm SD ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Bonferroni-Post-Test).

3.2.3 Hormonelle Veränderungen der Hypophysen-Schilddrüsenachse

Mit Hilfe der Serumanalyse direkt an der Regulation des Feedbacksystems beteiligter Hypophysen- und Schilddrüsenhormone erfolgte eine erste Einschätzung zur Wirkung des UV-Filters 4-MBC nach subakuter Applikation.

3.2.3.1 Hypophysenhormone

Die Serumanalyse der Hypophysenhormone LH, Prolaktin und TSH diente zum einen der Validierung des Tiermodells in Bezug auf die gonadotrope Achse und zum anderen der initialen Charakterisierung östrogenen bzw. thyroidalen Effekte von 4-MBC auf das Feedbacksystem.

Die Bestimmung der Serumkonzentration von LH in ovariectomierten Kontrolltieren zeigte im Vergleich zu intakten Tieren entsprechend den in der Literatur publizierten Daten einen mit 23 ng/ml erhöhten Basalwert (Smith und Davidson 1974). Entgegen den für ovariectomierte Tiere beschriebenen Effekten der Referenzsubstanz E₂ wurde in diesem Experiment keine statistisch signifikante Veränderung der LH-Konzentration nach Applikation von E₂ nachgewiesen (Cagampang et al. 1991; Blake 1977). Zudem hatten auch Hyper- und Hypothyreose keinen signifikanten Einfluss auf die

zirkulierenden Konzentrationen von LH. Dagegen führte die Applikation von 4-MBC in Konzentrationen von 10 - 100 mg/kg b.w. zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der LH-Konzentration im Serum. Dieser Effekt ist möglicherweise als „low dose“-Effekt zu betrachten, da bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg eine mit dem Basalwert vergleichbare Konzentration oder aber eine leicht erniedrigte Konzentration von 17,7 ng/ml detektiert wurde (Abb. 13 A). Die Prolaktinspiegel ovariektomierter Tiere zeigten infolge des in der Zirkulation fehlenden Östrogens mit 36,5 ng/ml gegenüber intakten Tieren verminderte Basalwerte. Durch Substitution mit E_2 wurde eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentrationen auf 135 ng/ml erzielt. Hyper- und Hypothyreose sowie 4-MBC hatten unabhängig von der Konzentration keinen Einfluss auf die Konzentration von Prolaktin im Serum (Abb. 13 B). Die basale Konzentration von TSH, die im Serum ovariektomierter Tiere bei 3,3 ng/ml lag, wurde durch Applikation von E_2 nur marginal verändert, während nach Applikation von T_4 und der daraus resultierenden Hyperthyreose erwartungsgemäß eine Reduktion der TSH-Konzentration nachgewiesen wurde. Die mit dem Thyreostatikum MMI behandelten Tiere zeigten mit 21,1 ng/ml eine gegenüber der Kontrolle um Faktor 6,4 erhöhte Serumkonzentration von TSH. Auch die Applikation von 4-MBC führte dosisabhängig zu einer signifikanten Induktion der zirkulierenden TSH-Spiegel, denn schon bei einer Konzentration von 10 mg/kg b.w. wurde mit 4,6 ng/ml ein leichter Effekt gegenüber der Kontrolle nachgewiesen, wohingegen bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentration auf 10,8 ng/ml detektiert wurde. Im Vergleich zur Serumkonzentration hypothyreoter Tiere wurde damit nach einem Applikationszeitraum von 5 Tagen eine halbmaximale Induktion der TSH-Sekretion erreicht (Abb. 13 C).

Die Analyse der Hypophysenhormone deutet unabhängig von der gonadotropen Achse auf eine Beeinträchtigung der thyreotropen Achse hin, da die Serumkonzentrationen von LH und Prolaktin durch die Applikation von 4-MBC nicht signifikant beeinflusst wurden. Bei östrogenen Effekten von 4-MBC würde man eine Suppression der LH-Spiegel sowie eine Induktion der Prolaktinspiegel erwarten. Die dosisabhängige Induktion der TSH-Spiegel ist dagegen ein Indiz für eine gestörte Regulation der thyreotropen Achse nach subakuter Applikation von 4-MBC.

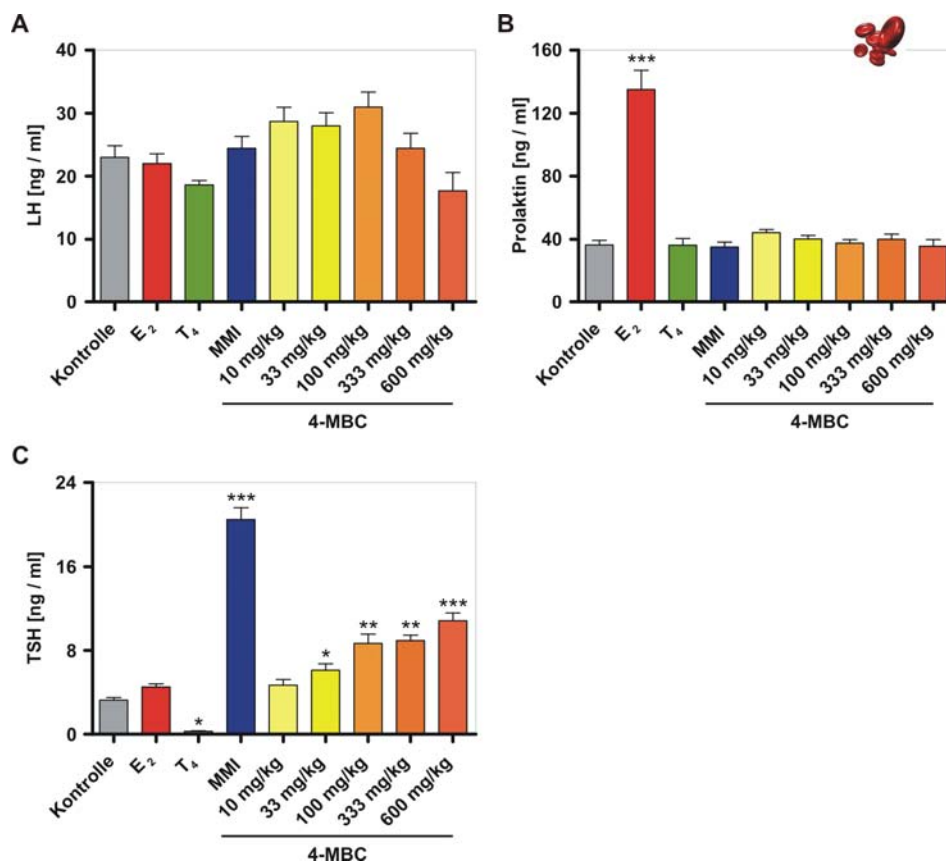


Abb. 13: Serumkonzentrationen der Hypophysenhormone LH, Prolaktin und TSH nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels RIA bestimmten Serumkonzentrationen der Hypophysenhormone wurden jeweils auf die Basalwerte der ovariektomierten Kontrollen bezogen. (A) Die Serumkonzentration von LH zeigte nach Applikation der Referenz- und Testsubstanzen keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. (B) Die Prolaktinspiegel waren nach Applikation von E₂ signifikant erhöht, wohingegen 4-MBC keinen Einfluss auf die Serumkonzentration hatte. (C) Nach Applikation von 4-MBC wurde entsprechend der durch das Thyreostatikum MMI hervorgerufenen Erhöhung der TSH-Serumspiegel ein dosisabhängiger und signifikanter Anstieg der Konzentration im Serum beobachtet. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe ± SEM (p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***; Dunnett's Test).

3.2.3.2 Schilddrüsenhormone

Im Kontext mit den in 3.2.3.1 erläuterten Ergebnissen der Serumanalyse relevanter Hypophysenhormone wurden auch die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T₄ und T₃ in der Zirkulation bestimmt, um weitere Informationen hinsichtlich der peripheren Wirkung von 4-MBC auf das negativ regulierte Feedbacksystem zu erhalten. Neben dem bereits in 3.2.1 beschriebenen Einfluss von Hyper- und Hypothyreose auf die Sekretion der Schilddrüsenhormone wurde nach Applikation der Referenzsubstanz E₂ eine signifikante Reduktion der T₃-Konzentration von basal 237 ng/dl auf 184 ng/dl festgestellt. Der UV-Filter 4-MBC hatte ausschließlich bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. einen signifikanten Effekt auf die Konzentrationen

von T_4 und T_3 im Serum, der sich durch Reduktion der Serumkonzentration auf 55 % bzw. 80 % des jeweiligen Basalwertes äußerte (Abb. 14 A, B).

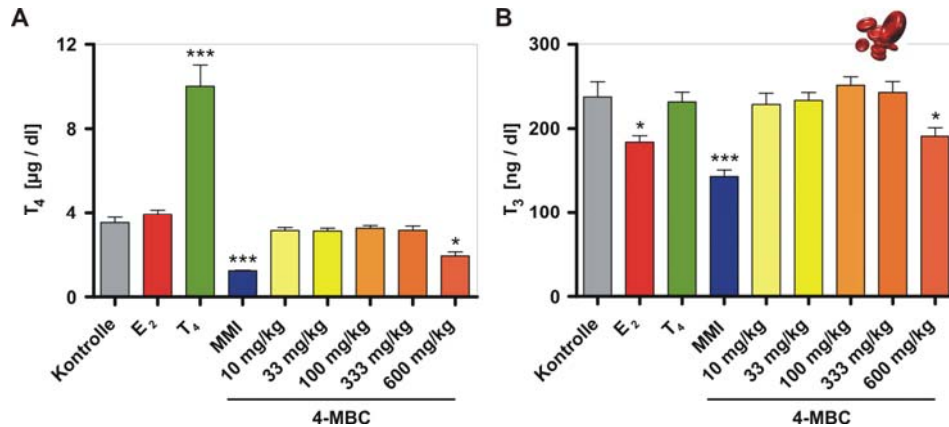


Abb. 14: Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels RIA bestimmten Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone wurden jeweils auf die Basalwerte der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Die Serumkonzentrationen von T_4 (A) und T_3 (B) zeigten nach Induktion von Hyper- bzw. Hypothyreose die bereits beschriebenen Veränderungen, wobei E_2 als Referenzsubstanz der gonadotropen Achse eine signifikante Reduktion der T_3 -Konzentration im Serum bewirkte. Dagegen zeigte 4-MBC ausschließlich bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. signifikante Effekte auf die Serumkonzentrationen von T_4 und T_3 . Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe \pm SEM ($p < 0,05^*$, $p < 0,001^{***}$; Dunnett's Test).

3.2.4 Beeinflussung des Feedbacks in Hypothalamus und Hypophyse

Basierend auf den Ergebnissen der Serumanalyse, die eine thyreostatische Wirkungsweise der Testsubstanz 4-MBC andeuteten, wurde in Hypothalamus und Hypophyse die Expression Feedback-assoziiierter Gene mittels qPCR überprüft.

Neben den Schilddrüsenhormonen T_4 und T_3 hat auch die Serumkonzentration von TSH einen Einfluss auf die hypothalamische Regulation des Feedbacks. In hyperthyreoten Tieren, die signifikant verminderte TSH-Konzentrationen zeigten, konnte eine 52 %ige Repression von Tshr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu hatte eine durch Applikation von MMI induzierte Hypothyreose eine 3,2-fach erhöhte Expression der Tshr-Transkripte zur Folge. Die Behandlung mit E_2 führte trotz marginal veränderter Serumkonzentrationen von TSH zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptmenge. Die Applikation von 4-MBC hatte in allen Konzentrationen eine Induktion der Expression zur Folge, die aber ausschließlich bei einer Konzentration von 33 mg/kg b.w. und ≥ 333 mg/kg b.w. zu signifikanten Effekten führte (Abb. 15 A). Die Expression von ppTrh, das die Vorläuferform des hypophysiotropen Peptidhormons

TRH darstellt, wurde unter hyperthyreoten Bedingungen signifikant reprimiert, während nach Applikation von MMI eine verstärkte Expression im Hypothalamus gemessen wurde (Segerson et al. 1987). Die Testsubstanz 4-MBC hatte unabhängig von der Konzentration einen signifikant induzierenden Effekt auf die Transkriptmenge von ppTrh (Abb. 15 B). Die hypothalamische Expression des ubiquitär exprimierten Schilddrüsenhormonrezeptors Thra1 wurde durch Applikation der Referenz- und Testsubstanzen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 15 C). Die Expression von Thra2, der keine funktionelle Ligandenbindungsstelle besitzt und damit T₃-unabhängig mit der DNA interagiert, war in hypothyreoten Tieren um Faktor 2,2 erhöht. Dagegen hatte die Applikation von 4-MBC einen ausgeprägten dosisabhängigen Effekt, der bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. im Vergleich zur Kontrolle zu einer um Faktor 17,6 verstärkten Expression führte (Abb. 15 D). Die Expression von Thrh, dessen Analyse die mRNA beider Splicevarianten abdeckt, wurde sowohl in der Hypothyreose induziert als auch durch die Referenzsubstanz E₂ erhöht, während die Applikation von T₄ keinen Einfluss auf die Transkription zeigte. Die Behandlung mit 4-MBC führte unabhängig von der Konzentration zu einer verstärkten Expression, zeigte aber ausschließlich bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. durch eine 2,6-fache Induktion der Transkription einen signifikanten Effekt (Abb. 15 E).

Die Sekretion des dimeren Glykoproteohormons TSH, das in den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse gebildet wird, wird durch die Serumkonzentrationen von T₄ und T₃ wie auch durch die Freisetzung von TRH aus neurosekretorischen Zellen des paraventriculären Nukleus im Hypothalamus reguliert. Damit steht die Expression der Gene, welche die α - bzw. β -Untereinheit von TSH kodieren, unter negativer Feedbackkontrolle (Yen 2001). In hyperthyreoten Tieren konnte eine Repression der Transkriptlevel von aGsu und Tshb festgestellt werden, die mit den im Serum gemessenen TSH-Konzentrationen konsistent ist, aber nur für Tshb zu signifikanten Ergebnissen führte. Hypothyreose dagegen hatte einen verstärkenden Effekt auf die Expression von aGsu und Tshb, wobei die Transkription der spezifischen Untereinheit Tshb gegenüber der Kontrolle um Faktor 10,0 erhöht war.

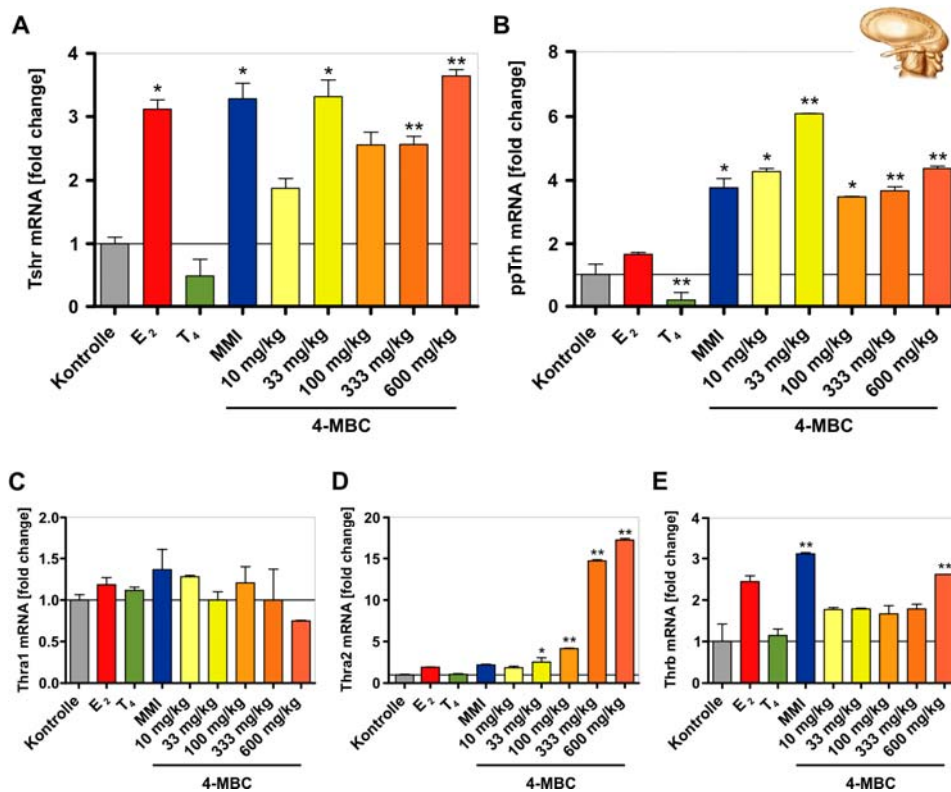


Abb. 15: Hypothalamische Feedbackregulation nach subakuter Applikation von 4-MBC. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariectomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Die Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI resultierte in den erwarteten Expressionsprofilen. Durch 4-MBC konnte eine verstärkte Expression von Tshr (A) und ppTrh (B) ausgelöst werden. Die basale Expression von Thra1 (C) blieb in allen Gruppen unbeeinflusst, während die Expression von Thra2 (D) nach Applikation von 4-MBC dosisabhängig signifikant erhöht war. 4-MBC zeigte ausschließlich bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. einen signifikanten Effekt auf die Expression von Thrb (E). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 4 - 8 Tieren je Gruppe ± SEM nach Normalisierung auf Gapdh (p < 0,05*, p < 0,01**; REST MCS).

Die Applikation von 4-MBC hatte einen dosisabhängigen Effekt auf die Expression von Tshb, der bei Konzentrationen von ≥ 333 mg/kg Körpergewicht und einer maximalen Induktion mit Faktor 4,8 zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptmenge führte. Dies entspricht ~ 50 % des in hypothyreoten Tieren detektierten Expressionsniveaus. Die Ergebnisse der mittels qPCR erhobenen Daten wurden für die Expression von Tshb mit Hilfe der Northern blot-Analyse bestätigt (Abb. 16 A, B). Die Expression der hypophysären Dio1 dagegen wird durch die Konzentration der Schilddrüsenhormone in der Zirkulation stimuliert, weshalb sie wie von Baur et al. beschrieben unter positiver Feedbackkontrolle steht (Baur und Köhrle 1999). Nach Applikation von T₄ kommt es zu einer 1,6-fachen Erhöhung der Transkriptmenge, die mit einer vermehrten lokalen Synthese von T₃ einhergeht. In hypothyreoten Tieren konnte eine signifikante Reduktion der Transkriptlevel auf das 0,3-fache der Kontrolle nachgewiesen werden.

Während E₂ keinen Einfluss auf die Expression hatte, wurde nach Applikation von 4-MBC eine konzentrationsabhängige Repression des Expressionsniveaus beobachtet, die bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. mit den in hypothyreoten Tieren erzielten Effekten vergleichbar war (Abb. 16 C). Der Expression der hypophysären Dio2, die vorwiegend durch die Serumkonzentration des bevorzugten Substrats T₄ beeinflusst wird, unterliegt der negativen Feedbackkontrolle (Silva und Larsen 1977; Cheron et al. 1979). In hyperthyreoten Tieren konnte entsprechend der erhöhten Serumkonzentration von T₄ eine verminderte Expression der Dio2 nachgewiesen werden. Die Gabe des Thyreostatikums MMI führte zu einer 3,2-fachen Erhöhung der Transkriptmenge gegenüber der Kontrolle. Nach Applikation von 4-MBC konnte eine dosisabhängig verstärkte Expression der Dio2 festgestellt werden, die in der höchsten Konzentration 2,4-fach gegenüber der Kontrolle erhöht war und bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. signifikante Effekte zeigte (Abb. 16 D).

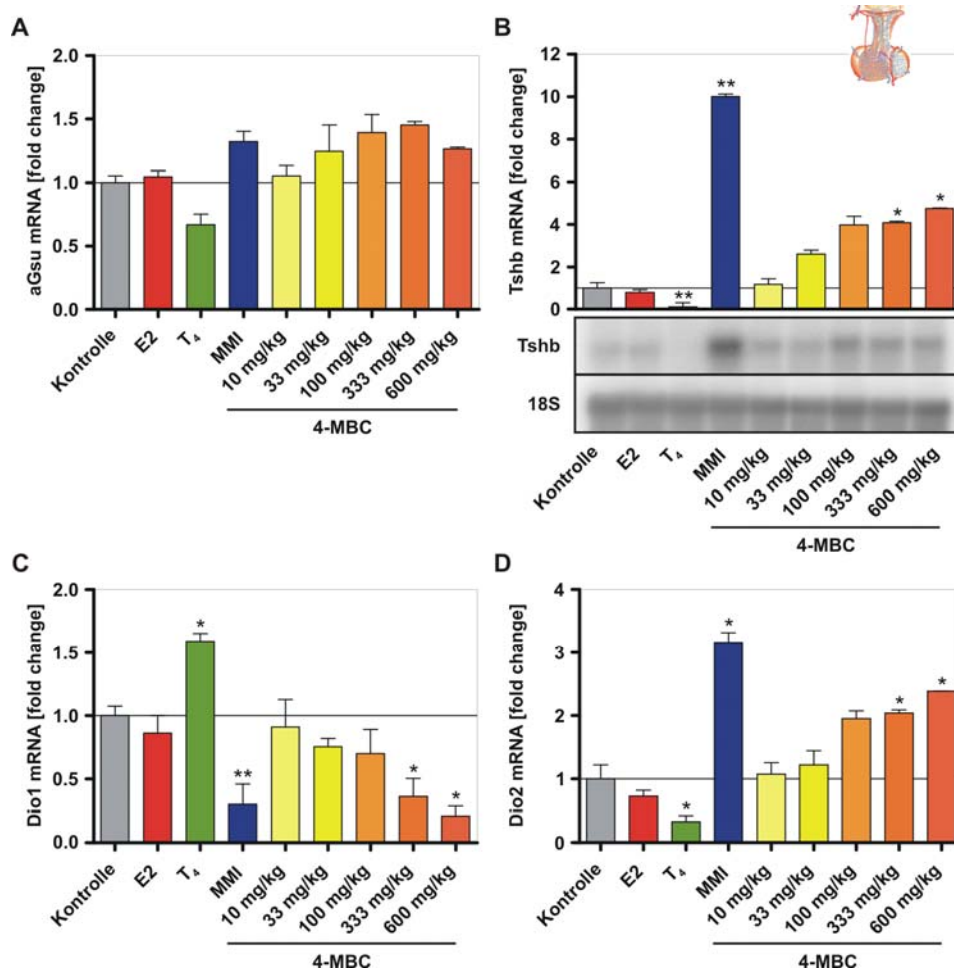


Abb. 16: Hypophysäre Feedbackregulation nach subakuter Applikation von 4-MBC. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale

Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Die Referenzsubstanzen T_4 und MMI zeigten die erwarteten Expressionsprofile. Nach Applikation von 4-MBC wurde eine erhöhte Expression der im Feedbacksystem negativ regulierten Gene α Gsu (A), Tshb (B) nachgewiesen. Die Transkription der hypophysären Dio1 wurde durch Applikation von 4-MBC reprimiert (C). Dagegen wurde die Expression der hypophysären Dio2 dosisabhängig verstärkt (D). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 8 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS). Das im Northern blot dargestellte Expressionsprofil von Tshb zeigt die Transkriptmenge gruppenweise gepoolter RNA bezogen auf 18SrRNA.

Die Analyse der Feedback-assoziierten Gene in Hypothalamus und Hypophyse zeigte nach subakuter Applikation von 4-MBC gegenüber der Kontrolle ein deutlich verändertes Expressionsprofil, das auf eine thyreostatische Wirkung der Testsubstanz hindeutet. In Übereinstimmung mit den erhöhten Serumkonzentrationen von TSH wurde im Hypothalamus eine erhöhte Expression von Tshr, ppTrh, Thra2 und Thrb nachgewiesen, wobei der Einfluss auf die Transkription von Thra2 besonders ausgeprägt war. Des Weiteren konnte in der Hypophyse bei weitgehend unveränderten Konzentrationen von T_4 und T_3 im Serum eine erhöhte mRNA-Konzentration der negativ regulierten Gene Tshb und Dio2 festgestellt werden, während die Expression von Dio1 reprimiert wurde.

3.2.5 Expressionsanalyse spezifisch regulierter Gene in der Hypophyse

Um zwischen direkt die thyreotrope Achse betreffenden und sekundär über die gonadotrope Achse vermittelten Effekten auf die Schilddrüse unterscheiden zu können, wurde die Expression differentiell E_2 - und T_3 -regulierter Gene in der Hypophyse untersucht.

Die in Abhängigkeit von Schilddrüsenhormonen und E_2 regulierte Expression von Trhr zeigte nach Applikation von E_2 und T_4 die beschriebenen Effekte (Lean et al. 1977). Im Vergleich zu E_2 -behandelten Tieren, die eine um Faktor 2,8 induzierte Expression gegenüber der Kontrolle zeigten, wurde die Transkription in hypothyreoten Tieren mit Faktor 2,0 geringer induziert. Die Applikation von 4-MBC führte zu einer (dosisabhängig) verstärkten Expression, die in der höchsten Konzentration mit einem Faktor von 1,8 beinahe das Niveau der hypothyreoten Tiere erreichte (Abb. 17 A). Die Expression der TRH-spezifischen Metallopeptidase Trhde verhielt sich wie erwartet invers zu den für Trhr beschriebenen Ergebnissen (Schomburg und Bauer 1995). Dabei wurde in MMI-behandelten Tieren eine stärkere Repression erzielt als nach Applikation von E_2 . 4-MBC zeigte eine dosisabhängige signifikante Reduktion der Transkriptlevel (Abb. 17 B). Die Expression des Transkriptionsfaktors Pit1 (*pituitary*

specific transcription factor-1), der die Transkription von *Tshb* positiv reguliert, wurde in hyperthyreoten Tieren reprimiert, während die Applikation von E_2 und MMI zu signifikant erhöhten mRNA-Konzentrationen führte. 4-MBC hatte einen dosisabhängigen Anstieg der Expression zur Folge (Abb. 17 C) (Steinfeld et al. 1991). Die mRNA-Konzentrationen der beiden Prohomonkonvertasen *Pcsk1* und *Pcsk2* zeigten in der Hyperthyreose signifikant reduzierte Transkriptlevel, während die Applikation von E_2 die Expression beider Gene nicht signifikant beeinflusste. Nach Applikation von MMI und 4-MBC wurde eine verstärkte Expression von *Pcsk1* und *Pcsk2* nachgewiesen. Die 4-MBC behandelten Tiere zeigten bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. eine mit Faktor 2,8 gegenüber der Kontrolle wesentlich stärker induzierte Transkription der *Pcsk2* als die MMI-behandelten Tiere (Abb. 17 D, E). Die Expression von *Pomc2* war in hyper- und hypothyreoten Tieren verändert, zeigte aber keinen Effekt nach Applikation von E_2 . In 4-MBC behandelten Tieren konnte unabhängig von der Konzentration eine signifikante Reduktion des Expressionsniveaus festgestellt werden (Abb. 17 F). Die Expression der vorwiegend E_2 -assoziierten Gene *Fshb* und *Lhb* zeigte für *Fshb* keine signifikanten Effekte, während die Transkription von *Lhb* durch E_2 signifikant reduziert wurde. Auch die Applikation von 4-MBC hatte eine signifikante Repression der mRNA-Konzentration von *Lhb* zur Folge (Abb. 17 G, H). Dagegen wurde die durch E_2 induzierte Expression von *Prl* durch Applikation der Referenzsubstanzen wie auch durch 4-MBC (signifikant) reprimiert (Abb. 17 I).

Die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse deuten neben den beschriebenen östrogenen Wirkungen auch eine direkte Beeinflussung der thyreotropen Achse an, da die gezeigten Effekte vorwiegend parallel mit den in hypothyreoten Tieren beobachteten Effekten verlaufen.

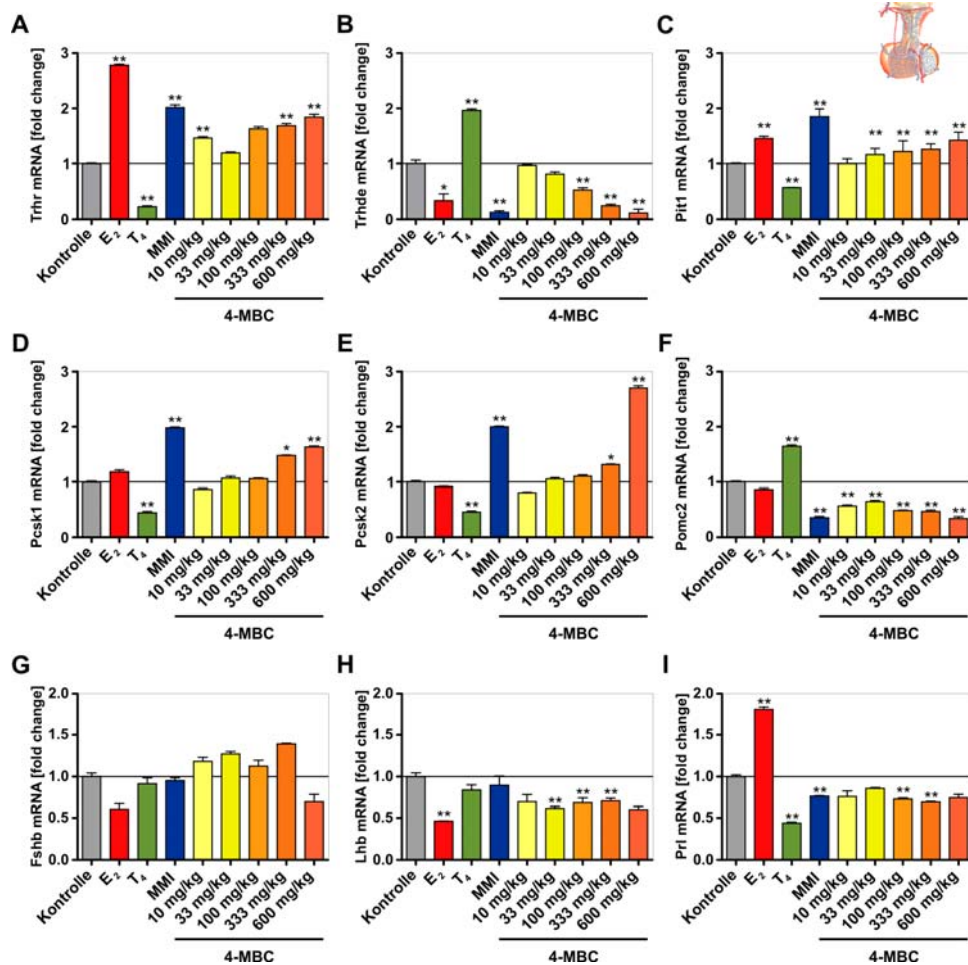


Abb. 17: Differentielle Genregulation in der Hypophyse nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariectomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Die Referenzsubstanzen T₄ und MMI produzierten die erwarteten Expressionsprofile. Nach Applikation von 4-MBC konnten für die Feedback-regulierenden Gene der thyreotropen Achse Trhr (A), Trhde (B), Pit1 (C), Pcsk1 (D) und Pcsk2 (E) thyreostatische Effekte auf die Genexpression nachgewiesen werden, die bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. mit den Effekten durch Thyreostatika induzierter Hypothyreose vergleichbar waren. Im Vergleich konnten hinsichtlich der durch Steroide regulierten Gene Pomc2 (F), Fshb (G), Lhb (H) und Prl (I) keine eindeutig östrogenen Effekte nach Applikation von 4-MBC festgestellt werden. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 8 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

3.2.6 Beeinflussung der Schilddrüse

Aufgrund der im Serum sowie auf hypothalamischer und hypophysärer Ebene festgestellten Veränderungen, die eine thyreostatische Wirkung von 4-MBC andeuten, wurde neben der morphologischen Analyse auch der Einfluss von 4-MBC auf die Genexpression in der Schilddrüse untersucht.

3.2.6.1 Organgewicht und Morphologie der Schilddrüse

Nach Behandlung mit dem Thyreostatikum MMI wie auch nach Applikation von 4-MBC konnte im Vergleich zur Kontrolle ein erhöhtes Schilddrüsengewicht festgestellt werden, wobei erst Konzentrationen von ≥ 333 mg/kg b.w. eine signifikante Veränderung bewirkten (Abb. 18). Bereits bei der Präparation der Tiere fielen das vergrößerte Volumen sowie eine verstärkte Durchblutung der Schilddrüsen auf. Die Behandlung der Tiere mit 4-MBC bewirkte demnach die Ausbildung einer Struma, die in der Regel zum Ausgleich reduzierter Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum bei kompensatorischer Stoffwechsellage durch ungehemmte TSH-Stimulation auftritt.

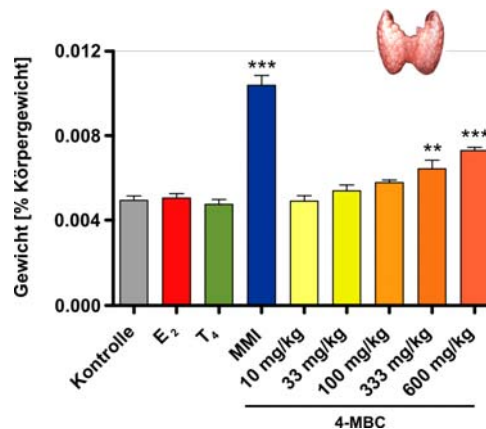


Abb. 18: Relatives Schilddrüsengewicht nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Dargestellt ist das Gewicht beider Schilddrüsenlappen relativ zum Körpergewicht der jeweiligen Gruppe bezogen auf das Schilddrüsengewicht ovariectomierter Kontrollen. Nach Applikation von MMI und 4-MBC in Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. konnte eine signifikante Erhöhung des Schilddrüsengewichts festgestellt werden. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 9 Tieren je Gruppe \pm SEM ($p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Dunnett's Test).

Die morphologische Analyse der Schilddrüsen erfolgte an Schnittpräparaten von jeweils 3 Tieren pro Gruppe nach HE-Färbung im Lichtmikroskop, wobei ein repräsentatives Präparat pro Gruppe abgebildet wurde. Die Schilddrüsen der Kontrolltiere zeigten mit einer heterogenen Verteilung von aktiven und ruhenden Follikeln bei einer physiologischen Epithelzellhöhe ein euthyreotes Erscheinungsbild (Abb. 19 A). Die Behandlung mit E₂ hatte verglichen mit der Kontrolle keinen phänotypischen Effekt (Abb. 19 B), während nach Applikation von T₄ hauptsächlich im Randbereich des Schilddrüsenlappens deutlich vergrößerte Follikel, mit Thyrozyten, die von einem flachen Epithel umgeben waren (Abb. 19 C). Die Schilddrüsen hypothyreoter Tiere zeigten ein signifikant erhöhtes Schilddrüsengewicht mit deutlich reduziertem Kolloidgehalt der Follikel sowie eine Zunahme der Epithelzellhöhe im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 19 D). Nach Applikation von 4-MBC in Konzentrationen

von 10 - 33 mg/kg b.w. konnte keine Veränderung bezüglich der Morphologie festgestellt werden. In Konzentrationen ≥ 100 mg/kg b.w. zeigten die Schilddrüsen der mit 4-MBC behandelten Tiere bei verminderter Größe der Thyrozyten einen reduzierten Kolloidanteil sowie eine Verstärkung des Epithels. Eine Konzentration von 600 mg/kg b.w. führte darüber hinaus auch zu strukturellen Veränderungen der Schilddrüse, die denen der Hypothyreose vergleichbar waren (Abb. 19 E - I).

3.2.6.2 Einfluss auf den TSH-induzierten Iodidtransport ins Follikellumen

Der Iodidtransport ins Follikellumen wie auch die Biosynthese von Schilddrüsenhormonen werden über die Expression des G-Protein gekoppelten TSH-R reguliert, der über die intrazellulären Botenstoffe cAMP und IP_3/Ca^{2+} das Signal in das Zellinnere weiterleitet.

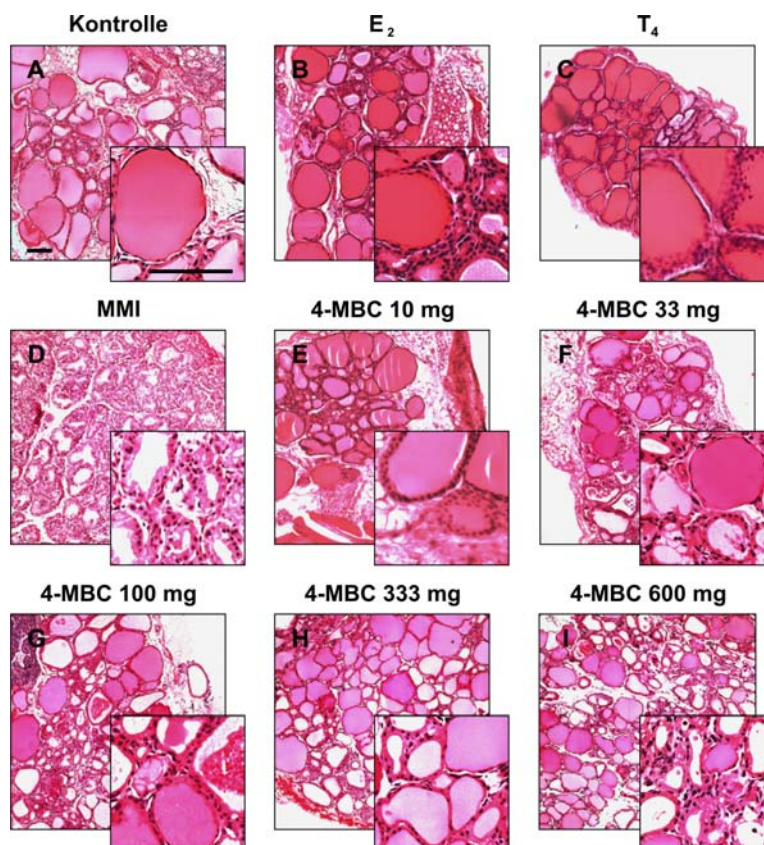


Abb. 19: Morphologie der Schilddrüse nach subakuter Applikation von 4-MBC. Zur morphologischen Analyse der Schilddrüsen wurden HE-Färbungen auf Paraffinschnitten von 2 μ m Dicke angefertigt. Die ovariectomierten Kontrollen (A) zeigten eine heterogene Verteilung aktivierter und ruhender Follikel bei durchschnittlicher Epithelzellhöhe. Die Applikation von E_2 (B) hatte im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen des morphologischen Phänotyps zur Folge. Hyperthyreote Tiere (C) zeigten gegenüber den Kontrollen vor allem im Randbereich des dargestellten Schilddrüsenlappens stark vergrößerte,

mit einem flachen Epithel umgebene Follikelzellen. Hypothyreose (D) bedingte eine deutliche Reduktion des Kolloidgehalts der Thyrozyten sowie eine Zunahme der Epithelzellhöhe. Hinsichtlich der Testsubstanz 4-MBC konnten nach Applikation von 10 mg/kg b.w. sowie 33 mg/kg b.w. keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Die Applikation von 4-MBC in Konzentrationen von ≥ 100 mg/kg b.w. führte insgesamt zu einer Reduktion der Follikelgröße bei vermindertem Kolloidgehalt sowie einer Erhöhung des Follikelepithels (E - I). In den gezeigten Übersichtsfärbungen sind die Zellkerne blau gefärbt, während Proteine und Zytoplasma rosa erscheinen; die Größenbalken entsprechen 50 μm .

Die Expressionsanalyse von Tshr zeigte nach Applikation von MMI wie bereits in 3.2.1 beschrieben einen signifikanten Anstieg der Expression um Faktor 3,3 gegenüber der Kontrolle. Die Behandlung mit 4-MBC hatte einen dosisabhängigen Effekt mit erhöhter mRNA-Konzentration von Tshr, der bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. signifikant war (Abb. 20 A). Die cAMP-stimulierte Expression von Nis zeigte nach Behandlung mit MMI eine 15,1-fache Induktion gegenüber der Kontrolle, während 4-MBC bei Konzentrationen ≥ 33 mg/kg b.w. zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptmenge führte (Abb. 20 B).

Die Expression von Slc26a4 wird über den Expressionsstatus von TG reguliert. Somit konnte in hyperthyreoten Tieren eine um Faktor 5,4 gesteigerte mRNA-Konzentration gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Nach Applikation von MMI wurde entsprechend der in 3.2.1 beschriebenen Expression von TG die Transkription von Slc26a4 reprimiert. Die Applikation von 4-MBC führte zu einer erhöhten Expression (Abb. 20 C). Die auf mRNA-Ebene nachgewiesene Induktion von Nis wurde im Western blot überprüft. Die in Bahn 1 und 2 dargestellte Expression von NIS in den Schilddrüsen MMI-behandelter Tiere fiel den Erwartungen entsprechend sehr stark aus. Dabei war das Signal der 80 kDa-Bande immer stärker als das der Bande bei 60 kDa, die beide für die Expression von Nis spezifisch sind. Die Schilddrüsen der 4-MBC behandelten Tiere zeigten bis zu einer Konzentration von 333 mg/kg eine verstärkte Proteinexpression (Bahn 3: 10 mg/kg b.w.; Bahn 4 - 5: 33 mg/kg b.w.; Bahn 6 - 7: 100 mg/kg b.w.; Bahn 8: 333 mg/kg b.w.). Bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. wurde eine Reduktion der Proteinmenge gegenüber der nächst niedrigeren Konzentration nachgewiesen. Aufgrund der geringen Größe der Schilddrüsen und des hohen Proteinbedarfs bei begrenzter Tierzahl konnte die Analyse nur in maximal zwei unabhängigen Messreihen durchgeführt werden (Abb. 20 D).

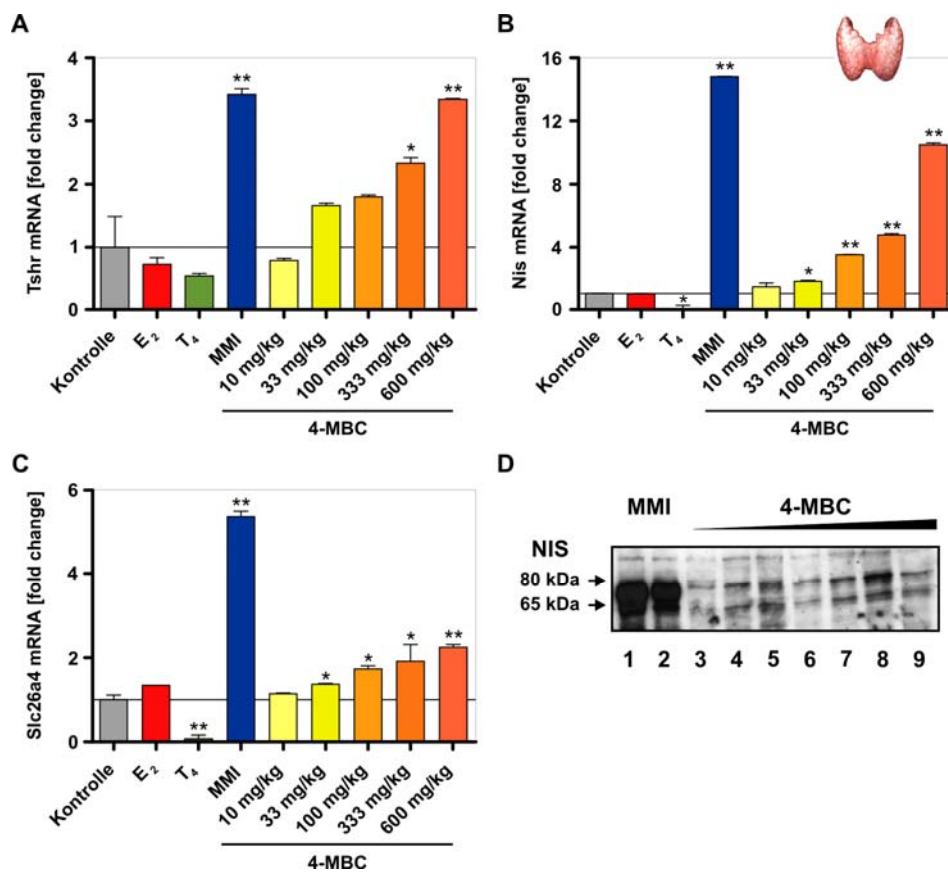


Abb. 20: Expressionsanalyse des Iodidtransports nach subakuter Applikation von 4-MBC. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Das Expressionsprofil der untersuchten Gene zeigte nach Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI die in der Literatur beschriebenen Veränderungen. Die Applikation von 4-MBC führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung des Expressionsniveaus von Tshr (A) sowie des durch TSH positiv regulierten Nis (B). Die Expression von Slc26a4 wurde durch 4-MBC in Konzentrationen ≥ 33 mg/kg b.w. reprimiert (C). Die Western blot-Analyse zeigte, bezogen auf die hypothyreoten Tiere (Bahn 1 - 2), bei steigenden Konzentrationen von 4-MBC (Bahn 3 - 9) eine verstärkte Synthese von NIS (E). Das maximale Signal konnte bei einer Konzentration von 333 mg/kg b.w. detektiert werden (Bahn 7 - 8), das aber nicht mit der durch MMI herbeigeführten Induktion vergleichbar war. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

Zur weiteren Klärung der Befunde wurden immunhistochemische Analysen von NIS angeschlossen. Dazu wurden Schnittpräparate mit 2 μ m Dicke von jeweils 3 Tieren mit dem in Tab. 5 aufgeführten Antikörper gefärbt und anschließend im Lichtmikroskop analysiert. Sowohl in den Kontrolltieren als auch in den E₂-behandelten Tieren konnte im Vergleich zu den hyperthyreoten Tieren, die kein spezifisches Signal zeigten, eine mäßige Expression von NIS festgestellt werden (Abb. 21 A - C). Das in den MMI-behandelten Tieren detektierte Signal zeigte aufgrund der hypothyreoten Stoffwechsellage der Tiere eine starke Expression von NIS (Abb. 21 D). 4-MBC führte bis zu einer Konzentration von 333 mg/kg Körpergewicht dosisabhängig zu einer

Verstärkung des Signals. Bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. wurde im Vergleich zu einer Dosis von 333 mg/kg b.w. eine weniger starke Expression von NIS festgestellt (Abb. 21 E - I). Die Präparate lassen nur in Teilbereichen eine Aussage über die Lokalisation von NIS zu, allerdings ist bei einer Konzentration von 300 mg/kg ein Signal auf der basolateralen Seite des Thyrozyten nachweisbar.

Die Untersuchung des Iodidtransports zeigte in Abhängigkeit von der erhöhten Serumkonzentration von TSH eine verstärkte Expression des zugehörigen Rezeptors bei ebenfalls induzierter Transkription von Nis. Auf Proteinebene konnte diese dosisabhängige Expression nur bis zu einer Konzentration von 333 mg/kg b.w. bestätigt werden. Über die Lokalisation von NIS innerhalb der Membran des Thyrozyten lässt sich aus den vorliegenden Daten keine klare Aussage formulieren.

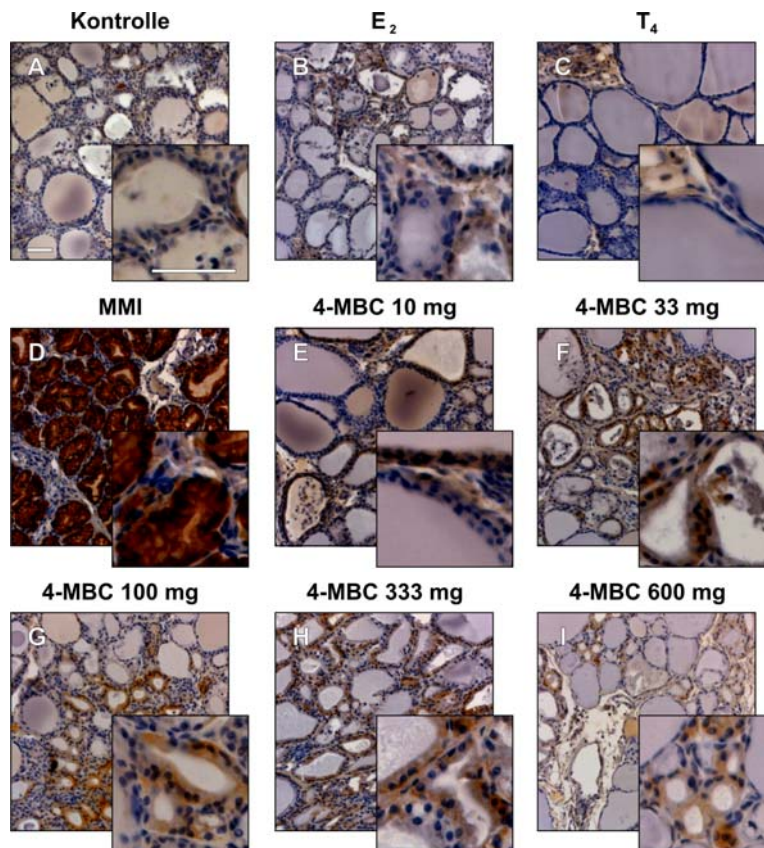


Abb. 21: Immunhistochemische Analyse von NIS nach subakuter Applikation von 4-MBC. Zur Analyse der Expression des für die Aufnahme von Iodid ins Follikellumen relevanten Natrium-Iodid-Symporters (NIS) wurden immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten von 2 µm Dicke durchgeführt. Die Kontrollen (A) sowie die Thyrozyten der E₂-behandelten Tiere (B) zeigten abhängig von ihrem jeweiligen Aktivitätszustand eine heterogene Expression des basolateral lokalisierten Proteins. In den Schilddrüsen hyperthyreoter Tiere konnte keine Expression von NIS nachgewiesen werden (C). Die durch Applikation von MMI induzierte Hypothyreose bedingte eine über das gesamte Gewebe hinweg deutlich erhöhte Expression (D). Nach Applikation der Testsubstanz 4-MBC konnte bei Konzentrationen ≥ 33 mg/kg b.w. eine

verstärkte Synthese von NIS nachgewiesen werden (E - I). In immunhistochemischen Färbungen wird die Expression des Zielgens durch einen spezifischen braunen Niederschlag angezeigt; die Größenbalken entsprechen 50 µm.

3.2.6.3 Einfluss auf die Schilddrüsenhormonbiosynthese

Die Expression der apikal lokalisierten Tpo, die das aufgenommene Iodid zu Iod oxidiert und an Tyrosylreste des TG bindet, wurde durch MMI um Faktor 1,8 signifikant erhöht. Die Applikation von 4-MBC führte zu einem leichten Anstieg der Expression, der bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. mit Faktor 1,9 gegenüber der Kontrolle signifikante Effekte zeigte (Abb. 22 A). Dagegen konnten nach Behandlung mit 4-MBC verminderte mRNA-Konzentrationen von TG nachgewiesen werden (Abb. 22 B). In hypothyreoten Tieren konnte eine Zunahme der Expression von Duox1 und Duox2, die durch H₂O₂-Produktion einen essentiellen Beitrag an der Biosynthese von T₄ und T₃ leisten, festgestellt werden, die auch nach Applikation von 4-MBC nachweisbar war (Abb. 22 C, D).

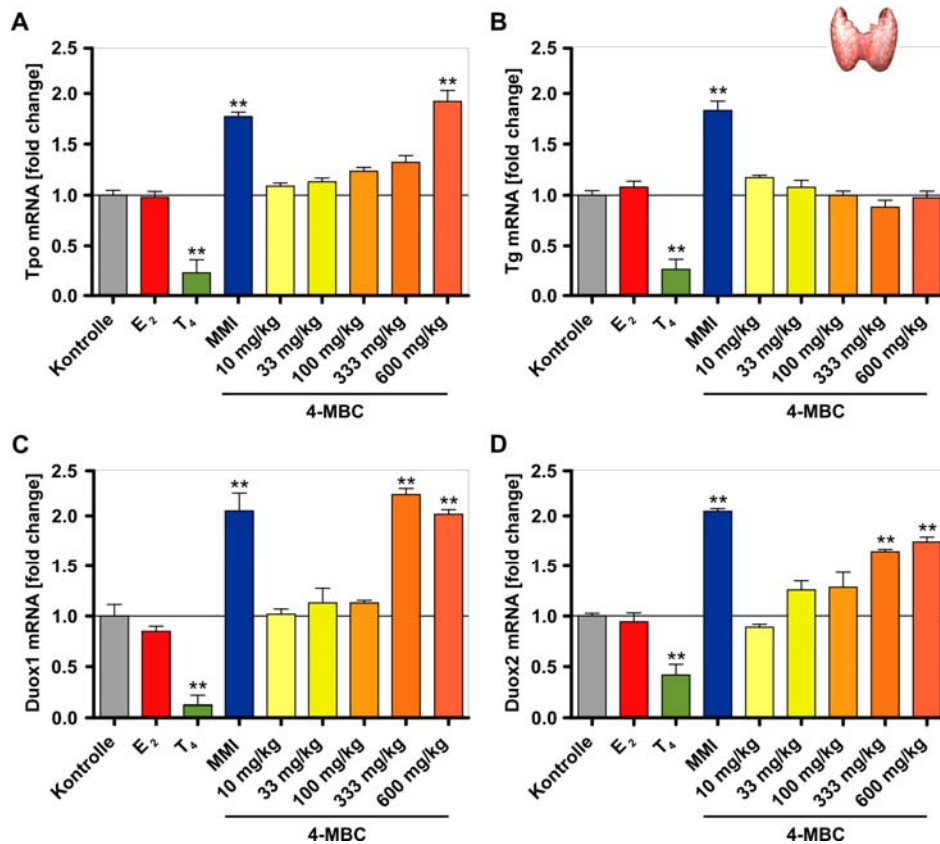


Abb. 22: Expressionsanalyse der Hormonbiosynthese nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Das Expressionsprofil der untersuchten Gene

zeigte nach Applikation der Referenzsubstanzen T_4 und MMI die in der Literatur beschriebenen Modifikationen. (A) Nach Applikation von 4-MBC konnte eine dosisabhängig erhöhte Expression von Tpo analog der in hypothyreoten Tieren beobachteten Veränderungen nachgewiesen werden. (B) Die Transkriptlevel von Tg zeigten nach Applikation von 4-MBC keine signifikanten Veränderungen, waren aber bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. leicht erniedrigt. Das Expressionsniveau von Duox1 (C) und Duox2 (D) war bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. gegenüber der Kontrolle signifikant verändert. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

Die immunhistochemische Analysen von TG, die an Schnittpräparaten von 2 μ m Dicke von jeweils 3 Tieren mit dem in Tab. 5 aufgeführten Antikörper durchgeführt wurden, bestätigten die Ergebnisse der Transkriptanalyse (Abb. 22).

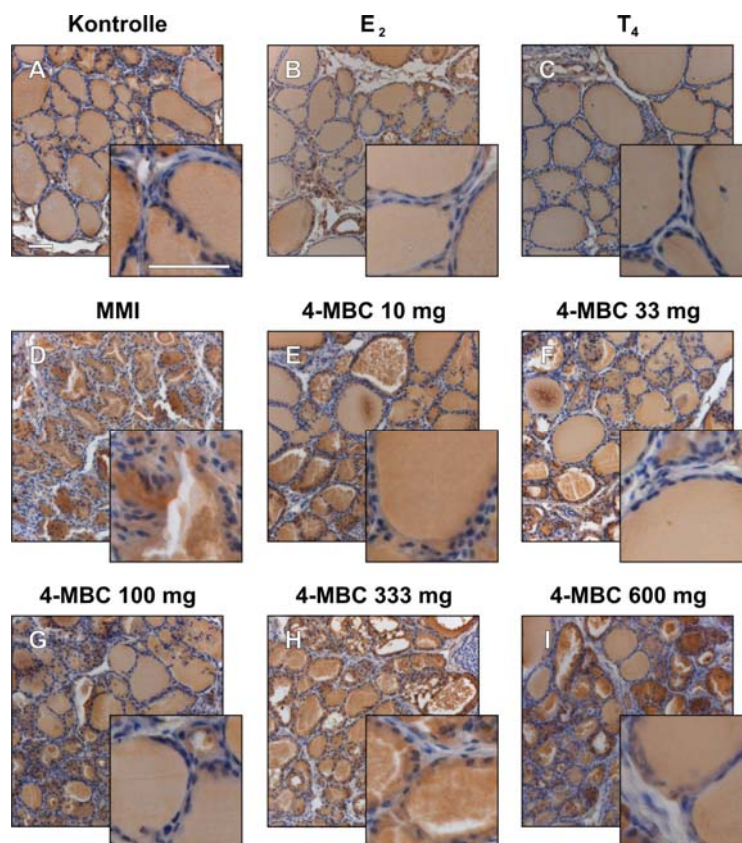


Abb. 23: Immunhistochemische Analyse von TG nach subakuter Applikation von 4-MBC. Zur Charakterisierung der Expression des für die Kopplung von Iodtyrosylresten relevanten Glykoproteins Thyroglobulin (TG) wurden immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten von 2 μ m Dicke angefertigt. Die Kontrollen (A) wie auch die E_2 behandelten Tiere (B) zeigten abhängig vom Aktivitätszustand der jeweiligen Follikel unterschiedlich große Kolloidanteile. Die Schilddrüsen hyperthyreoter Tiere zeigten eine homogene Expression von TG innerhalb des vergrößerten Follikellumens (C). Hypothyreose bedingte eine Reduktion des detektierten Signals, wobei verbleibendes TG hauptsächlich nahe der apikalen Membran nachweisbar war (D). Nach Applikation von 4-MBC konnte bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg teilweise eine Reduktion des Signals festgestellt werden (E - I). In immunhistochemischen Färbungen wird die Expression des Zielgens durch einen spezifischen braunen Niederschlag angezeigt; die Größenbalken entsprechen 50 μ m.

Neben T_4 wird von der Schilddrüse auch T_3 produziert. Im Zytoplasma wird dazu ein Teil des nach lysosomaler Hydrolyse von TG freigesetzten T_4 durch Deiodasen in biologisch aktives T_3 konvertiert. Die enzymatische Aktivität der DIO1 wurde nach Applikation von $236 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ im Vergleich zur Kontrolle mit $129 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant erhöht. In hyperthyreoten Tieren wurde den Literaturangaben entsprechend eine reduzierte Aktivität gemessen, während die Applikation des Thyreostatikums MMI mit $135 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ kaum Einfluss auf die Aktivität der DIO1 hatte. Im Gegensatz dazu konnte in den 4-MBC behandelten Tieren bei Konzentrationen $\geq 33 \text{ mg/kg}$ eine mit $\leq 226 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen werden (Abb. 24 A). Parallel dazu wurde die Expression der Dio1 mittels qPCR analysiert. Im Gegensatz zur Aktivität blieb nach Applikation von E_2 die Transkriptmenge unbeeinflusst, während in hypothyreoten Tieren eine um Faktor 2,6 erhöhte Expression nachgewiesen wurde. 4-MBC bewirkte dosisabhängig einen Anstieg der mRNA-Konzentration (Abb. 24 B). Konsistent mit den publizierten Daten konnte in der Schilddrüse keine Dio2-Aktivität detektiert werden. Das mRNA-Expressionsprofil der Dio2 blieb in E_2 -behandelten Tieren unbeeinflusst; dagegen hatte die Applikation von MMI eine signifikante Reduktion der Transkriptlevel zur Folge. 4-MBC hatte erst bei Konzentrationen $\geq 100 \text{ mg/kg}$ b.w. einen Einfluss auf die Expression der Dio2, die ohne klare Dosisbeziehung um Faktor $\leq 0,4$ reprimiert wurde (Abb. 24 C).

Neben dem Einfluss auf den Iodidtransport wurden auch Teilschritte der Biosynthese unterschiedlich stark beeinflusst. Bei erhöhter Transkription von Tpo, Duox1 und Duox2 konnte eine leicht verminderte Konzentration von Thyroglobulin-mRNA nachgewiesen werden. Die Aktivität wie auch die Expression der Dio1 zeigten nach Applikation von 4-MBC einen dosisabhängigen Anstieg. Dagegen war die Expression der Dio2 durch 4-MBC ab einer Konzentration von 100 mg/kg b.w. reduziert.

3.2.6.4 *Einfluss auf die Regulation der Angiogenese*

Die morphologische Analyse der Schilddrüse zeigte neben einem signifikant erhöhten Schilddrüsengewicht nach Applikation von 4-MBC eine deutliche Reduktion der Follikellumen gegenüber der Kontrolle. In frühen Phasen der Hypothyreose kommt es bei limitierter Iodidaufnahme und sinkenden Iodidkonzentrationen im Thyrozyten zu einer erhöhten Vaskularisierung, die mit einer erhöhten Expression von VEGF sowie dessen Rezeptoren Flt1 und Kdr verbunden ist (Klein und Catargi 2007; Jiang et al. 2008).

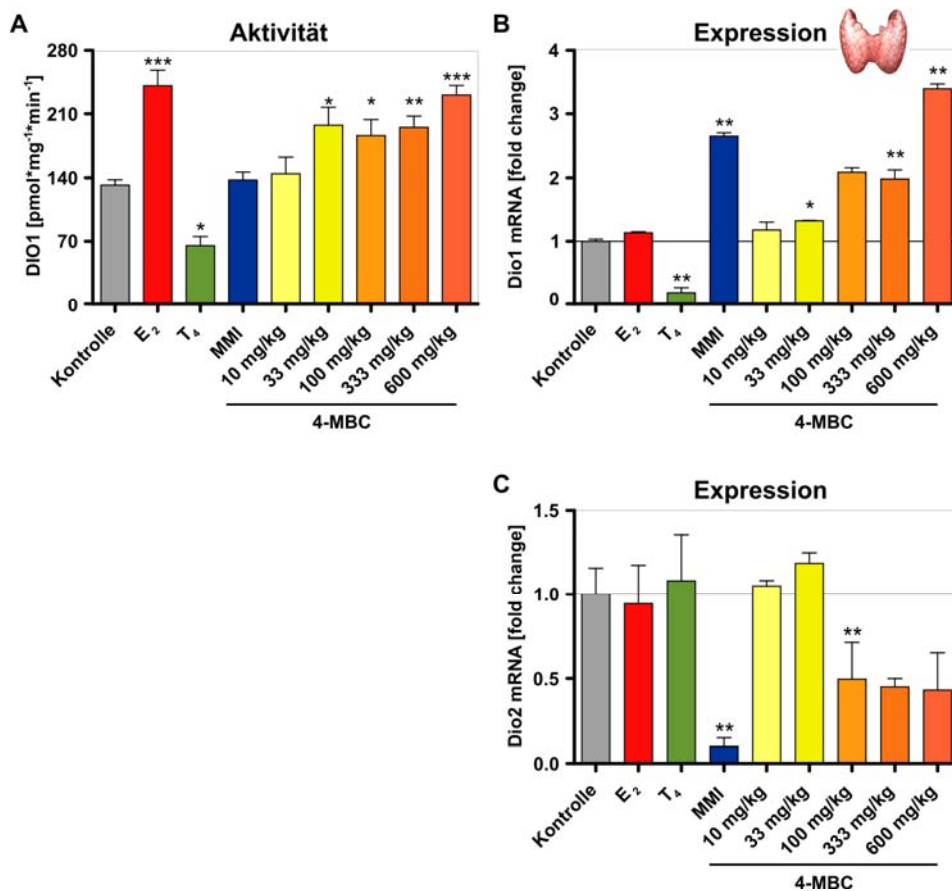


Abb. 24: Analyse der 5'-Deiodasen in der Schilddrüse nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Zur Analyse der Deiodierungsreaktionen/aktivitäten in der Schilddrüse wurde die enzymatische Aktivität der DIO1 sowie die Genexpression der 5-Deiodasen Dio1 und Dio2 untersucht. (A) Im Deiodase-Assay wurde die Enzymaktivität der Dio1 bestimmt, die nach Applikation von T₄ gegenüber den ovariectomierten Kontrollen signifikant erniedrigt war. In hypothyreoten Tieren wie auch nach Applikation von E₂ und 4-MBC wurde eine erhöhte Aktivität der Dio1 nachgewiesen. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariectomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. (B) Das Expressionsmuster der Dio1 entsprach mit Ausnahme nach Applikation von E₂ den im Aktivitätsassay beobachteten Veränderungen. (C) Die Expressionsanalyse der Dio2 zeigte nach Applikation von T₄ keinen Einfluss auf die mRNA, jedoch konnte in hypothyreoten Tieren sowie nach Applikation von 4-MBC bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg eine signifikant verringerte Expression der Dio2 nachgewiesen werden. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe ± SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA (REST MCS). Die dargestellten Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 9 Tieren je Gruppe ± SEM (Dunnett's Test; p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***).

Die immunhistologische Analyse zur Untersuchung der Proteinexpression des Angiogenesemarkers VEGF, die unter Verwendung des in Tab. 5 aufgeführten Antikörpers an Paraffinschnitten von 2 µm Dicke durchgeführt wurde, zeigte nach Applikation des Thyreostatikums MMI eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression verglichen mit der Kontrolle sowie den T₄-behandelten Tieren, bei denen VEGF nicht

nachweisbar war (Abb. 25 A - D). Die Applikation der Testsubstanz 4-MBC bewirkte konzentrationsabhängig eine vermehrte Expression von VEGF (Abb. 25 E - I).

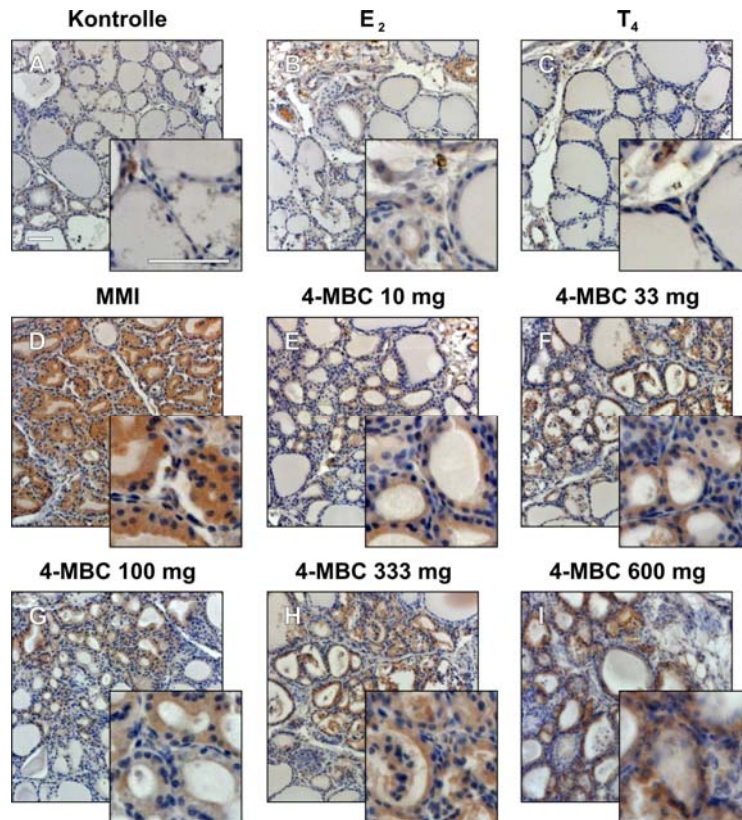


Abb. 25: Immunhistochemische Analyse von VEGF nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Zur Charakterisierung der Vaskularisierung der Schilddrüse hypothyreoter Tiere wurde die Expression des Angiogenesemarkers VEGF mittels immunhistochemischer Färbung 2 μ m dicker Paraffinschnitte analysiert. Die Kontrollen (A) wie auch die E_2 behandelten Tiere (B) zeigten nur minimale Expression von VEGF. In hyperthyreoten Tieren konnte kein spezifisches Signal detektiert werden (C). Im Vergleich dazu konnte in den Thyrozyten hypothyreoter Tiere eine stark erhöhte Expression von VEGF nachgewiesen werden (D), die in abgeschwächter Form auch nach Applikation von 4-MBC (E - I) beobachtet werden konnte. In immunhistochemischen Färbungen wird die Expression des Zielgens durch einen spezifischen braunen Niederschlag angezeigt; die Größenbalken entsprechen 50 μ m.

Zusätzlich wurde das Expressionsprofil von VEGF sowie der zugehörigen Rezeptoren Flt1 und Kdr überprüft. Die Transkription der VEGF-Rezeptoren Flt1 und Kdr blieb nach Applikation von E_2 unbeeinflusst, während hyperthyreote Tiere eine Repression der mRNA-Spiegel zeigten. Neben der in MMI-behandelten Tieren beobachteten Zunahme der Expression konnte auch nach Applikation von 4-MBC ein dosisabhängig signifikanter Effekt auf die Transkription nachgewiesen werden, dessen maximale Induktion bei einer Konzentration von 333 mg/kg b.w. vorlag (Abb. 26 A, B).

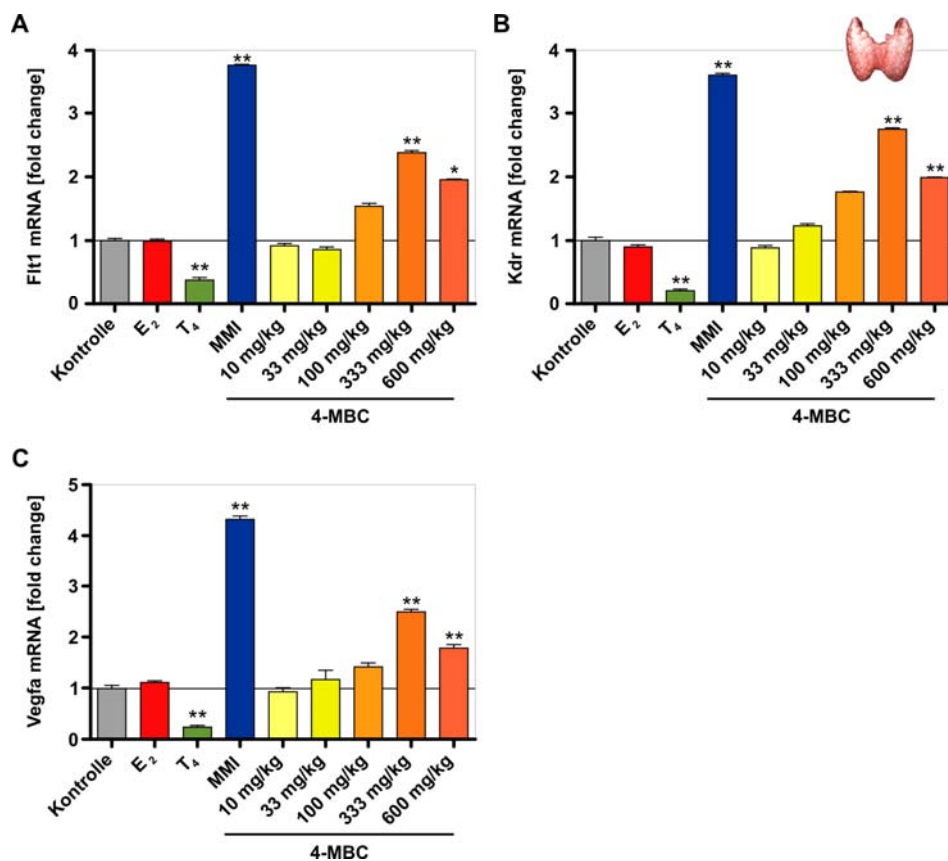


Abb. 26: Expressionsanalyse der Angiogeneseregulation nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Das Expressionsprofil der untersuchten Gene zeigte nach Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI die in der Literatur beschriebenen Effekte. Die Expression der VEGF-Rezeptoren Fit1 (A) und Kdr (B) sowie auch VEGF (C) selbst waren nach Applikation von 4-MBC bei Konzentrationen ≥ 100 mg/kg b.w. verstärkt exprimiert. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

3.2.7 Einfluss auf die T₃-regulierte Genexpression peripherer Gewebe

Die Enzymaktivität der Dio1 wurde in Leber, Niere und Herz bestimmt und zeigte neben den in 3.2.1 beschriebenen gewebespezifischen Unterschieden bei Hyperthyreose in allen untersuchten Geweben eine signifikant erhöhte Aktivität, während in hypothyreoten Tieren nach Applikation von MMI eine Reduktion der enzymatischen Aktivität detektiert wurde. Die hepatische Aktivität war nach Applikation von 4-MBC in Konzentrationen ≥ 100 mg/kg b.w. signifikant reduziert (Abb. 27 A). In der Niere führte die Applikation von 4-MBC zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Enzymaktivität von basal $21,2 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf $11,2 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Abb. 27 B). Im Herzen konnten keine signifikanten Effekte nach Applikation von E₂ und

4-MBC nachgewiesen werden (Abb. 27 C). Parallel wurde die Expression der Dio1 mittels qPCR überprüft. In Leber und Niere hatte die Applikation von 4-MBC in Konzentrationen ≤ 33 mg/kg b.w. eine leicht bis signifikante Erhöhung der Expression zur Folge; Konzentrationen ≥ 100 mg/kg b.w. führten zu signifikant reprimierten mRNA-Konzentrationen (Abb. 27 D, E).

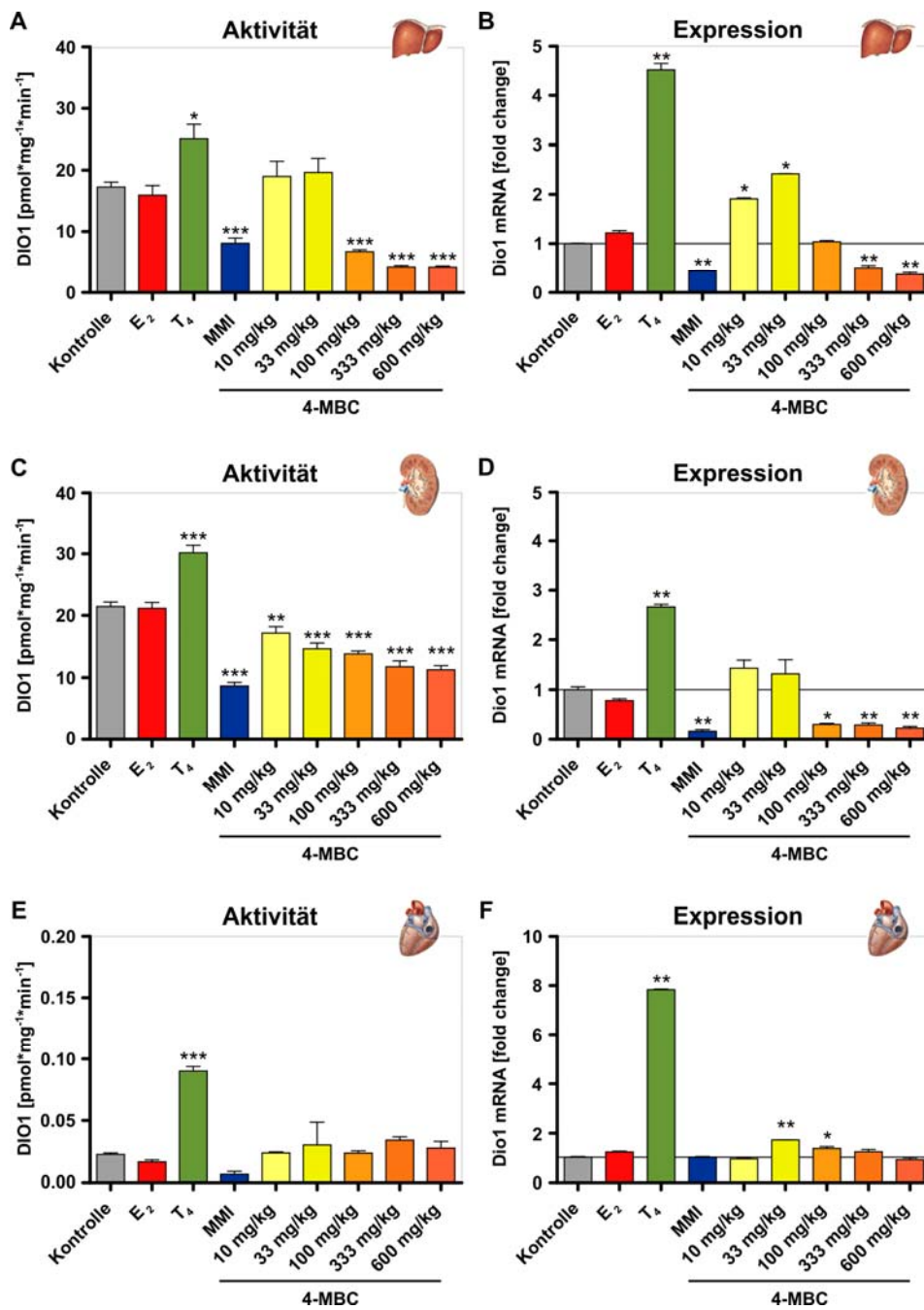


Abb. 27: Gewebespezifische Unterschiede der peripheren DIO1 nach subakuter Applikation von 4-MBC. Der linke Teil der Abbildung zeigt die in den peripheren Organen Leber, Niere und Herz bestimmte enzymatische Aktivität der DIO1; im rechten Teil der Abbildung sind die zugehörigen mRNA-Expressionsdaten aufgeführt. In hyperthyreoten Tieren konnte entsprechend den in der

Literatur beschriebenen Daten in allen peripheren Organen eine erhöhte Aktivität der DIO1 detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren die Aktivitäten nach induzierter Hypothyreose signifikant erniedrigt. Die Applikation der Testsubstanz 4-MBC führte in der Leber bei Konzentrationen ≥ 100 mg/kg b.w. zu verminderten Deiodaseaktivitäten (A), während die renale Aktivität der DIO1 dosisabhängig reduziert wurde (B). Im Herzen hatte 4-MBC keine signifikanten Effekte (C). Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariectomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Das Expressionsprofil der Dio1 entsprach in der Leber (D) im Wesentlichen den bereits für die Enzymaktivität der Dio1 beschriebenen Veränderungen. In der Niere dagegen zeigte 4-MBC bei Konzentrationen von 10 und 33 mg/kg b.w. leicht erhöhte Transkriptlevel (E), während die Expression im Herzen weitgehend unbeeinflusst blieb (F). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh (REST MCS). Die dargestellten Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 12 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Der Einfluss von Hyper- und Hypothyreose auf die Expression der Dio2 wurde bereits in 3.2.1 beschrieben. Während in der Leber 4-MBC-behandelter Tiere eine signifikante Reduktion der Expression detektiert wurde (Abb. 28 A), zeigte die Expressionsanalyse in der Niere eine dosisabhängig verstärkte Transkription mit einer maximalen Induktion um Faktor 12,0 bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. (Abb. 28 B). Die Expression der kardialen Dio2 blieb nach Applikation von 4-MBC unbeeinflusst (Abb. 28 C).

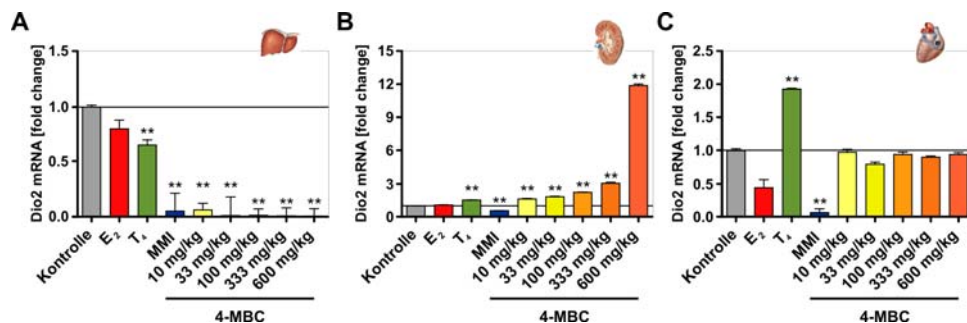


Abb. 28: Gewebespezifische Unterschiede der peripheren Dio2 nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariectomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. In der Leber wurde die Expression der Dio2 nach Applikation der Referenzsubstanzen wie auch der Testsubstanz 4-MBC in allen Gruppen signifikant reprimiert (A). In der Niere konnte neben den bereits in der Literatur beschriebenen Effekten für die Referenzsubstanzen eine dosisabhängige signifikante Induktion der Expression durch 4-MBC nachgewiesen werden (B). Im Herzen hatte die Applikation von 4-MBC keinen Einfluss auf die Transkription der Dio2 (C). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; REST MCS).

Die Transkriptanalyse der T₃-regulierten Gene Me1, Spot14 und Gpd2 zeigte nach Applikation von T₄ eine Zunahme der Expression, während hypothyreote Tiere reprimierte Transkriptlevel zeigten (Abb. 29). In Leber, Niere und Herz hatte die

Applikation von 4-MBC bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg eine Reduktion der Transkriptmenge zur Folge, wobei diese ausschließlich in Leber und Niere zu signifikanten Effekten führte (Abb. 29 A, B, C). Die Transkription der Gpd2 wurde durch 4-MBC konzentrationsabhängig reprimiert (Abb. 29 D, E, F). Neben einer leichten Erhöhung der Expression nach Applikation von 4-MBC in Konzentrationen ≤ 33 mg/kg b.w. in der Leber, konnten in allen untersuchten Geweben reduzierte Transkriptlevel von Spot14 nachgewiesen werden (Abb. 29 G, H, I).

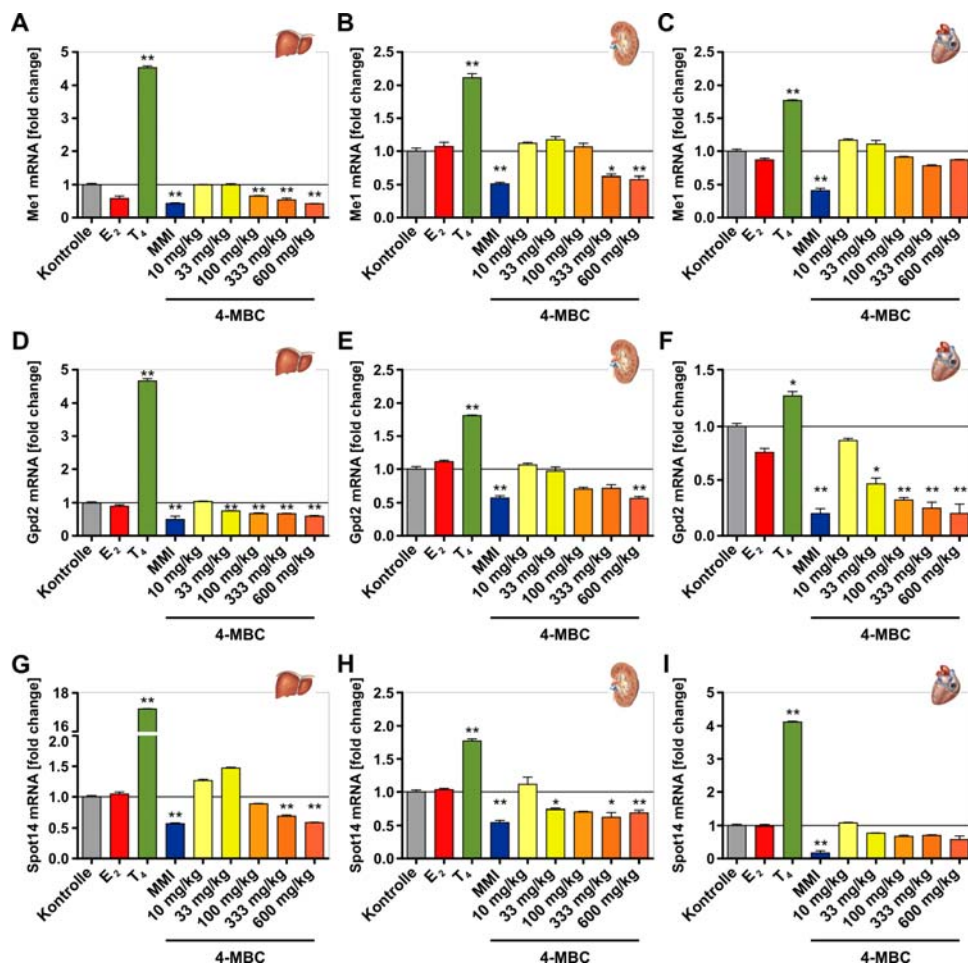


Abb. 29: Expressionsanalyse T₃-regulierter Zielgene in peripheren Organen nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der ovariektomierten Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Das Expressionsprofil der untersuchten Gene zeigte nach Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI die in der Literatur beschriebenen Modifikationen. Die Expression von Me1, Spot14 und mGpd war in der Leber, in der Niere wie auch im Herzen nach Applikation von 4-MBC, mit Ausnahme von Me1 in der Niere, bei Konzentrationen ≥ 100 mg/kg b.w. gegenüber der Kontrolle (signifikant) erniedrigt. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

Im Herzen als Zielorgan der Schilddrüsenhormone, beeinflusst T_3 insbesondere die Gene des Ca^{2+} - Stoffwechsels und der schweren Ketten des Myosins (MHC α und - β) (Gloss et al. 1999). Von Schilddrüsenhormonen wird die Expression von Myh6 und Myh7 gegensinnig reguliert (Tab. 18). 4-MBC hatte erst in der höchsten applizierten Konzentration einen signifikanten Effekt allein auf Myh6, dessen Transkription um 40% induziert wurde (Tab. 18).

Tab. 18: Expression von Myh6 und Myh7 im Herzen.

	Myh6			Myh7		
Kontrolle	1,00 ± 0,10			1,00 ± 0,01		
E ₂	0,98 ± 0,16		~	0,75 ± 0,11		↓
T ₄	1,31 ± 0,01 **		↑	0,63 ± 0,02 *		↓
MMI	0,8 ± 0,08		↓	1,83 ± 0,03 **		↑
4-MBC 10 mg/kg	1,07 ± 0,04		~	0,94 ± 0,08		~
4-MBC 33 mg/kg	1,12 ± 0,10		~	1,05 ± 0,19		~
4-MBC 100 mg/kg	1,14 ± 0,25		~	1,07 ± 0,20		~
4-MBC 333 mg/kg	1,15 ± 0,03		~	0,85 ± 0,16		~
4-MBC 600 mg/kg	1,39 ± 0,10 *		↑	1,00 ± 0,16		~

~ unverändert, ↑ >15% hochreguliert, ↓ >15% reprimiert; signifikant hochregulierte Expression verglichen zur jeweiligen Kontrolle ist in grün, reprimierte Expression in rot dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 6 Tieren je Gruppe ± SEM (REST MCS; p < 0,05*, p < 0,01**).

In den Ziel-Organen Leber, Niere und Herz wurde die Expression der Schilddrüsenhormonrezeptoren Thra1, Thra2 und Thr β konzentrationsabhängig reguliert. Dabei wurden alle Isoformen in Leber und Niere von 4-MBC induziert (bis auf Thra1 in der Niere, das ab 333 mg/kg 4-MBC reprimiert war) (Tab. 19). Anders als in Leber und Niere wurde im Herzen von 4-MBC nur Thra2 induziert und bildete damit die Effekte von MMI ab, das im Gegensatz zu T₄, welches Thra1 und Thr β induzierte, ausschließlich die mRNA-Spiegel von Thra2 induzierte. Damit beeinflusst 4-MBC Organ- und Isoform-spezifisch die Expression von TR in der Peripherie.

3.2.8 Inflammatorischer Zytokine nach subakuter Applikation von 4-MBC

Die reduzierte Aktivität und Expression von DIO1 in der Leber kann einerseits eine direkte Wirkung von 4-MBC sein, andererseits wurde ein ähnlicher Effekt bei der „non-thyroidal illness“ beschrieben (unspezifische Veränderungen der Schilddrüsenachse bei Erkrankungen anderer Genese, die u.a. mit LPS induziert werden kann) (Boelen et al. 2004). Entsprechend wurde die Wirkung von 4-MBC auf die Expression des Akutphaseproteins Mt2 und von IL-6 als Entzündungsparameter in Serum und Leber

Ergebnisse

gemessen (Abb. 30). Beide Entzündungsmarker waren konzentrationsabhängig erhöht, so dass die reduzierte Expression von Dio1 nach Behandlung mit 4-MBC sekundär durch die Entzündungsreaktion vermittelt werden/worden sein kann. Die Expression von IL-1 β und TNF α war nach 4-MBC-Behandlung nicht verändert (mRNA Spiegel in der Leber und Luminex im Serum - Daten nicht gezeigt).

Tab. 19: Expression von Thra1, Thra2 und Thrb in peripheren Geweben.

Leber	Thra1		Thra2		Thrb	
Kontrolle	1,00 \pm 0,16		1,00 \pm 0,24		1,00 \pm 0,74	
E ₂	0,74 \pm 0,38	↓	0,79 \pm 0,25	↓	0,81 \pm 0,82	↓
T ₄	0,48 \pm 0,05 **	↓	0,23 \pm 0,04 **	↓	1,01 \pm 0,23	~
MMI	3,65 \pm 0,14 **	↑	4,24 \pm 0,08 **	↑	14,84 \pm 0,22 **	↑
4-MBC 10 mg/kg	2,01 \pm 0,06 *	↑	2,09 \pm 0,06 **	↑	4,70 \pm 0,01 **	↑
4-MBC 33 mg/kg	1,84 \pm 0,11 **	↑	3,12 \pm 0,04 **	↑	6,31 \pm 0,04 **	↑
4-MBC 100 mg/kg	3,31 \pm 0,20 *	↑	3,56 \pm 0,20 **	↑	7,46 \pm 0,02 **	↑
4-MBC 333 mg/kg	2,59 \pm 0,19 **	↑	4,09 \pm 0,05 **	↑	8,05 \pm 0,07 **	↑
4-MBC 600 mg/kg	3,89 \pm 0,54 **	↑	4,06 \pm 0,03 **	↑	10,62 \pm 0,05 **	↑
Niere	Thra1		Thra2		Thrb	
Kontrolle	1,00 \pm 0,01		1,00 \pm 0,19		1,00 \pm 0,07	
E ₂	0,84 \pm 0,05	↓	1,06 \pm 0,03	~	1,00 \pm 0,16	~
T ₄	0,32 \pm 0,01 **	↓	0,31 \pm 0,03 **	↓	1,08 \pm 0,09	~
MMI	3,10 \pm 0,06 **	↑	5,40 \pm 0,10 **	↑	2,70 \pm 0,18 **	↑
4-MBC 10 mg/kg	0,89 \pm 0,08	↓	1,19 \pm 0,10	↑	1,34 \pm 0,03	↑
4-MBC 33 mg/kg	1,30 \pm 0,02 **	↑	1,78 \pm 0,05 **	↑	2,03 \pm 0,33 **	↑
4-MBC 100 mg/kg	0,73 \pm 0,09	↓	3,05 \pm 0,02 **	↑	1,74 \pm 0,11 **	↑
4-MBC 333 mg/kg	0,62 \pm 0,16 *	↓	3,91 \pm 0,09 **	↑	1,90 \pm 0,17 **	↑
4-MBC 600 mg/kg	0,54 \pm 0,04 **	↓	5,01 \pm 0,07 **	↑	2,48 \pm 0,32 **	↑
Herz	Thra1		Thra2		Thrb	
Kontrolle	1,00 \pm 0,05		1,00 \pm 0,04		1,00 \pm 0,01	
E ₂	0,67 \pm 0,14	↓	0,73 \pm 0,14	↓	1,01 \pm 0,16	~
T ₄	1,30 \pm 0,03 **	↑	0,69 \pm 0,07	↓	1,24 \pm 0,02 **	↑
MMI	0,78 \pm 0,12	↓	1,44 \pm 0,04 **	↑	0,89 \pm 0,10	↓
4-MBC 10 mg/kg	0,90 \pm 0,10	~	1,14 \pm 0,21	~	1,10 \pm 0,05	~
4-MBC 33 mg/kg	0,95 \pm 0,10	~	1,35 \pm 0,22 *	↑	0,97 \pm 0,02	~
4-MBC 100 mg/kg	0,66 \pm 0,04	↓	1,25 \pm 0,03 *	↑	1,00 \pm 0,18	~
4-MBC 333 mg/kg	0,90 \pm 0,05	~	1,47 \pm 0,21 *	↑	0,78 \pm 0,31	↓
4-MBC 600 mg/kg	3,86 \pm 0,04 *	↑	1,35 \pm 0,12 *	↑	0,86 \pm 0,30	↓

~ unverändert, ↑ >15% hochreguliert, ↓ >15% reprimiert; signifikant hochregulierte Expression verglichen zur jeweiligen Kontrolle ist in grün, reprimierte Expression in rot dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM (REST MCS; p < 0,05*, p < 0,01**).

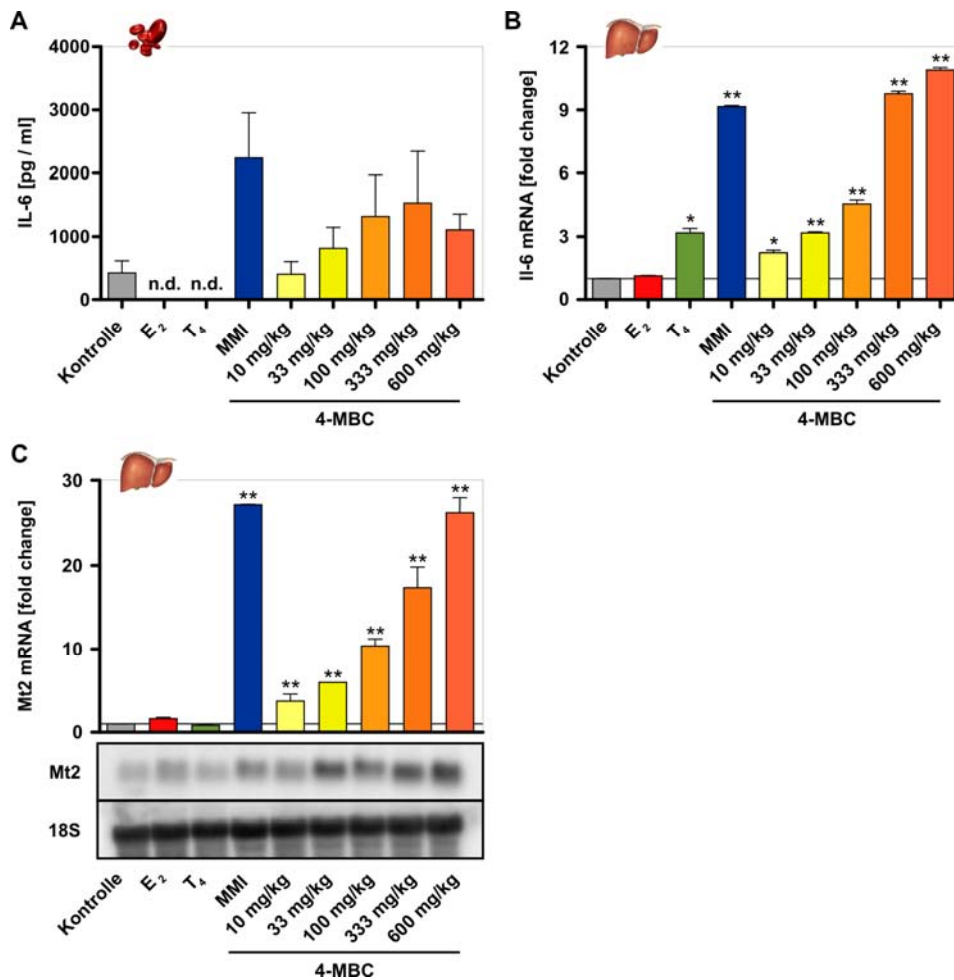


Abb. 30: Analyse klassischer Entzündungsparameter nach subakuter Applikation von 4-MBC.

Die mittels Multiplex-Immunoassay bestimmte Serumkonzentration von IL-6 wie auch die Daten zur Analyse des Expressionsprofils von Il-6 in der Leber wurden auf die Basalwerte der ovariectomierten Kontrollen bezogen. Nach Applikation von 4-MBC war die Konzentration von IL-6 im Serum signifikant erhöht (A). Analog dazu konnte auch in der Leber eine verstärkte Expression von Il-6 nachgewiesen werden (B). Die mittels qPCR und Northern blot analysierte Expression des Akutphaseproteins Mt2 war nach Applikation von 4-MBC signifikant erhöht (C). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh (REST MCS). Die dargestellten Serumwerte repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 7 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). Das im Northern blot dargestellte Expressionsprofil von Mt2 zeigt die Transkriptmenge gruppenweise gepoolter RNA bezogen auf 18SrRNA. n.d. nicht detektiert

3.3 Untersuchungen zur Wirkung von 4-MBC im Zellkulturmodell

Die zuvor beschriebenen *in vivo*-Experimente, die in ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten durchgeföhrt wurden, zeigten, dass die Applikation der UV-Filters 4-MBC die Feedbackregulation der thyreotropen Achse beeinträchtigt und darüber

hinaus die Expression der an Iodidtransport und Schilddrüsenhormonbiosynthese beteiligten Gene der Schilddrüse moduliert. Des Weiteren konnte mit Hilfe eines auf *hrTPO* basierten *in vitro*-Assays gezeigt werden, dass 4-MBC keinen direkten Effekt auf die Aktivität der TPO hat und somit die zentralen Schritte der Schilddrüsenhormonbiosynthese nicht beeinflusst (Schmutzler et al. 2004). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der Iodidtransport von extrazellulärem Iodid über NIS in das Lumen des Thyrozyten beeinträchtigt sein könnte. Für die nachfolgend erläuterten Ergebnisse der *in vitro*-Analyse wurden Zellen der Linie FRTL-5 verwendet, die in Gegenwart von TSH alle typischen Charakteristika euthyreoter Schilddrüsenzellen aufweisen (Ambesi-Impiombato et al. 1980).

3.3.1 Beeinflussung des Iodidtransports durch 4-MBC im Zellkulturmodell

Um den Einfluss von 4-MBC auf den Iodidtransport im Zellkulturmodell zu analysieren, wurde die aus primären Thyrozyten entwickelte Zelllinie FRTL-5 verwendet, die ein anerkanntes Modell zur Charakterisierung der Iodidaufnahme über das basolateral lokalisierte Transportprotein NIS in das Lumen des Thyrozyten darstellt (Maccocci et al. 1983). Zur Untersuchung direkt kompetitiver Effekte wurde der Transport des extrazellulär zur Verfügung gestellten ^{125}NaI in Gegenwart von 4-MBC verfolgt. Indes wurden die zur Charakterisierung transkriptioneller bzw. translationaler Effekte verwendeten Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen in Gegenwart von 4-MBC unter serumfreien Bedingungen kultiviert bevor nach zweimaligem Waschen der Zellen mit HBSS die Aufnahmerate des radioaktiv markierten ^{125}NaI im Gammacounter bestimmt wurde.

Die Untersuchung direkt kompetitiver Effekte zeigte zunächst eine signifikante Beeinträchtigung des Iodidtransports durch die beiden als Inhibitor wirkenden Substanzen NaClO_4 und RA. Während NaClO_4 vorrangig die Aktivität von NIS beeinflusst, wurden für RA inhibitorische Effekte auf Genregulation und Funktion beschrieben (Schmutzler et al. 1997; Spitzweg et al. 1999). Zudem zeigte E_2 , das zur Beurteilung möglicher östrogenen Effekte der Testsubstanz als Kontrolle mitgeführt wurde, bei direkter Konkurrenz keinen Einfluss auf die Transportrate. Dagegen wirkte 4-MBC unter kompetitiven Bedingungen bei Konzentrationen $\leq 10^{-6}$ M stimulierend auf den Iodidtransport, während bei steigenden Konzentrationen des UV-Filters eine Reduktion der Transportrate auf 78 % des Kontrollwertes beobachtet wurde (Abb. 31 A).

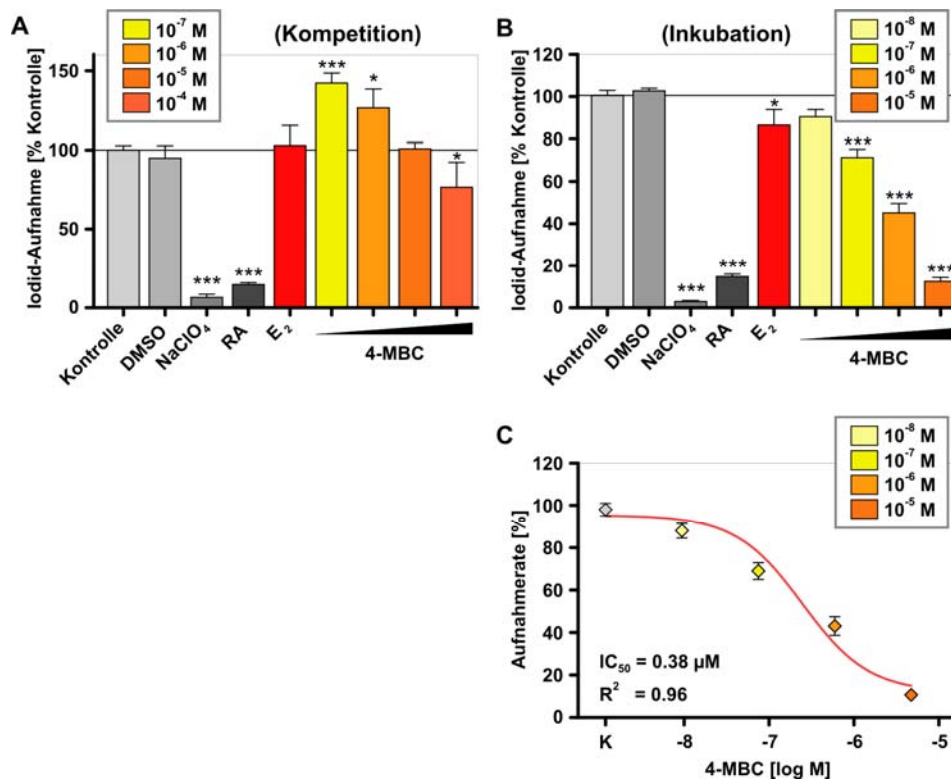


Abb. 31: Effekte von 4-MBC auf den Iodidtransport in FRTL-5-Zellen.

Zellen der Linie FRTL-5 wurden im Verhältnis 1:4 gesplittet und in sterile 24-well-Platten ausgesät. Neben der Lösungsmittelkontrolle DMSO wurden klassische Inhibitoren von NIS (NaClO₄, RA) sowie E₂ als Positivkontrollen mitgeführt. (A) Zur Untersuchung direkter kompetitiver Effekte wurde der Transport von radioaktiv markiertem ¹²⁵I in Gegenwart der Kontrollsubstanzen bzw. der Testsubstanz 4-MBC verfolgt. 4-MBC führte bei Konzentrationen ≤ 10⁻⁶ M zu einer Induktion des Iodidtransports, während bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M gegenüber der Kontrolle keine Veränderung beobachtet wurde. Bei direkter Konkurrenz wurde ausschließlich bei einer Konzentration von 10⁻⁴ M eine Reduktion der Transportrate nachgewiesen. (B) Zur Charakterisierung transkriptioneller bzw. translationaler Effekte wurden die Zellen über einen Zeitraum von 5 Tagen in Gegenwart der Kontrollsubstanzen bzw. der Testsubstanz 4-MBC kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS erfolgte die Bestimmung der Aufnahmerate von ¹²⁵I in Abwesenheit der Substanzen. Die Inkubation mit 4-MBC führte zur dosisabhängigen Reduktion des Iodidtransports. (C) Die Darstellung der Dosis-Wirkungskurve und die Berechnung des IC₅₀-Wertes erfolgten mit Hilfe der Funktion „sigmoidal dose-response“ (GraphPad Prism). Angegeben sind die Mittelwerte von je 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Triplikaten ± SEM (p < 0,05*, p < 0,001***; Dunnett's Test).

Analog des bereits von Furlanetto et al. beschriebenen Effekts zeigten die über einen Zeitraum von 5 Tagen mit E₂ kultivierten Zellen der Linie FRTL-5 eine um 14 % reduzierte Transportrate gegenüber der Kontrolle (Furlanetto et al. 1999). Nach Inkubation mit 4-MBC konnte bereits bei einer Konzentration von 10⁻⁸ M eine Reduktion der Transportaktivität festgestellt werden, die bei steigenden Konzentrationen zu einer signifikanten, dosisabhängigen Hemmung des Iodidtransports führte. Bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M wurde eine maximale Inhibition erreicht, die bei 13 % des Ausgangsniveaus lag und überdies zytotoxische Effekte zur Folge hatte (Abb. 31 B). Mit Hilfe der in Abb. 31 C dargestellten sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve konnte für

4-MBC ein IC_{50} -Wert von $0,38 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Die additiv zur Wirkung von E_2 nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen nachgewiesene Hemmung des Iodidtransports durch 4-MBC deutet auf eine veränderte Transkription oder posttranslationale Modifikation von NIS hin.

3.3.2 Expressionsanalyse der Hormonbiosynthese im Zellkulturmodell

Zur mechanistischen Untersuchung der durch 4-MBC vermittelten Inhibition des Iodidtransports wurde die Expression der an Iodidaufnahme und Schilddrüsenhormonbiosynthese beteiligten Gene auf Protein- und Transkriptionsebene analysiert. Dazu wurden Zellen der Linie FRTL-5 zunächst im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 gesplittet, in sterilen T75-Kulturflaschen ausgesät und in Gegenwart der Testsubstanz 4-MBC über einen Zeitraum von 3 - 5 Tagen kultiviert. Die hier eingesetzten Konzentrationen des UV-Filters hatten eine signifikant reduzierte Expression des bereits in 3.3.1 untersuchten Iodidtransportproteins zur Folge.

Die Inkubation der FRTL-5-Zellen mit 4-MBC führte parallel zu Konzentration und Inkubationszeit zu einer Erhöhung der Expression von Tshr, dessen Aktivität und Transkription in Gegenwart von TSH stimuliert wird. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen konnte ausschließlich bei einer Konzentration von $5,0 \mu\text{M}$ eine um Faktor 2,0 erhöhte Transkription nachgewiesen werden, während nach einer Inkubationsdauer von 5 Tagen eine dosisabhängige Induktion der Expression von Tshr gegenüber der Kontrolle festgestellt wurde (Abb. 32 A). Die Zellen erhielten dabei mit dem Medienwechsel zu Inkubationsbeginn einen TSH-Stimulus, der die Aufrechterhaltung der morphologischen Charakteristika differenzierter, euthyreoter Thyrozyten sicherstellte. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Zellen mit 4-MBC bereits nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen zu einer konzentrationsabhängig verstärkten Expression von Nis, die schon bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ gegenüber der Kontrolle um Faktor 3,9 erhöht war. Bei einer Konzentration von $5,0 \mu\text{M}$ wurde eine 5,9-fache Induktion der Transkription detektiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen konnten weiterhin signifikant erhöhte Transkriptlevel festgestellt werden, jedoch waren diese mit einer maximal 1,9-fachen Erhöhung des Expressionsniveaus schwächer ausgeprägt (Abb. 32 B). Konsistent mit dem ausbleibenden Effekt von 4-MBC auf die Aktivität der TPO im Zellkulturmodell zeigte auch die Expression der Tpo unabhängig vom Inkubationszeitraum nur marginale Veränderungen (Abb. 32 C). Die Expression der Dio1 wurde ausschließlich nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei

einer Konzentration von 5,0 μM signifikant erhöht, blieb sonst aber unbeeinflusst (Abb. 32 D).

Somit konnten nach Inkubation der Zellen mit 4-MBC gegenläufige Ergebnisse für die Bestimmung der Transportaktivität und die Expression von NIS auf Transkriptebene festgestellt werden. Wie in 3.3.1 beschrieben führte die Inkubation der FRTL-5-Zellen mit der Testsubstanz 4-MBC zu einer signifikanten Reduktion der Transportrate nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen, der zum Zeitpunkt der Aktivitätsmessung im direkten Vergleich der eingesetzten Konzentrationen (0,1 μM - 1,0 μM) eine $\sim 1,5$ -fach erhöhte Transkriptmenge gegenüber stand; diese zeigte nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen bereits eine Induktion um Faktor $\leq 4,9$. Aufgrund dieser Diskrepanz wurde die Proteinexpression von NIS mittels Western blot-Analyse überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Expression des 80 kDa großen Membranproteins entsprechend der reduzierten Transportrate abhängig von der Konzentration der Testsubstanz und der Inkubationszeit auf Proteinebene reduziert wurde (Abb. 32 E). Dabei scheint 4-MBC die Proteinstabilität von NIS zu beeinflussen, wobei die sekundäre Regulation auf Transkriptebene nicht ausreichend scheint, um die Proteinmenge zu stabilisieren. Als Lösungsmittelkontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen, während RA, welche die Genexpression von Nis in FRTL-5-Zellen inhibiert, als Positivkontrolle wurde (Schmutzler et al. 1997).

3.4 Methodische Untersuchungen im Wildtyp-Mausmodell

Die Analyse endokrin aktiver Substanzen erfolgte bislang in ovariectomierten weiblichen Ratten, die das klassische Tiermodell zur Untersuchung endokriner Effekte darstellen. Entsprechend wurden die derzeit bekannten Interferenzen endokrin aktiver Substanzen mit der thyreotropen Achse bisher vorwiegend in der Ratte untersucht.

Um den Einfluss der bislang in weiblichen ovariectomierten Ratten untersuchten goitrogenen Substanzen auch im Mausmodell auf eine mögliche Rezeptorinteraktion hin zu analysieren, wurden zunächst Vorversuche zur Dosisfindung und Optimierung der Applikationsform im Wildtyp-Mausmodell durchgeführt. Die zur Dosisfindung eingesetzten Konzentrationen für 4-MBC, GEN und F21388 wurden unter Berücksichtigung der bekannten ADI-Werte sowie der publizierten Daten für die Ratte (und für GEN in der Maus) berechnet. Dabei bezeichnet der ADI-Wert, der für *acceptable daily intake* steht, die Dosis einer Substanz, die bei lebenslanger täglicher

Aufnahme als derzeit medizinisch unbedenklich gilt. Entsprechend wurden die bei Ratten zuvor und in der Literatur eingesetzten Substanzmengen mit den bisher in Mäusen eingesetzten Substanzmengen verglichen und der resultierende Faktor auf bisher nicht in der Maus verabreichte Substanzen angewendet. Der Umrechnungsfaktor berechnet sich aus der Literaturangabe für GEN in der Maus (2,5 mg GEN/kg b.w./Tag s.c. (Strauss et al. 1998)) und der Ratte (5,4 mg/kg b.w./Tag (Rimoldi et al. 2007)). Diese Werte werden bei normaler Exposition und abwechslungsreicher Ernährung erreicht und liegen im Bereich des derzeit bekannten ADI-Werts. Für GEN ergibt sich der Umrechnungsfaktor Maus/Ratte von 2,16 (5,4 mg in der Ratte / 2,5 mg in der Maus). Aus der Dosierung von 4-MBC in der Ratte mit 6,0 - 310,0 mg/kg b.w./d (Prof. W. Wuttke Abt. Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen - pers. Kommunikation) ergibt sich für die Maus 2,8 - 143,5 mg/kg b.w./d. Die eingesetzten Dosen waren 62,5/125/185 mg/kg b.w. Für F21388 sind keine ADI-Werte verfügbar. Da es wie GEN zur Gruppe der Flavonoide gehört, wurden für F21388 gleiche Testkonzentrationen eingesetzt (2,5/7,5/15 mg/kg b.w.). An der maximalen und der minimalen Konzentrationen lassen sich somit der obere und der untere Testbereich klar eingrenzen. Eine in der Mitte dieser beiden Substanzmengen angesiedelte Testdosis dient - für den Fall, dass diese Dosis bereits ausreicht, um messbare Effekte zu beschreiben - der Minimalbelastung der Tiere.

Die Untersuchungen zur Dosisfindung wurden in zwei Wildtyp-Stämmen durchgeführt: 129S2/SvPasCrl als genetischer Hintergrund des im weiteren Verlauf verwendeten Knockout-Modells und zum anderen C57/Bl6 zur Analyse möglicher Stammunterschiede. Die Applikation erfolgte per Injektion s.c. bzw. oral mit Hilfe einer Schlundsonde. Die Tiere wurden im Alter von 35 Tagen bei sojafreier Diät untersucht.

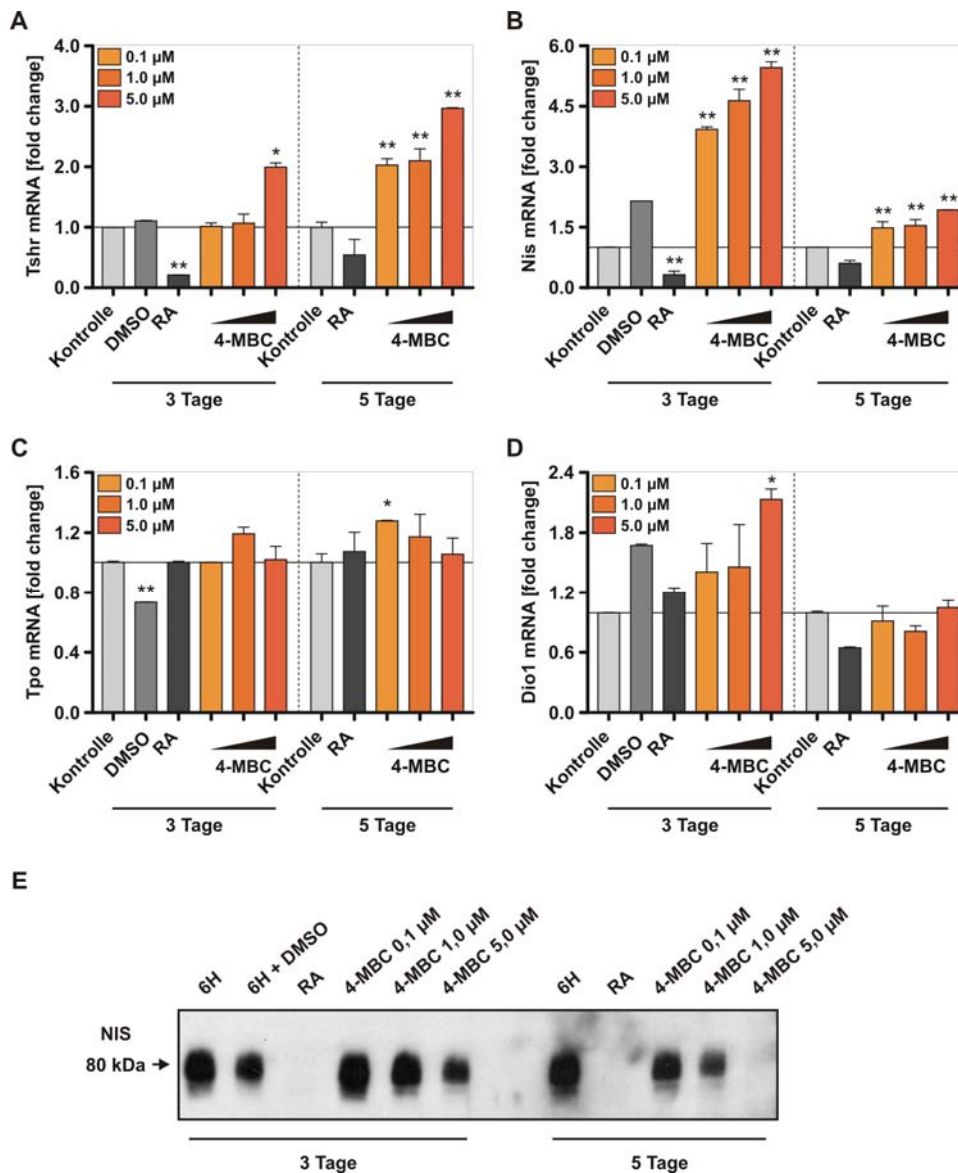


Abb. 32: Effekte von 4-MBC auf Iodidtransport und Hormonbiosynthese in FRTL-5-Zellen.

Zur Charakterisierung transkriptioneller Effekte von 4-MBC wurden FRTL-5-Zellen über einen Zeitraum von 3 - 5 Tagen mit der Testsubstanz inkubiert. Die Expressionsdaten wurden auf das Expressionsniveau der Kontrollen normalisiert. Das Expressionsprofil der untersuchten Gene ist nach Applikation der Referenzsubstanzen DMSO und RA konsistent mit den Literaturwerten. Nach Inkubation mit 4-MBC konnte eine erhöhte Expression von Tshr parallel zur Dosis und Inkubationsdauer festgestellt werden (A). 4-MBC hatte unabhängig von der Inkubationszeit einen induzierenden Effekt auf die Transkription von Nis, zeigte aber nach einer Inkubationsdauer von 5 Tagen einen schwächeren Einfluss (B). Das Expressionsprofil von Tpo (C) und Dio1 (D) wurde durch 4-MBC im Zellkulturmodell nicht signifikant beeinflusst. Die Western blot-Analyse zur Untersuchung der Expression von NIS zeigte nach Inkubation mit 4-MBC abhängig von der Konzentration der Testsubstanz und der Inkubationszeit eine verminderte Expression des Membranproteins im Vergleich zur Kontrolle (E). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von je 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Duplikaten \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

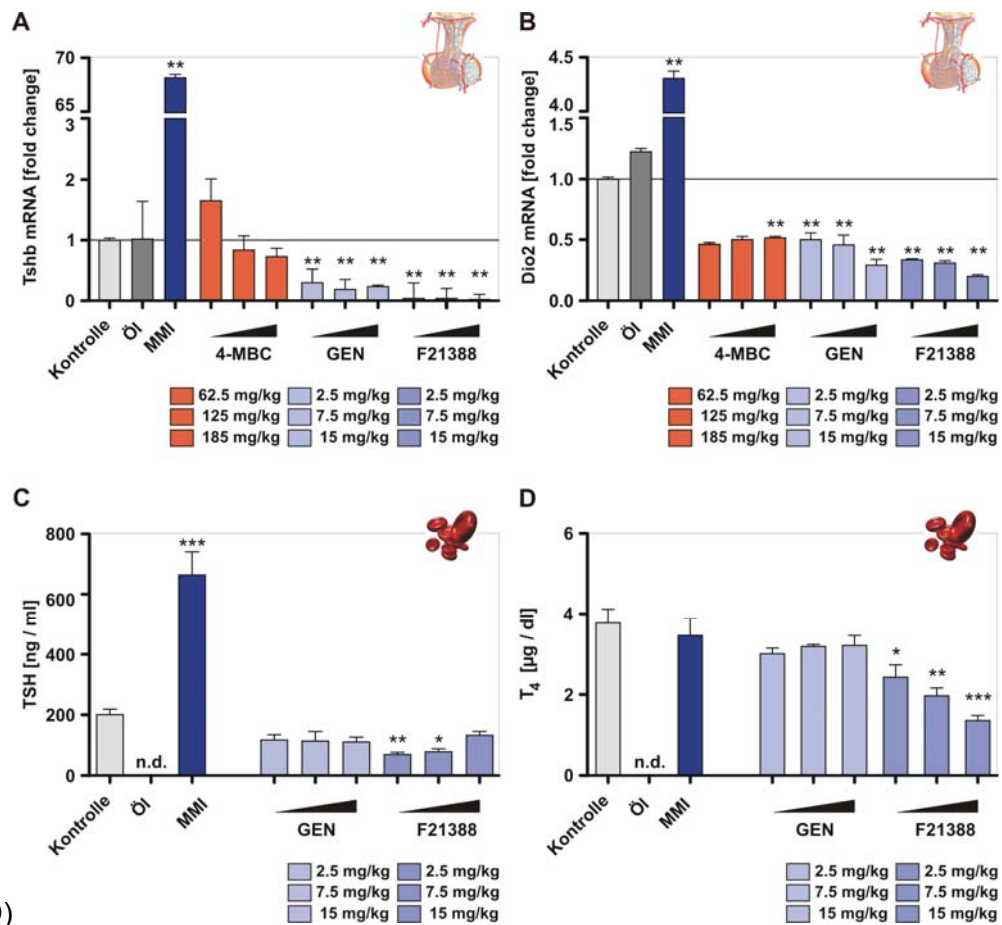
3.4.1 Parameter zur Beurteilung der Wirkung der Testsubstanzen

Die Experimente zur Untersuchung von EACs in weiblichen ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten zeigten sowohl nach chronischer als auch nach subakuter Applikation, dass sich die Serumkonzentrationen von TSH, T_4 und T_3 sowie die Genexpression in der Hypophyse als Parameter zur Überprüfung der Potenz endokrin aktiver Substanzen eignen. Darüber hinaus wurde auch die T_3 -abhängige enzymatische Aktivität der hepatischen DIO1 zur Einschätzung der Wirkung auf periphere Organe bestimmt. Entsprechend wurde zur initialen Untersuchung die Expression von Tshb und Dio2 in der Hypophyse bestimmt und bei veränderten Expressionswerten die Serumkonzentration von TSH und T_4 ermittelt (RIA und Luminex). Die subkutane Injektion der Testsubstanzen erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen in 129S2/Sv-Männchen. Diese Applikation führt zu geringerer Varianz, da alle Tiere die Testsubstanz in gleichen Mengen erhalten.

Die mittels qPCR ermittelten Daten zum Einfluss der Testsubstanzen auf die Genexpression in der Hypophyse zeigten nach Applikation der Thyreostatika MMI/NaClO₄ (MMI) die erwartete signifikante Erhöhung der Transkriptspiegel von Tshb und Dio2 (Abb. 33 A, B). Die Applikation des UV-Filters 4-MBC führte bei einer Konzentration von 62,5 mg/kg b.w. zu einer 1,7-fachen Erhöhung der Tsh β -Transkripte, während höhere Konzentrationen eine Reduktion der Transkriptmenge bewirkten. Die Applikation von GEN und F21388 hatte unabhängig von der Konzentration eine signifikante Repression der Expression zur Folge, wobei F21388 einen stärkeren Effekt hatte. Mit GEN wurde die Expression auf bis zu 20% reduziert, mit F21388 auf bis zu <2% (Abb. 33 A). Die Expression des negativ regulierten Gens Dio2 wurde durch Applikation aller Testsubstanzen reprimiert, wobei GEN (0,5 – 0,3-fach) und F21388 (0,3-0,2 fach) einen dosisabhängigen Effekt zeigten. 4-MBC bewirkte dosisunabhängig eine Reduktion auf die Hälfte des Expressionsniveaus gegenüber der Kontrolle (Abb. 33 B).

Die Konzentrationsbestimmung der Serumparameter TSH und T_4 in den mit GEN- und F21388- behandelten Tieren erfolgte mittels RIA. Die TSH-Konzentration wurde durch die Applikation beider Testsubstanzen (signifikant) reduziert, allerdings zeigte F21388 im Gegensatz zu GEN einen dosisabhängigen Effekt, mit dem stärksten Effekt bei der niedrigsten Dosis (Abb. 33 C). Die Applikation beider (Iso-)Flavonoide hatte eine Reduktion der Serumkonzentration von T_4 zur Folge, die aber ausschließlich für die mit F21388 behandelten Tiere signifikant war. T_4 im Serum wurde durch F21388 wie

erwartet gegensätzlich zu TSH beeinflusst und zeigte bei der höchsten Konzentration von F21388



33 D)

Abb. 33: Analyse der hypophysären Feedbackregulation zur Dosisfindung im Wildtyp-Mausmodell.

(A) Für 4-MBC konnte ein dosisabhängiger, nicht signifikanter Effekt auf die Expression von Tsh β nachgewiesen werden, während die Applikation von GEN und F21388 zu einer signifikanten Reduktion des Expressionsniveaus führte. (B) Die Expression von Dio2 wurde durch alle applizierten Testsubstanzen reprimiert. Das Expressionsprofil der untersuchten Gene zeigte nach Applikation der Referenzsubstanz MMI die in der Literatur beschriebenen Modifikationen. Expressionswerte werden auf die Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 5 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Gapdh (REST MCS). (C) Die Konzentration von TSH wurde durch Applikation von GEN leicht erniedrigt, während F21388 unabhängig von der verabreichten Konzentration zu einer Reduktion der TSH-Spiegel im Serum führte. (D) Für die Konzentration von T₄ konnte der gleiche Effekt beobachtet werden, allerdings zeigte die Applikation von F21388 einen dosisabhängigen Effekt auf die Konzentration von T₄ im Serum. Die Serumkonzentrationen von TSH und T₄ wurden jeweils auf die Basalwerte der Kontrollen bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte von jeweils 5 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Anhand dieser Daten wurde für die Untersuchungen im TR α -Knockout sowohl für GEN als auch für F21388 eine Konzentration von 7,5 mg/kg b.w. ausgewählt, zum einen da die Effekte jeweils im mittleren Bereich lagen und dosisabhängige Effekte beobachtet

werden konnten und zum anderen, da diese Konzentration im Bereich des für GEN publizierten ADI-Werts liegt. Da die Effekte von 4-MBC im 129Sv-Wildtyp nicht eindeutig zu interpretieren waren, wurden für diese Substanz weitere Vorversuche durchgeführt. Diese zeigten abhängig vom Mausmodell einen geringen Effekt, der als Hyperthyreose interpretiert werden konnte.

3.4.2 Einfluss des Applikationszeitraumes

Initial wurden die Testsubstanzen über einen Zeitraum von 5 Tagen appliziert, um die Effekte der subakuten Applikation entsprechend der zur Verfügung stehenden Vergleichsdaten interpretieren zu können. Da die Applikation der (Iso-)Flavonoide bereits im ersten Versuch zur Dosisfindung nach einer Applikationsdauer von 5 Tagen deutliche Effekte auf die Serumkonzentrationen von TSH und T₄ sowie die Genexpression der hypophysären Dio2 zeigte, konnte die im weiteren Verlauf der Untersuchungen einzusetzende Dosis nach subakuter Applikation ausgewählt werden.

Die Effekte von 4-MBC waren nicht mit denen im Rattenmodell vergleichbar, in dem nach chronischer und subakuter Gabe die Expression von Tshb und Dio2 hochreguliert waren. Entsprechend wurden weitere Versuche mit einer engeren Dosis-Wirkungskurve über 5 und 14 Tage durchgeführt, deren Effekte jedoch nicht zur Auswahl einer geeigneten Dosis beitragen konnten und damit keine Versuche im Knockout-Modell erlaubten.

3.4.3 Einfluss von Stamm, Applikationsform und Geschlecht

Aufgrund der nicht mit dem Rattenmodell vergleichbaren Effekte von 4-MBC im 129Sv-Wildtyp-Modell wurden weitere Versuche zur Dosisfindung in männlichen und weiblichen C57/Bl6-Mäusen angeschlossen, um einen möglichen Einfluss des Wildtyp-Stammes sowie des Geschlechts auf die Ausprägung der Effekte ausschließen zu können. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei dem initial in 129Sv-Wildtypen durchgeführten Versuch zur Dosisfindung. Darüber hinaus wurde in einem parallelen Ansatz der Einfluss der Applikationsform untersucht, indem die Testsubstanz oral per Schlundsonde verabreicht wurde. Unabhängig vom Geschlecht führte weder die orale Applikation von 4-MBC mittels Schlundsonde noch die subkutane Injektion der Testsubstanz nach einem Applikationszeitraum von 5 Tagen zu signifikanten Effekten auf die thyreotrope Achse (Daten nicht gezeigt). Somit konnten für die Testsubstanz 4-MBC eindeutig speziesspezifische Effekte festgestellt werden, da der Nachweis der in

weiblichen Sprague-Dawley-Ratten gezeigten goitrogenen Wirkung im Wildtyp-Mausmodell nicht reproduziert werden konnte.

Im weiteren Verlauf erfolgte die Applikation der Testsubstanzen GEN und F21388 entsprechend der initial durchgeführten Untersuchungen per s.c. Injektion, um die Varianz der applizierten Menge zu minimieren. Es wurden sowohl Männchen als auch Weibchen eingesetzt, da die thyreotrope Achse deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede zeigt und somit davon auszugehen ist, dass auch die Testsubstanzen abhängig vom Geschlecht unterschiedlich auf die Biosynthese von Schilddrüsenhormonen und den Schilddrüsenhormonmetabolismus wirken (Schomburg und Bauer 1997).

3.5 Effekte von GEN und F21388 im TR α ^{0/0}-Modell

Die TRs spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Effekte auf Endorgane und der Regulation der Schilddrüsenachse. Um zu untersuchen, über welchen der beiden Rezeptoren (TR α oder TR β) die Effekte der EAC vermittelt werden, oder ob eine Rezeptor-unabhängige Wirkung vorliegt, wurden TR-defiziente Tiere verwendet. Diese sollten - für den Fall dass, TRs zum Wirkmechanismus beitragen - zumindest teilweise vor den Effekten der EAC geschützt sein.

Die gut belegte (anti-)östrogene bzw. (anti-)androgene Wirkung von EAC geht auf ihre Eigenschaft zurück, an Steroidhormon-Rezeptoren zu binden und dadurch in die hormonabhängige Genregulation einzugreifen. Damit ist auch eine Interaktion von EAC mit TRs plausibel, da auch diese zur Familie der liganden-regulierten Transkriptionsfaktoren gehört. In diesem Fall würden EACs an zentraler Stelle, nämlich der Genregulation durch TRs, ihre Wirkung ausüben.

Für die geplanten Versuche kommen aufgrund der Fragestellung nur einfache Knockout-Mutanten in Frage, da mit einem Modell, in dem beide Rezeptoren deletiert sind, nicht untersucht werden könnte, über welchen Rezeptor die Wirkung des endokrinen Disruptors vermittelt wird. Im TR α ^{0/0}-Modell (Abb. 34) sind durch homologe Rekombination alle Splicevarianten des TR α -Locus deletiert, somit wird die Analyse der Substanzen eindeutiger, da für jede Mutation im TR α -Locus sehr unterschiedliche Phenotypen beschrieben sind (Flamant und Samarut 2003). Das von uns ausgewählte TR α ^{0/0}-Modell zeigt vor allem keine Veränderung bezüglich der basalen Serumwerte

der Schilddrüsenhormone (Gauthier et al. 2001). Da es in den beschriebenen Vorversuchen keinen Hinweis auf T₃-analoge, thyromimetische Wirkungen der EACs gab, wurde für die nachfolgenden Untersuchungen ein Modell gewählt, in dem die hauptsächlich inhibitorischen Wirkungen der EACs verfolgt werden können, die sich in der Regel in einer Zunahme der Serumwerte für TSH und einer Abnahme von T₄ und T₃ im Sinne des negativen Feedbackmechanismus widerspiegeln.

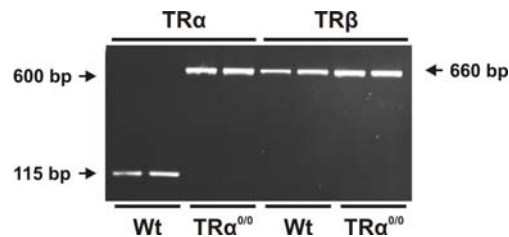


Abb. 34: Genotypisierung des TRα^{0/0}-Modells.

PCR-Analyse des TRα-Wildtyp- bzw. TRα-Knockout-Allels, sowie des TRβ-Wildtyp-Allels mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung im 2,0 %igen SB-Agarosegel. Das TRα-Wildtyp-Allel hatte eine Größe von 115 bp, während das TRα-Knockout-Allel bei einer Größe von 660 bp detektiert wurde. Das im Wildtyp (Wt) und TRα-Knockout (TRα^{0/0}) nachgewiesene TRβ-Wildtyp-Allel hatte eine Fragmentgröße von 600 bp.

3.5.1 Einfluss auf Körpergewicht und Konstitution der Tiere

Schilddrüsenhormone beeinflussen u.a. über Veränderungen des Energiestoffwechsels das Körpergewicht. Anders als im Menschen bewirkt Hypothyreose jedoch in der Maus ein reduziertes Körpergewicht (Amendola et al. 2005), das auch für inhibitorische EACs zu erwarten ist. In den Gewichtsverläufen der ab Tag 21 bis Tag 45 täglich behandelten Tiere führte allein die Positivkontrolle MMI zur signifikanten Reduktion des Körpergewichtes. Entsprechend ergibt sich für die verwendeten Konzentrationen von GEN und F21388 kein signifikanter Effekt auf das Körpergewicht (Abb. 35). Der Effekt von MMI war unabhängig vom Geschlecht und unabhängig von TRα.

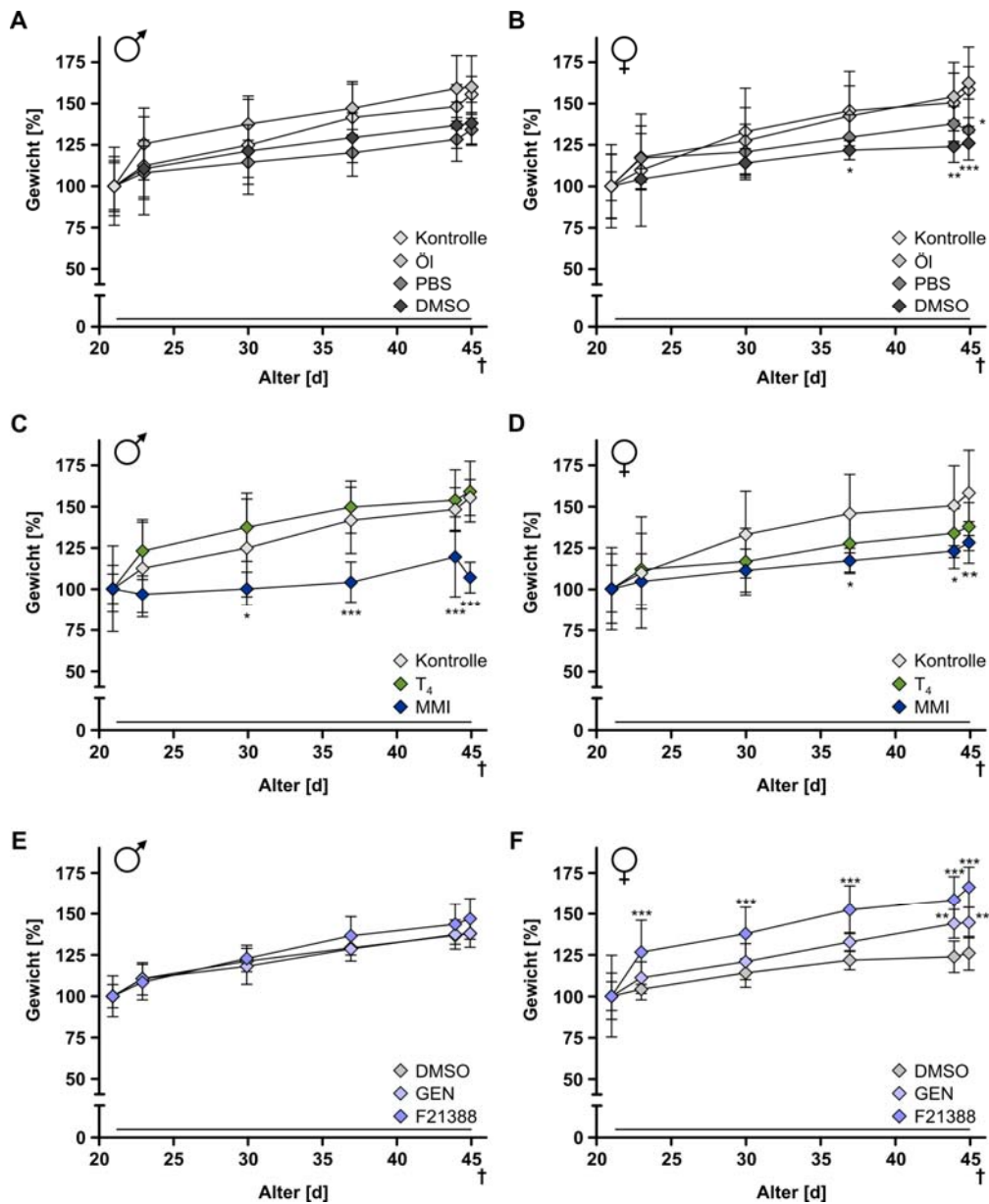


Abb. 35: Einfluss der Testsubstanzen auf das Wachstum im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Das über den Applikationszeitraum von 4 Wochen (schwarze Linie) detektierte Körpergewicht der Tiere wurde auf das Ausgangsgewicht der jeweiligen Gruppe bezogen. (A) In männlichen TR α KO-Tieren war kein Effekt der Lösungsmittelkontrollen nachweisbar. (B) In den weiblichen Negativkontrollen war ein reduziertes Körpergewicht nach DMSO-Behandlung festzustellen. (C, D) Unter den Referenz- und Testsubstanzen führte allein MMI/NaClO₄ (MMI) zu einem signifikant verminderten Wachstum (geschlechtsübergreifend). (E) Im Männchen zeigten GEN und F21388 kein unterschiedliches Gewicht im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. (F) In weiblichen Tieren führte GEN und F21388 zur Gewichtszunahme, letzteres bereits 3 Tage nach Behandlungsbeginn. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 10 Tieren pro Gruppe \pm SD ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Bonferroni-Post-Test).

3.5.2 Hormonelle Veränderungen der Hypophysen-Schilddrüsenachse

In TR α -Knockout-Tieren waren bei Gabe von GEN und F21388 die gemessenen Schilddrüsenparameter TSH, T₃ und T₄ nicht signifikant verändert, jedoch zeigte sich ein Trend zu reduzierten T₄-Spiegeln bei F21388 (Abb. 36).

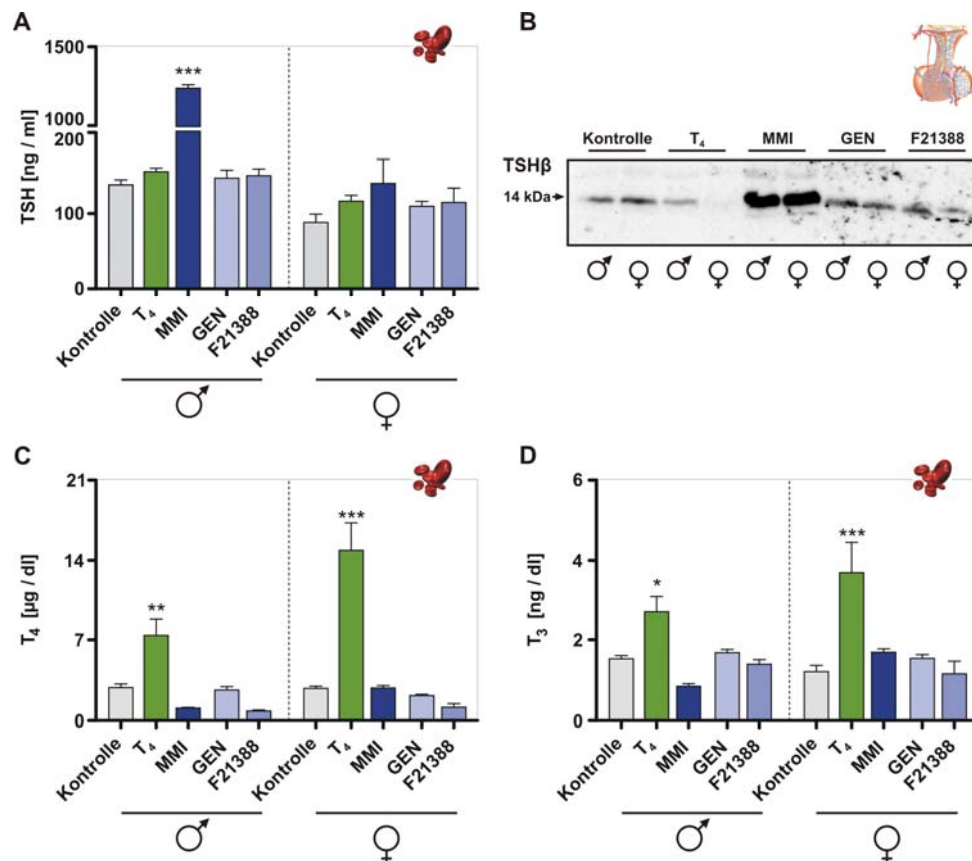


Abb. 36: Analyse des negativen Feedbacksystems im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Zur Analyse des negativen Feedbacks wurden im Serum die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T₄ und T₃ sowie die Expression von TSH β in der Hypophyse bestimmt. (A) Die Applikation von EACs führte zu keiner signifikanten Änderung der TSH-Serumwerte. MMI als Positivkontrolle wirkte stärker auf männliche als auf weibliche TR α -Knockout-Tiere. (B) Im der Western blot-Analyse zeigte die β -Untereinheit von TSH geschlechtsunabhängig eine starke Induktion allein durch MMI. Die Expression wurde nach T₄-Gabe nur im Weibchen stark reduziert. Die Applikation der Flavonoide hatte mit Ausnahme von F21388 in den Weibchen keinen Einfluss auf die exprimierte Proteinmenge. Die dargestellte Expression repräsentiert Gewebepools von 3 Hypophysen je Gruppe. (C, D) Die im gemessenen Serumkonzentrationen von T₄ (C) und T₃ (D) waren nach Injektion von T₄ im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe stark erhöht, wobei Serumwerte im Weibchen stärker anstiegen. Durch MMI/NaClO₄ (MMI) induzierte Hypothyreose zeigte nur in männlichen Tieren leicht reduzierte Serumkonzentrationen von T₄ und T₃. Die Applikation der Flavonoide führte in beiden Geschlechtern allein durch F21388 zu verminderter Serumkonzentrationen von T₄. Die zur Bestimmung der Serumkonzentration von TSH, T₄ und T₃ erhobenen Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 10 Tieren je Gruppe \pm SEM ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$; Dunnett's Test).

Unerwartet starke geschlechtsspezifische Effekte zeigten sich bei der Applikation von MMI, das einen besonders starken (8-fachen) Anstieg der TSH Serumwerte im Männchen induzierte, während in weiblichen Tieren keine signifikante Erhöhung der Serumkonzentration messbar war (Abb. 36 A). Dabei war die Proteinmenge von TSH β in der Hypophyse bei MMI Gabe geschlechtsunabhängig erhöht (Abb. 36 B). Allein im Weibchen bewirkte die Gabe von T₄ eine starke Reduktion der TSH β -Proteinmenge in der Hypophyse. Bei der Applikation gleicher Mengen von T₄ wurde die T₄-Serumkonzentration im Weibchen doppelt so stark erhöht wie im Männchen (Abb. 36 C). Gleiche Effekte waren für T₃ als Stoffwechselprodukt von T₄ nachweisbar. Die erhöhten T₄-Serumspiegel im Weibchen können damit als Ursache für die starken T₄-Effekte auf TSH β -Expression gewertet werden. Für die Analyse der Proteinexpression wurden jeweils gepoolte Proben jeder Gruppe aufgetragen und das Ergebnis in unabhängigen Tieren reproduziert.

3.5.3 Beeinflussung des Feedbacks in Hypothalamus und Hypophyse

Zur Untersuchung der Feedbackregulation in Hypothalamus und Hypophyse wurden mRNA-Spiegel von Hormonen und Enzymen bestimmt, die die Schilddrüsenaktivität regulieren. Im Hypothalamus sind dies Tshr, ppTrh, Thrb1 und Thrb2 (vgl. 1.1.2 und 1.1.5).

GEN steigerte im Hypothalamus nur die Expression von Tshr, die Änderungen waren jedoch nicht signifikant. Während nach Applikation von F21388 die TR β 1-Expression unverändert war, wurden ppTrh und Thrb2 signifikant und geschlechtsspezifisch induziert (Abb. 37 B, D). Diese Ergebnisse lassen auf einen geschlechts- und TR α -unabhängigen Effekt von F21388 auf die Feedbackregulation im Hypothalamus schließen. Bezüglich der Wirkung von MMI zeigte sich in den TR α -Knockout-Tieren ein konsistenter geschlechtsspezifischer Unterschied mit erhöhter Expression aller Zielgene bei weitgehend unveränderter Expression im Weibchen.

Auf Ebene der Hypophyse wurde die Expression von Trhr, Trhde, α Gsu und Tshb als Proteine mit zentraler Rolle in der Feedbackregulation untersucht. Dabei zeigte sich in der Hypophyse ein konsistenter Effekt auf die Expression von Tshb mit starker Induktion durch MMI, GEN und F21388 in beiden Geschlechtern, jedoch verstärkter Expression in Männchen (Abb. 38 D). F21388 wirkte zusätzlich allein in Männchen auf Trhr (Induktion) und Trhde (Repression) (Abb. 38 A, B). Der Effekt von T₄ ist konsistent

zwischen den Gruppen, während MMI allein in Männchen Trhr und α Gsu induziert (Abb. 38 A, C) und geschlechtsunabhängig zur einer Repression von Trhde führt (Abb. 38 B).

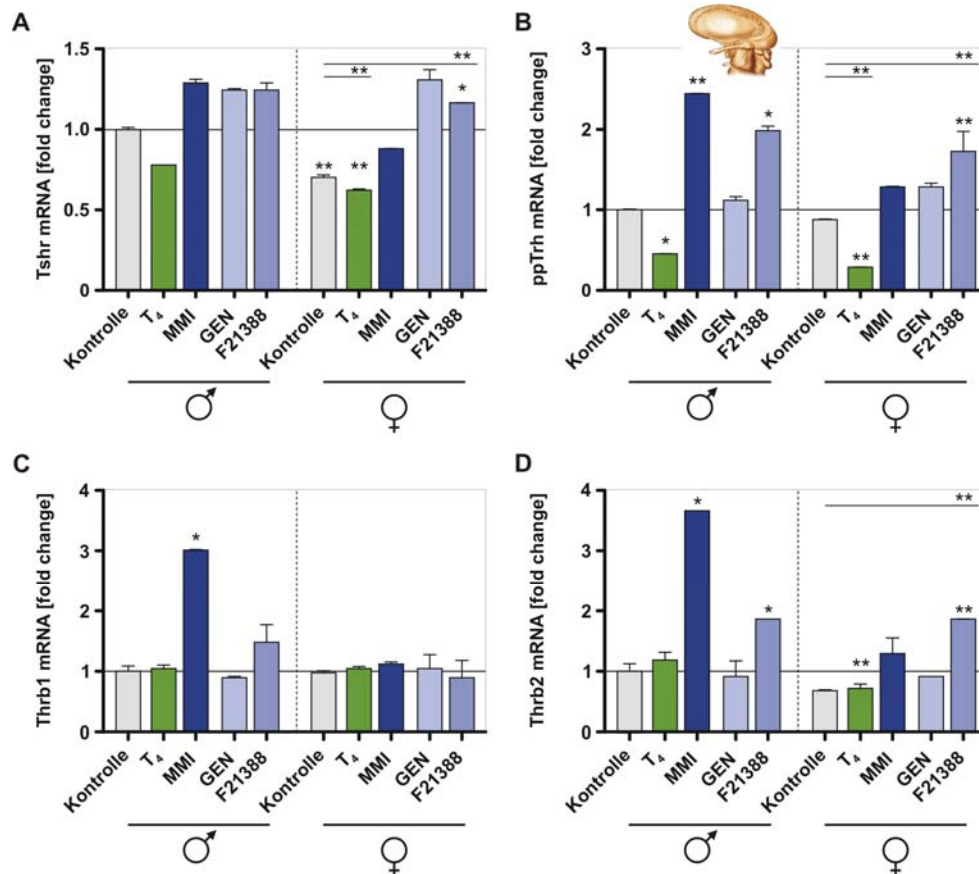


Abb. 37: Expressionsanalyse der hypothalamischen Feedbackregulation im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der männlichen Kontrollen bezogen und zusätzlich mit den weiblichen Kontrollen verglichen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Hyperthyreose (Behandlung mit T₄) bedingte bei beiden Geschlechtern eine reprimierte Expression der an der negativen Regulation des Feedbacks beteiligten Gene Tshr (A) und ppTrh (B). Durch Applikation von MMI/NaClO₄ (MMI) induzierte Hypothyreose führte in Männchen zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptlevel beider Gene, während die mRNA-Expression weiblicher Tiere unbeeinflusst blieb. GEN und F21388 bewirkten in Männchen und Weibchen eine Erhöhung des Expressionsniveaus. Die Expression von Trhb1 (C) und Trhb2 (D) blieb durch Applikation von T₄ unbeeinflusst, wurde durch MMI aber ausschließlich in Männchen signifikant erhöht. GEN zeigte keinen Einfluss, während das synthetische Flavonoid F21388 die Expression von Trhb2 erhöhte. Grundsätzlich war das basale Expressionsniveau aller Gene in den weiblichen Tieren niedriger als in den Männchen. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 4 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

Für DIO1 und DIO2, welche die Umwandlung von Schilddrüsenhormonen katalysieren, wurden parallel Expression und die Enzymaktivitäten bestimmt, die für beide Enzyme in allen Kombinationen von Behandlung und Geschlecht gut übereinstimmten

(Abb. 38 E - H). Ausnahme bildet in beiden Geschlechtern die starke reduzierte Expression von Dio1 durch MMI, während die Enzymaktivität unverändert blieb (Abb. 38 E, F). Besonders stark wurden Expression und Aktivität von Dio2 durch die EACs beeinflusst, gleichsinnig mit MMI. Dio1 wurde allein durch F21388 in Männchen konsistent induziert (RNA und Aktivität).

Im Hypothalamus zeigt sich damit ein TR α unabhängiger Effekt von EACs sowohl auf Rezeptoren und Enzyme der hormonellen Regulation der Schilddrüse.

3.5.4 Beeinflussung der Schilddrüse

Der Einfluss von EACs auf die Schilddrüse wurde sowohl morphologisch untersucht als auch auf Ebene der Genexpression unter besonderer Berücksichtigung des Iodidtransports und der Hormonbiosynthese.

3.5.4.1 Einfluss auf die Morphologie

Hypo- und Hyperthyreose führen zu charakteristischen strukturellen Veränderungen der Schilddrüse. Zur histologischen Analyse wurden HE-Färbungen bzw. immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten von 2 μ m Dicke angefertigt. Hyperthyreote Tiere zeigten gegenüber den Kontrollen vor allem im Randbereich des dargestellten Schilddrüsenlappens vergrößerte, mit einem flachen Epithel umgebene Follikelzellen. Hypothyreose bedingte eine deutliche Reduktion des Kolloidgehalts der Thyrozyten sowie eine Zunahme der Epithelzellhöhe mit verstärkter Bildung von Mikrovilli im apikalen Bereich. Der Schilddrüsenhormontransporter MCT8 wurde durch T₄ reprimiert und durch MMI induziert. Die Gabe von F21388 führte im Gegensatz zu GEN zu Zeichen einer Hyperthyreose mit reduzierter Expression von MCT8 und marginaler Vergrößerung der Follikel besonders im Männchen (Abb. 39).

Ergebnisse

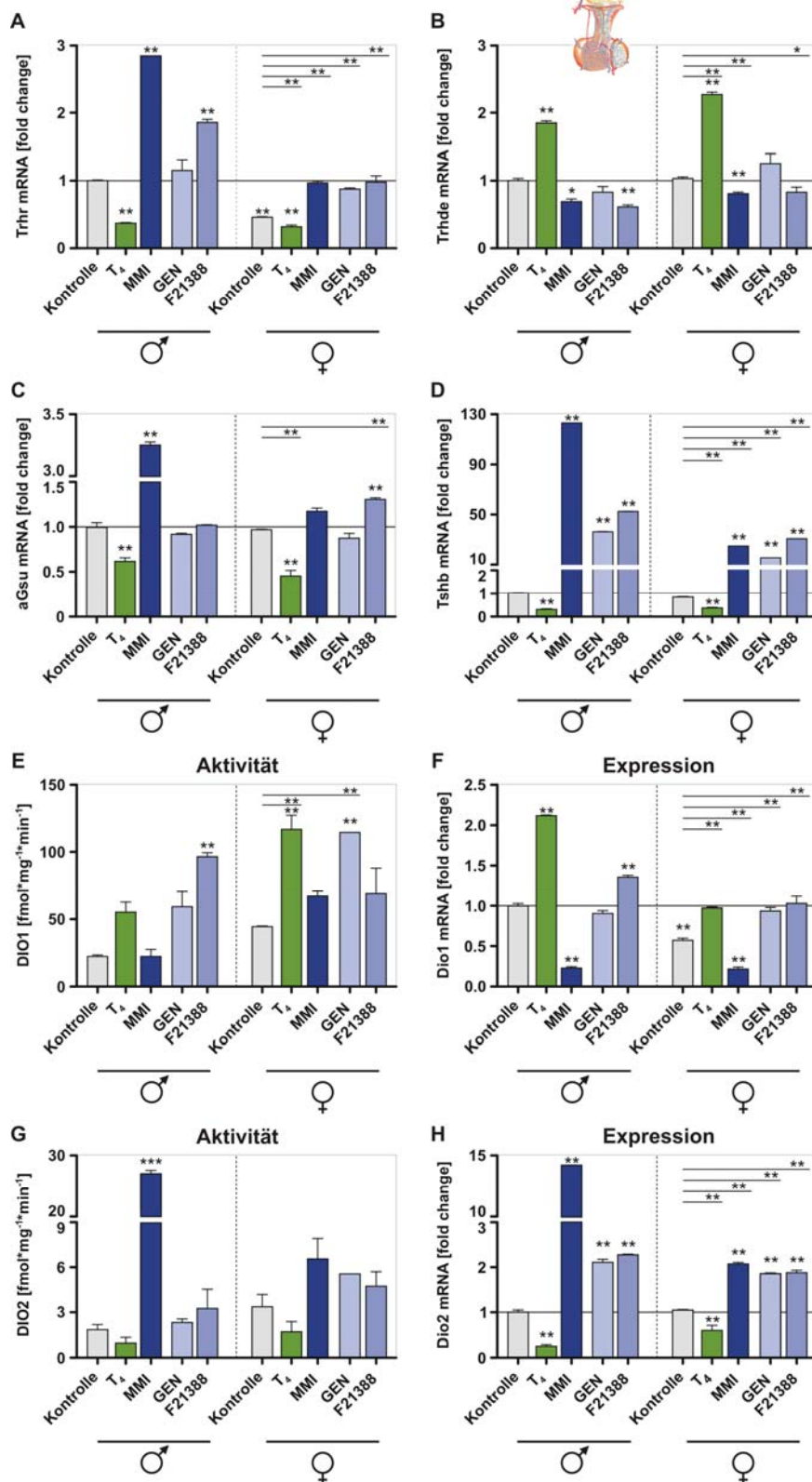


Abb. 38: Hypophysäre Feedbackregulation im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der männlichen Kontrollen bzw. zusätzlich auf das der weiblichen Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. (A) Die Expression von Trhr war in hyperthyreoten Tieren beider Geschlechter signifikant reduziert,

während Hypothyreose die Expression verstärkte. Die Testsubstanz GEN zeigte keinen Effekt, dagegen führte die Applikation von F21388 zu einer Erhöhung der Transkriptlevel. (B) Die Transkription von *Trhde* wurde entsprechend der für *Trhr* beschriebenen Veränderungen invers beeinflusst. Die mRNA-Expression von α Gsu (C) und *Tshb* (D) wurde durch Hyper- und Hypothyreose entsprechend der in der Literatur beschriebenen Modifikationen reguliert. Die Applikation der Testsubstanzen hatte dabei hauptsächlich auf die Expression von *Tsh β* einen mit hypothyreoten Tieren vergleichbaren Effekt. Die enzymatische Aktivität der 5'-Deiodasen zeigte nach Induktion von Hyper- bzw. Hypothyreose die erwarteten Effekte. Dabei führte die Applikation der Testsubstanzen zu einer Erhöhung der Deiodaseaktivität wie auch zu einer erhöhten mRNA-Konzentration der in der Hypophyse exprimierten Deiodasen (E - H). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 4 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf *Gapdh* (REST MCS). Die dargestellten Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 4 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$).

3.5.4.2 *Einfluss auf Iodidtransport und Schilddrüsenhormonbiosynthese*

Der Iodidtransport in der Schilddrüse wird durch TSH-R und die Transportproteine NIS und *Slc26a4* reguliert, die Hormonbiosynthese durch das Enzym TPO und durch TG (vgl. 1.1.3 - Abb. 1). Entsprechend wurde die Expression dieser Gene nach Applikation der Referenzsubstanzen und EACs in männlichen und weiblichen *TR α* -Knockouts verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Suppression aller betrachteten Gene durch beide Flavonoide, mit Ausnahme der unveränderten *Tshr*-Expression in GEN-behandelten Männchen und der geschlechtsunabhängig unveränderten Expression von *Tg* (Abb. 40). T_4 und MMI induzierten die erwarteten gegensätzlichen Expressionsveränderungen in allen betrachteten Genen, wobei die MMI-Effekte in Männchen und die T_4 -Effekte in Weibchen verstärkt waren.

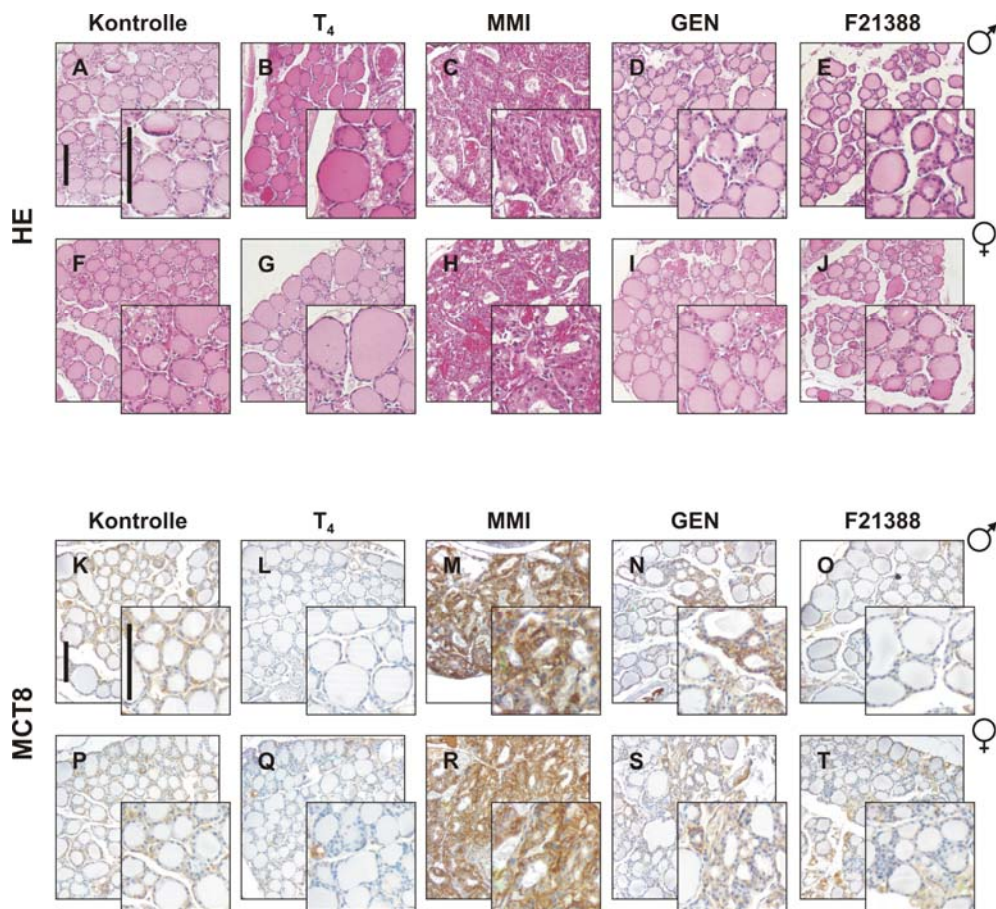


Abb. 39: Histologische Analyse der Schilddrüse im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Zur histologischen Analyse der Schilddrüse wurden HE-Färbungen bzw. immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten von 2 μm Dicke angefertigt. Das Geschlecht der Tiere hatte in den Kontrollen wie auch nach Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI/NaClO₄ (MMI) keinen Einfluss auf die Morphologie der Schilddrüsen (A - C, F - H). Die Kontrolltiere zeigten eine heterogene Verteilung aktivierter und ruhender Follikel bei durchschnittlicher Epithelzellhöhe. Hyperthyreote Tiere zeigten gegenüber den Kontrollen vor allem im Randbereich des dargestellten Schilddrüsenlappens vergrößerte, mit einem flachen Epithel umgebene Follikelzellen. Hypothyreose bedingte eine deutliche Reduktion des Kolloidgehalts der Thyrozyten sowie eine Zunahme der Epithelzellhöhe. Die Applikation der Testsubstanzen hatte in Männchen und Weibchen keinen Einfluss auf den morphologischen Phänotyp (D - E, I - J). Die immunhistochemische Analyse (K-T) von MCT8 zeigte nach Applikation von T₄ eine verminderte Expression des Schilddrüsenhormontransporters gegenüber den Kontrolltieren (L/Q gegen K/P). Hypothyreose bedingte eine deutlich verstärkte Färbung des membranständigen Proteins unabhängig vom Geschlecht (M, R). Im Gegensatz zu GEN zeigte F21388 reduzierte Expression von MCT8 (O gegen K). In den gezeigten Übersichtsfärbungen sind die Zellkerne blau gefärbt, während Proteine und Zytoplasma rosa erscheinen. In immunhistochemischen Färbungen wird die Expression des Zielgens durch einen spezifischen braunen Niederschlag angezeigt; die Größenbalken entsprechen 100 μm .

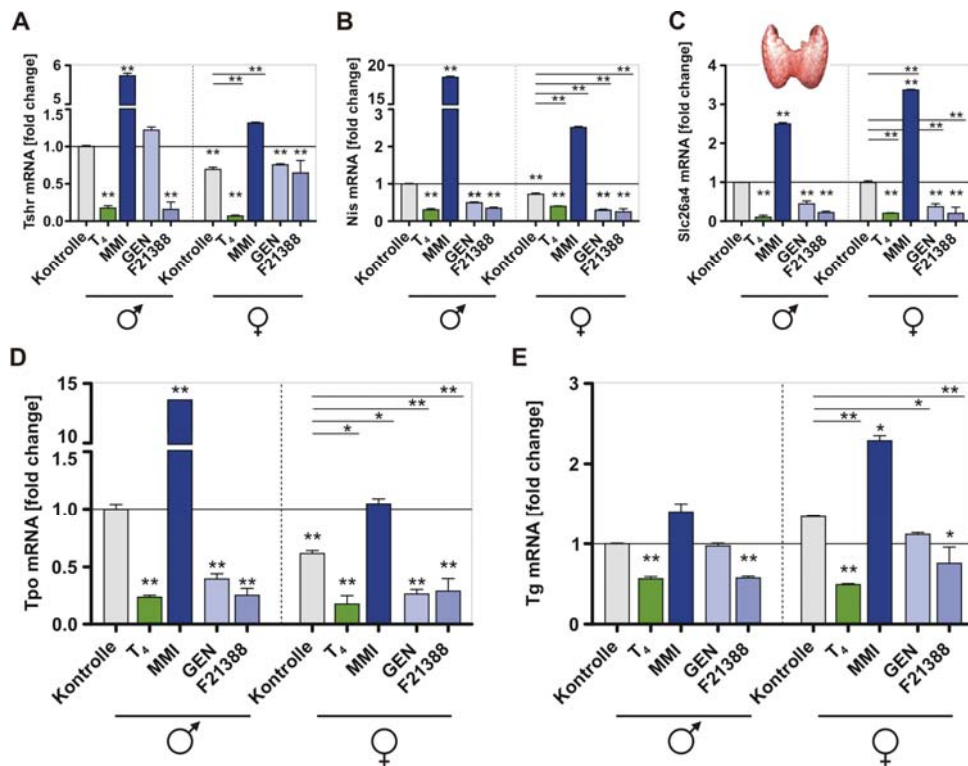


Abb. 40: Iodidtransport und Hormonbiosynthese im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der männlichen Kontrollen bzw. zusätzlich auf das der weiblichen Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Das Expressionsprofil der untersuchten Gene zeigte nach Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI/NaClO₄ (MMI) die erwarteten Modifikationen. (A) Nach Applikation der Testsubstanzen GEN und F21388 konnte lediglich durch das Flavonoid F21388 eine signifikante Reduktion der Tshr-Expression nachgewiesen werden. Die Expression von Nis (B), Slc26a4 (C) und Tpo (D) wurde durch Applikation der Flavonoide reprimiert. GEN hatte keinen Einfluss auf die Transkription von TG (E), während die mRNA-Expression durch F21388 signifikant reduziert wurde. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Actb ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$; REST MCS).

Schlüsselenzyme in der Schilddrüsenhormonbiosynthese sind die 5'-Deiodasen, deren Expression und Aktivität in der Schilddrüse in Abhängigkeit von Geschlecht und Behandlung bestimmt wurde. Für die Schilddrüse war keine DIO2-Aktivität nachweisbar (Daten nicht gezeigt) - konsistent mit publizierten Daten (Bianco et al. 2002). Die Aktivität der Dio1 (Abb. 41 A) wurde allein durch T₄ beeinflusst. Die Expression von Dio1 wurde ebenso wie deren Aktivität durch Applikation von T₄ reduziert, während MMI die Expression induzierte (Abb. 41 B). Die Regulation der Dio2 durch T₄ und MMI verlief entgegengesetzt der Dio1 (Abb. 41 C). Signifikante Effekte der EACs waren für Dio1 allein durch F21388 in Männchen nachzuweisen. Die Expression der Dio2 wurde sowohl von GEN als auch F21388 geschlechtsunabhängig induziert.

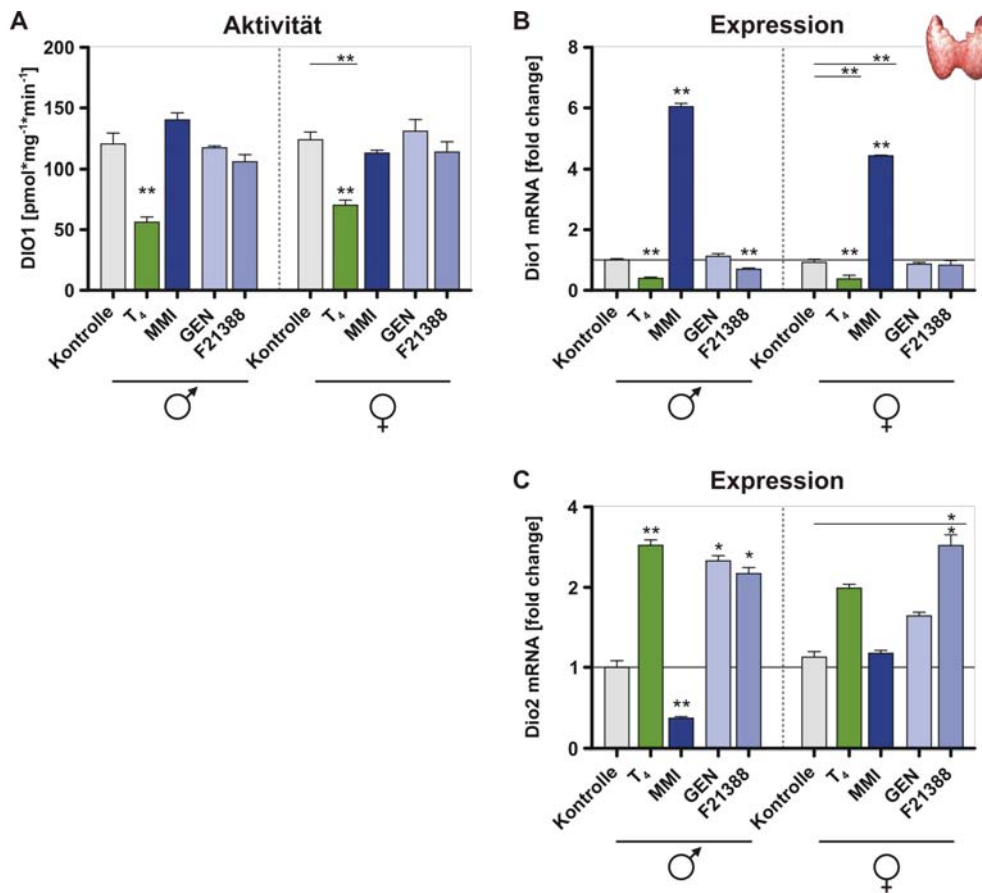


Abb. 41: Analyse der 5'-Deiodasen der Schilddrüse im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell. Zur Analyse der Deiodierungsreaktionen in der Schilddrüse wurde die enzymatische Aktivität der DIO1 sowie die Genexpression der 5'-Deiodasen Dio1 und Dio2 untersucht. (A) Im Deiodase-Assay wurde die enzymatische Aktivität der Dio1 bestimmt, die nach Applikation von T₄ unabhängig vom Geschlecht signifikant erniedrigt war. Hypothyreose durch MMI hatte ausschließlich in männlichen Tieren eine leichte Erhöhung der Deiodaseaktivität zur Folge, während weibliche Tiere unbeeinflusst blieben. Die Applikation der Testsubstanzen hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der DIO1. Diese Effekte wurden auch bei der Expressionsanalyse der Dio1 beobachtet, allerdings mit signifikanten Effekten der MMI behandelten Tiere (B). Die Expression der Dio2 zeigte nach Applikation der Testsubstanzen entsprechend der in hyperthyreoten Tieren beobachteten Veränderungen (T₄) erhöhte Transkriptlevel (C). Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf Actb (REST MCS). Die dargestellten Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 4 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

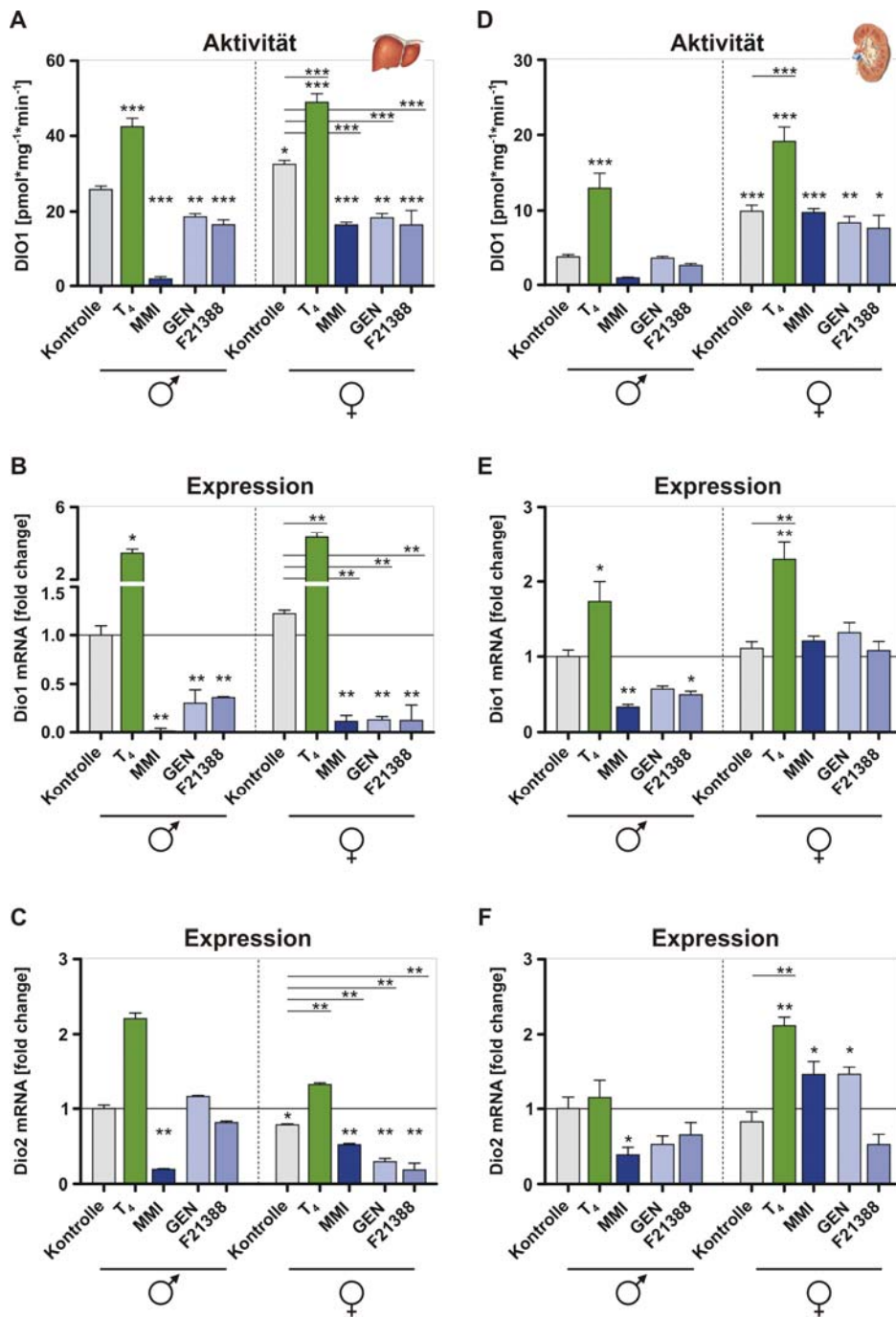


Abb. 42: Gewebespezifische Unterschiede der peripheren 5'-Deiodasen im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Die Abb. zeigt den Einfluss der Referenz- und Testsubstanzen auf die enzymatische Aktivität und die Genexpression der 5'-Deiodasen in Leber und Niere bezogen auf die Kontrolltiere. Die Applikation der Flavonoide GEN und F21388 hatte in Leber (A) und Niere (D) eine Reduktion der enzymatischen Aktivität zur Folge. Diese Effekte wurden auch durch die Genexpressionsanalyse der Dio1 abgebildet, allerdings hatte die Applikation der Flavonoide in der Niere keinen Einfluss auf die Genexpression (B, D). Die Applikation der Testsubstanzen hatte auf die Expression der hepatischen Dio2 in Männchen keinen Einfluss, während die Transkriptlevel in weiblichen Tieren signifikant reduziert waren. In der Niere konnte ausschließlich in den Weibchen ein Effekt der applizierten Flavonoide auf die Expression der Dio2 nachgewiesen werden. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA (REST MCS). Die dargestellten

Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 10 Tieren je Gruppe \pm SEM (Dunnett's Test; $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

3.5.1 Einfluss auf die T₃-regulierte Genexpression peripherer Organe

Nach den deutlichen Effekten der EACs auf die Genexpression der Schilddrüse wurden zur Vervollständigung der Analyse des Regelkreises auch die Effektororgane Leber und Niere betrachtet. Neben Enzymaktivität und Expression der Dio1 wurde auch die Regulation von Dio2, Thrb1 und Thrb2 auf Transkriptebene überprüft. In Leber und Niere wurde die erwartete Wirkung von T₄ und MMI auf die 5'-Deiodasen bestätigt (Abb. 42), wobei für MMI geschlechtsspezifische Unterschiede in der Niere, nicht jedoch in der Leber für DIO1 und 2 nachweisbar waren. Die Enzymaktivität der DIO1 entsprach nach Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI/NaClO₄ (MMI) mit Ausnahme der in weiblichen Nieren bestimmten Aktivität den in der Literatur beschriebenen Modifikationen (Bianco et al. 2002).

Die EACs reduzierten Dio1-Expression und Aktivität geschlechtsunabhängig in der Leber, während die Expression der Dio2 nur in Weibchen reduziert wurde. In der Niere, die generell geringere Aktivität und Expression von 5'-Deiodasen zeigte (Dio1-Aktivität im Vergleich zur Leber $< 25\%$ - Abb. 42 A, B und Expression $< 25\%$), waren die Effekte der EACs nicht nachweisbar.

Die Betrachtung der Schilddrüsenhormonrezeptoren Thrb1 und Thrb2 in der Leber zeigte nach Applikation von MMI die erwartete Induktion von beider Rezeptoren, während T₄ nur in männlichen TR α -Knockout-Tieren diesen stimulierenden Effekt bewirkte (Abb. 42). Im Gegensatz zu GEN induzierte auch F21388 die Expression beider T₃-Rezeptoren unabhängig vom Geschlecht.

3.6 Analyse von Hyper- und Hypothyreose in Wildtyp- und TR $\alpha^{0/0}$ -Mäusen

Nachdem in den Kontrollgruppen bei der Überprüfung der Wirkung von EACs deutliche Unterschiede in der Reaktion auf Substanzen zur Induktion von Hypo- und Hyperthyreose, zum Teil geschlechtsabhängig nachgewiesen wurden, wurden diese Effekte isoliert im Vergleich von Wildtyp und TR α -Knockout evaluiert. Nach Induktion von Hyper- und Hypothyreose durch chronische Applikation von T₄ und MMI wurde im

männlichen und weiblichen Knockout-Tieren sowie in den männlichen Kontrolltieren die Expression an der Feedbackregulation beteiligter Gene sowie die Enzymaktivität der DIO1 in Hypophyse und Leber verglichen (Abb. 44). Effekte, die allein über TR α vermittelt werden, sollten nur im Wildtyp nachzuweisen sein. Für die betrachteten Gene war dies allein für die Expression von Tshb und Dio1 in der weiblichen Hypophyse der Fall (Abb. 44). In der Leber war Dio1 Aktivität ohne Behandlung nur marginal aber signifikant erhöht, anders als die stark induzierte Genexpression im TR α -Knockout (Abb. 44 C, D). Allein MMI-behandelte Weibchen zeigten nur eine gering reduzierte DIO1-Aktivität (Abb. 44 C). Die Induktion der Hyperthyreose durch T₄ zeigte einen Effekt auf die Expression von Thrb1 und Thrb2, die bereits unter Basalbedingungen im Knockout induziert sind (Abb. 44 E, F). Diese Induktion wird mit T₄ allein im Männchen signifikant (> 3-fach) erhöht.

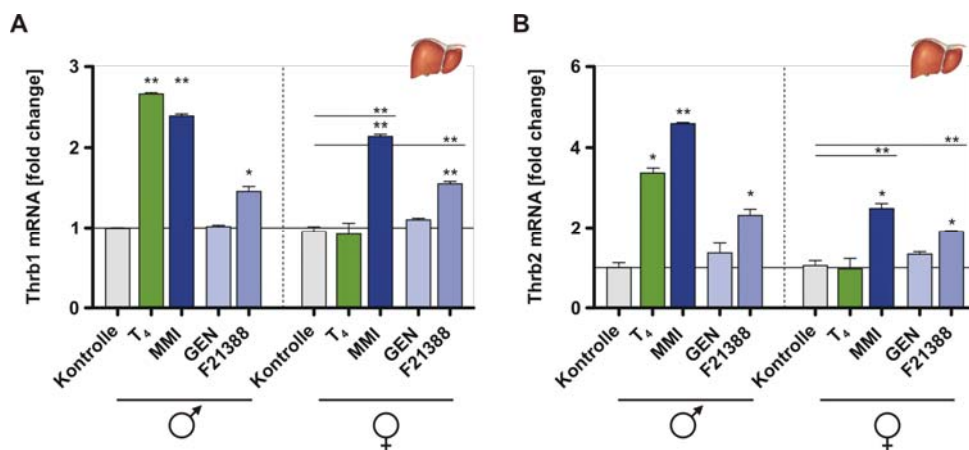


Abb. 43: Hepatische Genexpression von Thrb1 und Thrb2 im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Die hepatische Expression von TR β 1 (A) und TR β 2 (B) war in hyperthyreoten Männchen signifikant erhöht, während weibliche Tiere keine Veränderungen des basalen Expressionsniveaus nach Applikation von T₄ zeigten. Hypothyreose wie auch die Applikation von F21388 führten in beiden Geschlechtern zu einer verstärkten Expression beider Schilddrüsenhormonrezeptoren. GEN zeigte keinen Einfluss auf die TR-Expression. Die mittels qPCR erhobenen Daten zur Analyse der Genexpression wurden auf das Expressionsniveau der männlichen Kontrollen bzw. zusätzlich das der weiblichen Kontrollen bezogen. Dabei entspricht die basale Expression des Zielgens dem relativen Wert 1. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 6 Tieren je Gruppe \pm SEM nach Normalisierung auf 18SrRNA ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$; REST MCS).

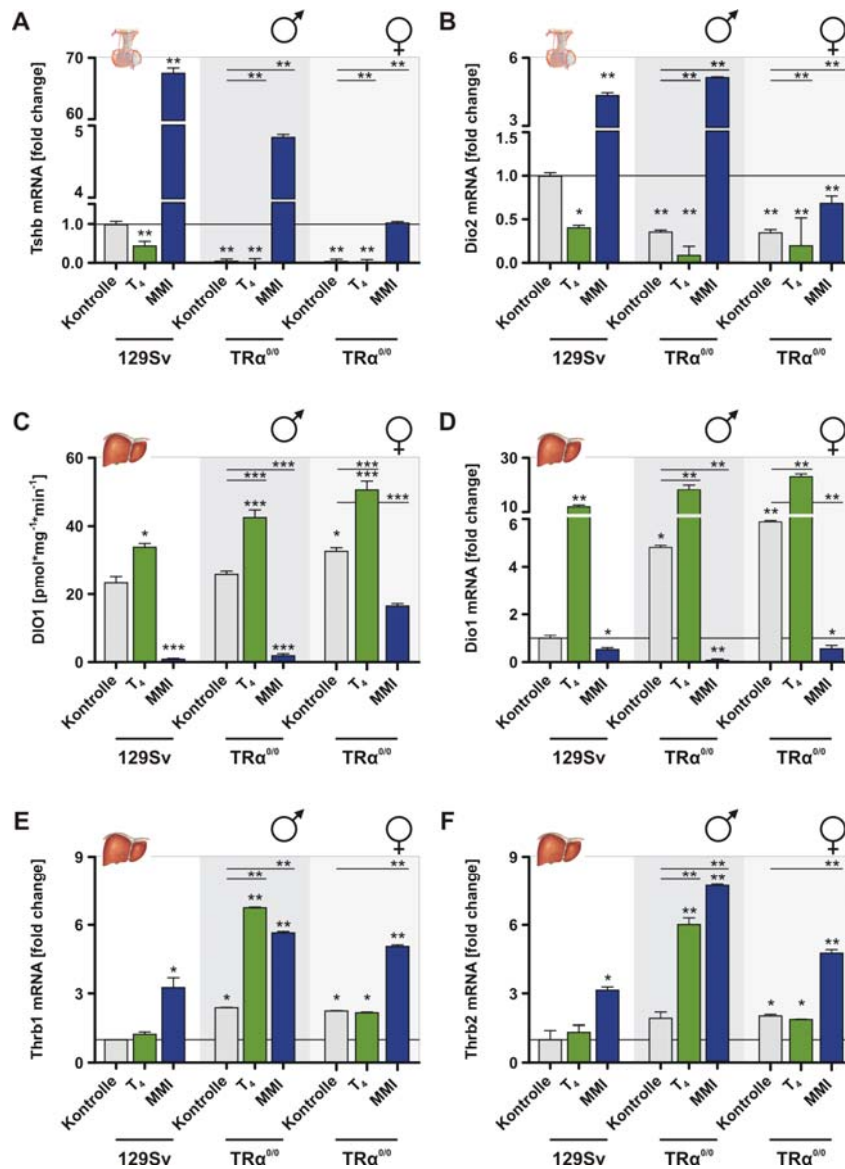


Abb. 44: Vergleichende Analyse von Wildtyp und TRα^{0/0}-Modell nach Induktion von Hyper- und Hypothyreose.

In den Hypophysen der Wildtypen wurde gegenüber den Knockout-Tieren ein höheres basales Expressionsniveau von Tshb (A) und Dio2 (B) nachgewiesen, das auch nach Induktion von Hyper- und Hypothyreose erhalten blieb. Die männlichen Knockout-Tiere reagierten dabei wesentlich sensibler auf Hyper- und Hypothyreose als die weiblichen Tiere. Bereits die basale hepatische Enzymaktivität und Transkriptlevel der Dio1 (C, D) waren in der Kontrollgruppe im Knockout-Modell erhöht. Weibliche Tiere reagierten weniger sensitiv als Knockout-Männchen auf die Applikation von MMI. Das basale Expressionsniveau der an der Regulation der Deiodasen beteiligten Gene Thrb1 (E) und Thrb2 (F) war im Knockout-Modell gegenüber dem Wildtyp signifikant erhöht. Dieser Unterschied wurde in hypothyreoten Tieren noch verstärkt. Allein in hyperthyreoten Knockout-Männchen war die Expression von Thrb1 und Thrb2 signifikant erhöht. Angegeben sind die mittleren Expressionsunterschiede von jeweils 5 - 6 Tieren je Gruppe ± SEM nach Normalisierung auf Gapdh bzw. 18SrRNA (REST MCS). Die dargestellten Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 5 - 10 Tieren je Gruppe ± SEM (Dunnett's Test; p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***).

4 Diskussion

Schilddrüsenhormone beeinflussen Entwicklung, Differenzierung und Wachstum und spielen darüber hinaus auch im adulten Organismus von Vertebraten eine zentrale Rolle in Bezug auf die Regulation von Energiestoffwechsel und Thermogenese und sind insbesondere für die Adaptation des Metabolismus an exogene Einflüsse durch Aufrechterhaltung der Homöostase unverzichtbar. Chronische Veränderungen des Schilddrüsenhormonstatus führen zu klinisch manifesten Funktionsstörungen der Schilddrüse bzw. der Schilddrüsenhormonachse, einschließlich neurologischer und psychischer Symptome, die zwar beim Erwachsenen durch entsprechende Medikation behandelt werden können, während der Entwicklung jedoch bei chronischem Schilddrüsenhormonmangel zu irreversiblen Schädigungen des ZNS mit geistig eingeschränkter Leistungsfähigkeit sowie Organfehlbildungen führen können (Joffe und Sokolov 1994; Laureno 1996; Radetti et al. 2002).

Das Gefährdungspotential hinsichtlich der Störung hormoneller Netzwerke, welches von exogenen Substanzen natürlichen oder synthetischen Ursprungs ausgeht, wurde bislang primär in Bezug auf die gonadotrope Achse untersucht (Naciff und Daston 2004). Initial wurde eine verstärkte Feminisierung verschiedenster aquatischer Lebewesen beobachtet, die auf die östrogene Wirkung von EACs zurückgeht und daher die genetisch fixierte primäre Geschlechtsdifferenzierung irreversibel verändern kann. Jedoch ist auch die Feedbackregulation der thyreotropen Achse durch Interferenzen mit EACs betroffen, da exogene Substanzen nicht nur über TRs die Expression T_3 -regulierter Gene beeinflussen, sondern auch direkt mit der Biosynthese von Schilddrüsenhormonen interferieren können (Naciff und Daston 2004; Zoeller 2005; Köhrle 2008). Unter Berücksichtigung des möglichen teratogenen Potentials sind zur Beurteilung der humanrelevanten Toxizität von EACs sorgfältige Analysen zum Wirkmechanismus sowie detaillierte Informationen zu Biotransformation und Bioakkumulation der oftmals lipophilen Substanzen erforderlich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung möglicher Interaktionen ausgewählter EACs mit der thyreotropen Achse, wobei die Analyse von gewebespezifischen Effekten der Testsubstanzen und deren Einfluss auf die Feedbackregulation im Vordergrund standen. Dabei wurde insbesondere das Wirkpotential des UV-Filters 4-MBC, dessen transdermale Aufnahme und Biotransformation durch Bildung glucuronidierter Kampferderivate nach äußerlicher

Anwendung in Probanden beider Geschlechter nachgewiesen wurde, abhängig von der Expositionszeit in ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten untersucht (Janjua et al. 2004; Völkel et al. 2006). Darüber hinaus wurde die seit den 60er Jahren bekannte thyroidale Wirkung des Isoflavonoids GEN, das bei inadäquater Iodversorgung die Strumabildung begünstigt, in TR α -defizienten Tieren hinsichtlich einer möglichen Rezeptorinteraktion sowie geschlechtsspezifischer Effekte auf die Regulation des Feedbacks und die Biosynthese von Schilddrüsenhormonen sowie deren Metabolismus analysiert (Hydovitz 1960; Divi und Doerge 1996).

4.1 Charakterisierung der HPT-Achse in der ovariectomierten Ratte

Neben Schilddrüsenhormonen, deren essentielles Vorhandensein bereits in 1.1.1 erläutert wurde, spielen Östrogene in Zusammenhang mit anderen Steroidhormonen eine außerordentlich wichtige Rolle bei der Regulation von Entwicklung, Wachstum und Differenzierung sowie bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Metabolismus (Hall et al. 2001). Die Interaktion der beiden hormonellen Achsen ist durch den Einfluss von Östrogenen auf die Pathophysiologie der Schilddrüse mit einer höheren Inzidenz von Schilddrüsenerkrankungen bei Frauen in der Literatur umfassend dokumentiert (Barbesino et al. 1998; Kumar et al. 1999; Knudsen et al. 2002b).

Die ovariectomierte Ratte stellt ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung dieser Prozesse dar und dient darüber hinaus als anerkanntes Modell zur Analyse exogener Substanzen und ihrer Wirkung auf die gonadotrope bzw. thyreotrope Achse (Cho et al. 2003). Gegenüber intakten Tieren zeichnen sich ovariectomierte Tiere aufgrund des fehlenden Stimulus durch Östrogene und damit verbunden reprimierter Pulsgeneration der GnRH-Neuronen im MBH durch erhöhte LH-Konzentrationen mit gesteigerter Pulsamplitude sowie ansteigende FSH-Konzentrationen im Serum aus (Maeda et al. 1989; Shupnik et al. 1988). Ferner werden nach Ovariectomie verminderte Serumkonzentrationen von Prolaktin nachgewiesen (Parkening et al. 1982).

Darüber hinaus beschreiben Biro et al. nach bilateraler Ovariectomie bzw. Hysterektomie eine Reduktion der TSH-Konzentration im Serum, die auf verringerte Konzentrationen der endogenen E₂-Spiegel zurückzuführen ist (Biro et al. 1984). Neben Schilddrüsenhormonen beeinflussen auch Östrogene über transkriptionelle und posttranskriptionelle Modifikationen die Expression von TRH-R und nehmen somit

direkt Einfluss auf die Sekretion von TSH und damit auf die hypophysäre Regulation des Feedbacks der thyreotropen Achse (Lean et al. 1977; Kimura et al. 1994). Des Weiteren beeinflussen Östrogene auch die Terminierung dieses Signals, indem sie die mRNA-Synthese der Aminopeptidase Trhde hemmen und somit die Spaltung von TRH unter Freisetzung des Pyroglutamylrestes reprimieren (Schomburg und Bauer 1997). In den folgenden Abschnitten wird die Eignung des verwendeten Tiermodells zur Charakterisierung östrogenen bzw. thyroidalen Effekte durch Substitution mit E₂ sowie durch Applikation thyreomimetischer und thyreostatischer Referenzsubstanzen diskutiert.

4.1.1 E₂ als Referenzsubstanz in ovariectomierten Ratten

Der Vergleich unbehandelter ovariectomierter Kontrolltiere mit E₂-substituierten Tieren erlaubt zum einen eine Beurteilung der applizierten Testsubstanzen hinsichtlich ihrer östrogenen Wirkungsweise und zum anderen eine erste Einschätzung ihres endokrinen Potentials in Bezug auf die thyreotrope Achse. Entsprechend den in der Literatur beschriebenen Werten wird nach Substitution mit E₂ durch den positiven Stimulus auf die hypophysäre Gonadotropinfreisetzung parallel zur Senkung der LH-Konzentration in der Zirkulation eine Erhöhung der Serumkonzentration von Prolaktin erwartet (Sarkar et al. 1984; Cagampang et al. 1991). Die thyreotrope Achse betreffend werden in der Literatur nach Substitution mit E₂ im Vergleich zu den Basalwerten ovariectomierter Tiere, abhängig vom Versuchsaufbau, variable Effekte auf die Serumkonzentration von TSH wie auch auf die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T₄ und T₃ beschrieben. Dabei haben das Alter der Tiere, die Konzentration des Substituts wie auch die Applikationsdauer einen erheblichen Einfluss auf die Ausprägung der Effekte (Chang et al. 1989). Neben einer leichten bis signifikanten Erhöhung der TSH-Konzentration im Serum, die in den Literaturdaten konsistent ist, variieren die publizierten Effekte von E₂ auf die Serumkonzentrationen von T₄ und T₃ erheblich (Seidlova-Wuttke et al. 2005; Lima et al. 2006; Bottner et al. 2006).

In den Versuchen zur chronischen Applikation wurde E₂ als 17β-Estradiol-3-benzoat (E₂B) mit einer Konzentration von 16,25 mg/kg Futter in Form eines speziell pelletierten Futtermittels über einen Zeitraum von 12 Wochen oral verabreicht. Die mittels RIA bestimmte Serumkonzentration von LH zeigte die erwartete Reduktion der Serumwerte auf ≤ 50 % der basalen Konzentration ovariectomierter Tiere (Daten nicht gezeigt)

(Seidlova-Wuttke et al. 2006). Dagegen hatte die orale Applikation von E₂B mit einer Konzentration von 600 µg/kg b.w. *per gavage* keinen Effekt auf die Serumspiegel von LH, zeigte aber nach subakuter Applikation eine um Faktor 3,7 erhöhte Prolaktinkonzentration im Serum (Abb. 13 A, B). Im Vergleich zu einer Studie, die bei identischem Versuchsaufbau das speziell für die orale Anwendung entwickelte Derivat 17β-Estradiol-valerat (E₂V) verwendete, wurde nach subakuter Applikation trotz des beschriebenen schwächeren Effekts auf die Gonadotropinsekretion eine signifikante Reduktion der LH-Konzentration festgestellt (Jarry et al. 2004; Rossmanith et al. 1994). Somit lässt sich aufgrund des erhöhten Uterusgewichts der Tiere sowie der erhöhten Serumkonzentration von E₂ mit 88 pg/ml gegenüber der ovariectomierten Kontrolle mit 11 pg/ml einerseits eine höhere Sensitivität des Uterus im Vergleich zum ZNS gegenüber E₂ annehmen und andererseits eine möglicherweise grenzwertige Dosis für den gewählten Applikationszeitraum vermuten (Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Studien zeigen, dass die *per orale* Aufnahme von E₂B bei einer Konzentration von 400 µg/kg b.w. erst nach einem Applikationszeitraum von 14 Tagen zu einer 50 %igen Senkung der LH-Konzentration führte (Frau Dr. F. Götz, persönliche Kommunikation). Darüber hinaus sind Unterschiede bezüglich der Galenik steroidmetabolisierender hepatischer Enzyme denkbar.

Konsistent mit den von Bottner et al. publizierten Daten, wurde nach chronischer Applikation von E₂ eine Erhöhung der Serumkonzentrationen von TSH und T₄ gegenüber den ovariectomierten Kontrolltieren festgestellt, während die Konzentration von T₃ in der Gruppe phytoöstrogenarm ernährter Tiere unverändert blieb (Bottner et al. 2006). Des Weiteren zeigten die ovariectomierten Kontrollen der Sojagruppe gegenüber den sojafrei gehaltenen Kontrolltieren bei unveränderten basalen Konzentrationen von TSH nach chronischer Exposition eine signifikante Reduktion der T₄-Konzentration im Serum (Abb. 6 A, B). Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine Hemmung der TPO durch das in Soja enthaltene Isoflavonoid GEN und somit auf eine verminderte Schilddrüsenhormonbiosynthese zurückzuführen, allerdings ohne dabei Einfluss auf die Serumkonzentration von TSH zu nehmen. Abhängig von Tiermodell, Versuchsaufbau oder Studiendesign werden in der Literatur sehr unterschiedliche Wirkungen von Soja oder dem anteilig stärksten Isoflavonoid GEN auf die Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T₄ und T₃ beschrieben. Neben Untersuchungen, die unabhängig vom Geschlecht trotz 80 %iger Hemmung der TPO-Aktivität unveränderte Konzentrationen der Schilddrüsenhormone in der Zirkulation feststellten, zeigten weitere Analysen männlicher Tiere unabhängig von Alter und

Applikationszeitraum reduzierte T_4 -Konzentrationen im Serum (Mitsuma et al. 1998; Chang und Doerge 2000; Klein et al. 2000; Doerge und Sheehan 2002). Zudem ist die nach chronischer Exposition beobachtete Reduktion der T_4 -Konzentration auch mit den in der Literatur publizierten Daten im Hinblick auf eine veränderte hepatische Konjugation von T_4 kompatibel (White et al. 2004). Studien pre- und postmenopausaler Frauen zeigen abhängig von der Zyklusphase (luteale Phase) verminderte Serumkonzentrationen von T_4 , während postmenopausale Frauen nach chronischem Sojakonsum moderate Veränderungen der Serumparameter der thyreotropen Achse aufweisen (Duncan et al. 1999a; Duncan et al. 1999b; Bruce et al. 2003). Somit scheint die Aufnahme von Soja über die Nahrung auch bei ausreichender Iodversorgung unabhängig von der Konzentration endogener Östrogene die Konzentration von Schilddrüsenhormonen in der Zirkulation zu beeinflussen, da beide Geschlechter reduzierte T_4 -Konzentrationen im Serum aufwiesen. Erst nach dem Eintreten der Menopause, bedingt durch den Verlust der ovariellen Steroidsynthese, kommt es bei sinkender E_2 -Konzentration im Serum zu Veränderungen der Responsivität gegenüber Soja oder GEN, die sich jedoch im Tiermodell der ovariectomierten Ratte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht abbilden lassen. Die Substitution mit E_2 hatte in der Sojagruppe keinen Effekt auf die TSH-Konzentration, wohingegen die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum durch E_2 nach einem Applikationszeitraum von 12 Wochen deutlich erhöht war (Abb. 6 A - C). Emerson et al. beschreiben nach Ovariectomie eine Zunahme der Bindungskapazität von TTR gegenüber T_4 , die jedoch nach Substitution mit E_2 aufgrund der hohen zirkulierenden E_2 -Konzentrationen abnimmt (Emerson et al. 1990). Unter diesen Bedingungen wäre bei einem verhältnismäßig hohen Anteil an freiem T_4 nach peripherer Deiodierung eine Erhöhung der T_3 -Konzentration im Serum zu erwarten.

Entsprechend der Ergebnisse nach chronischer Applikation konnte bei Substitution mit E_2 nach subakuter Applikation eine marginale Zunahme der Serumkonzentrationen von TSH und T_4 festgestellt werden, während die T_3 -Konzentration bei signifikant reduziertem Körpergewicht nicht mit den zuvor beschriebenen Analysen korrelierte (Abb. 13 C; Abb. 14 A, B). Neben verminderter Fettsäuresynthese und verstärkter Lipolyse nach exogener Zufuhr von E_2 führt das Absinken der Leptinkonzentration bei reduzierter Nahrungsaufnahme zu Veränderungen der hypothalamischen Genregulation und nachfolgend zu einer Reduktion der T_3 -Konzentration im Serum (Hansen et al. 1980; Harris et al. 2001).

Eine abschließende Betrachtung dieser Untersuchungen zeigt, dass aufgrund der heterogenen Ergebnisse nach Substitution von E_2 auch eine initiale Einschätzung zur östrogenen Wirkung der im weiteren Verlauf dieser Arbeit diskutierten Testsubstanzen auf die thyreotrope Achse schwierig ist und somit das Mitführen geeigneter Kontrollen zur Interpretation thyreomimetischer bzw. thyreostatischer Effekte unumgänglich macht.

4.1.2 T_4 und MMI als Referenzsubstanzen in ovariectomierten Ratten

Zur Charakterisierung und Klassifizierung möglicher thyreomimetischer bzw. thyreostatischer Effekte wurden auf die bekannten Interaktionen von gonadotroper und thyreotroper Achse Bezug nehmend ovariectomierte Ratten verwendet, die zudem eine Untersuchung des Wirkprofils unter Ausschluss zyklusbedingter Schwankungen erlauben (Cho et al. 2003). Bei der Auswahl der Referenzsubstanzen wurde Folgendes berücksichtigt: Die Induktion einer Hyperthyreose erfolgte durch Applikation von T_4 , das gegenüber T_3 die Analyse des Schilddrüsenhormonmetabolismus erlaubt, während die Erzeugung hypothyreoter Tiere durch Applikation des Thyreostatikums MMI erfolgte. Im Vergleich zu anderen in der Klinik eingesetzten Thyreostatika wie PTU oder Iopansäure wirkt MMI bei einer Halbwertszeit von 6 Stunden ausschließlich durch Hemmung der TPO auf die Schilddrüsenhormonbiosynthese, während PTU beispielsweise auch die intrathyroidale bzw. periphere Konversion von T_4 zu biologisch aktivem T_3 inhibiert (Rondeel et al. 1992; Sugawara et al. 1999). Darüber hinaus werden MMI auch antioxidative und immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben, die erstmals nach Behandlung von Basedow-Patienten beschrieben wurden (Kim et al. 2001).

Die über einen Behandlungszeitraum von 10 Tagen durch Applikation von T_4 herbeigeführte Hyperthyroxinämie hatte neben einer isolierten Erhöhung der T_4 -Konzentration, die auf die exogene Gabe des Substituts zurückzuführen ist, eine Reduktion der Serumkonzentration von TSH zur Folge, während T_3 unbeeinflusst blieb (Abb. 9 A - C). Die vorliegende Serumanalyse bestätigte einerseits die Wirksamkeit der gewählten T_4 -Konzentration zur Induktion einer Hyperthyreose und zeigt weiterhin, dass zellulär gebundenes T_4 dem Absinken der Serumkonzentration zunächst entgegenwirkt und somit das Niveau der basalen Konzentration ovariectomierter Kontrollen aufrechterhält (Chanoine et al. 1993; Yamada et al. 1996).

Die morphologische Analyse der Schilddrüsen spiegelte die Veränderungen der Serumparameter dahingehend wieder, dass vor allem im Randbereich der Schilddrüsen im Vergleich zu euthyreoten Kontrollen vergrößerte, mit einem flachen Epithel umgebene Follikel nachgewiesen wurden (Abb. 10 A), was mit den reduzierten TSH-Konzentrationen sowie den erhöhten Serumkonzentrationen von T_4 unter hyperthyreoten Bedingungen korreliert (Kronenberg et al. 2007). Entsprechend zeigte die Expressionsanalyse von *Tshr* bei minimaler Stimulation durch TSH reprimierte Transkriptlevel nach Applikation von T_4 (Abb. 10 B). Selbst bei ausbleibendem Stimulus in Abwesenheit von TSH wird eine basale Aktivierung der Adenylatzyklase inklusive nachfolgender Signaltransduktion über cAMP und Proteinkinase A (PKA) nachgewiesen, um die Expression der an Iodidtransport und Schilddrüsenhormonbiosynthese beteiligten Gene und somit die Differenzierung des Thyrozyten zu erhalten (Laugwitz et al. 1996). Darüber hinaus wurde die unter direktem Einfluss von TSH stehende Expression von *NIS* reprimiert, während in Übereinstimmung mit der Literatur eine inverse Korrelation von TG auf Protein- und Transkriptebene festgestellt wurde (Abb. 10 C - F), da inhibitorische Elemente im N-terminalen Bereich des follikulären TG offenbar als autokrine Regulatoren über die Transkriptionsfaktoren TTF-1, TTF-2 und Pax8 die Transkriptlevel von *Tshr*, *Nis*, *Tpo*, *Duox1/2* wie auch *Tg* selbst beeinflussen (Suzuki et al. 1999; Dunn und Dunn 2001; Suzuki und Kohn 2006).

Die Serumanalyse der MMI-behandelten Tiere bestätigte mit einer Erhöhung der TSH-Konzentration sowie reduzierten Konzentrationen der Schilddrüsenhormone in der Zirkulation zum einen die Wirkung des applizierten Thyreostatikums und andererseits die Wahl der Expositionszeit (Abb. 9 A - C), wobei die Wirkung von MMI auf die thyreotrope Achse erstmals von Mackenzie et al. beschrieben wurde (Mackenzie et al. 1941; Mannisto et al. 1979). Bedingt durch den Mangel an Schilddrüsenhormonen zeigte die morphologische Analyse mit einer Reduktion des Kolloidgehalts sowie Zunahme der Epithelzellhöhe im apikalen Bereich das klassische Bild einer hypothyreoten Schilddrüse (Abb. 10 A). Infolge der gestörten Homöostase waren neben morphologischen Veränderungen der Schilddrüse auch Effekte auf die Expression Biosynthese-assoziiierter Gene zu erwarten. Entsprechend induzierte die TSH-stimulierte Transkription von *Tshr* über cAMP/PKA den Iodidtransport wie auch die Expression an der Biosynthese von T_4 und T_3 beteiligter Gene an der apikalen Seite der Zellmembran (Abb. 10 C - F). Bei hohen Serumkonzentrationen von TSH werden insbesondere die an Proliferation und Angiogenese beteiligten Prozesse nicht

ausschließlich über cAMP/PKA vermittelt, sondern zusätzlich über G_q/G_{11} -gekoppelte Aktivierung des Phosphoinositol-Signalweges (Laurent et al. 1987; Raspe et al. 1991).

Die in Abb. 11 dargestellte vergleichende Analyse des deiodierenden Stoffwechsels zeigt nicht nur die in 1.1.4 beschriebenen gewebespezifischen Unterschiede der Deiodasen, sondern ermöglicht darüber hinaus auch die Charakterisierung der auf Transkript- bzw. Proteinebene auftretenden Modifikationen in Hyper- und Hypothyreose sowie assoziierten Erkrankungen. Des Weiteren erlaubt die Korrelation der Genexpression einen Vergleich der gewebespezifischen Expressionsstärken beider 5'-Deiodasen in den untersuchten Organen. Den derzeit publizierten Daten entsprechend zeigte die Transkriptanalyse der Dio1, die sowohl 5- als auch 5'-Deiodierungsreaktionen katalysiert, in der Schilddrüse wie auch in den peripheren Organen Leber, Niere und Herz ein vergleichsweise hohes Expressionsniveau, während im ZNS bzw. in der Hypophyse gegenüber Dio2 wesentlich geringere Transkriptlevel nachgewiesen wurden (Visser et al. 1982; Köhrle 2002). In den Hypophysen der hyperthyreoten Tiere wurde eine verstärkte Expression der unter positiver Feedbackkontrolle stehenden Dio1 festgestellt, die zu einer lokalen Erhöhung der T_3 -Konzentration führt, aber nicht ausschließlich auf die thyrotrophen Zellen der Adenohypophyse zurückzuführen ist, da auch in kortikotrophen, gonadotrophen, laktotrophen und somatotrophen Zellen die Expression von 5'-Deiodasen beschrieben wurde, während die Applikation von MMI eine Repression der Transkription zur Folge hatte (Koenig et al. 1984; Köhrle et al. 1995; Baur und Köhrle 1999). Somit liegt die Vermutung nahe, dass Dio1 unter hyperthyreoten Bedingungen über Regulation der intrazellulären Konzentration von T_4 und T_3 auch die Biosynthese und Sekretion von TSH beeinflusst (Schweizer et al. 2008). Ferner zeigte die Expressionsanalyse nach Applikation des Thyreostatikums eine verstärkte mRNA-Synthese der Dio2, die aufgrund ihrer Substratspezifität für T_4 bei einem Mangel an Schilddrüsenhormonen in der Zirkulation die lokale Versorgung mit T_3 sicherstellt und darüber hinaus die schnelle Anpassung an einen veränderten Schilddrüsenhormonstatus garantiert, während ein Anstieg von T_4 die Expression der Dio2 supprimiert (Visser et al. 1983; Köhrle 2002). Die Expression der hypophysären 5'-Deiodasen wird somit abhängig von der Konzentration zirkulierender Schilddrüsenhormone reguliert. Darüber hinaus beeinflussen Dio1 und Dio2 auch die Regulation des Feedbacks unter hyper- und hypothyreoten Bedingungen in unterschiedlicher Weise (Dio1: Hyperthyreose; Dio2: Hypothyreose) (Baur und Köhrle 1999; Tannahill et al. 2002).

Die Rolle der Schilddrüse in Bezug auf die zirkulierenden Konzentrationen von T_4 und T_3 in Abhängigkeit des Schilddrüsenstatus ist noch nicht hinreichend geklärt, jedoch bestätigt die Transkriptanalyse die Expression beider 5'-Deiodasen. Allerdings wird im Nager ausschließlich für Dio1 auch ein funktionelles Protein nachgewiesen, wobei in Ratten und Mäusen gezeigt wurde, dass abhängig vom Schilddrüsenhormonstatus bis zu ca. 80 % des T_3 in der Zirkulation durch die Schilddrüse zur Verfügung gestellt werden können (Gereben et al. 2001; Köhrle 2007). Bei Iod- oder Selendefizienz, aber auch in der Hypothyreose wird vermehrt thyreomimetisch aktives T_3 gebildet, das einerseits über eine spezifische T_3 -synthetisierende Domäne im TG oder aber über Deiodierungsreaktionen im Zytoplasma der Thyrozyten synthetisiert werden kann, wobei bislang unklar ist zu welchem Anteil T_4 intrathyroidalen Ursprungs ist oder aber aus der Zirkulation über MCT8 aufgenommen wird (Köhrle 1999; Dunn und Dunn 2001; Köhrle 2007). Dabei werden Expression und Aktivität der Deiodasen nicht nur in Abhängigkeit der Serumkonzentration von TSH über cAMP/PKA-vermittelte Signaltransduktion reguliert, sondern auch direkt über die T_3 -Konzentration in der Zirkulation (St Germain 1988). Entsprechend wurde die Expression der Dio1 unter hyperthyreoten Bedingungen im Vergleich zur ovariektomierten Kontrolle reprimiert, während die Applikation des Thyreostatikums eine Induktion der mRNA-Synthese zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu fällt das Expressionsniveau der Dio2 vergleichsweise gering aus und zeigte ausschließlich unter hypothyreoten Bedingungen eine Reduktion der Transkriptmenge, obwohl den Literaturdaten entsprechend im hyperthyreoten Tier ein Anstieg der mRNA-Konzentration zu erwarten gewesen wäre (Chanoine et al. 1993).

Im Vergleich beider 5'-Deiodasen wurden in den peripheren Geweben Leber, Niere und Herz vorrangig Expression und Aktivität der Dio1 nachgewiesen. Dabei wird derzeit die Rolle der hepatischen Dio1 diskutiert, da einerseits in thyreoidektomierten Ratten nach Behandlung mit PTU eine deutliche Reduktion der T_3 -Konzentrationen im Serum sowie eine Repression der Deiodaseaktivität nachgewiesen wurde und andererseits in entsprechenden Knockout-Tieren kaum Veränderungen des Schilddrüsenstatus festgestellt wurden, weshalb auch eine degradierende Rolle der Dio1 plausibel ist (Schweizer et al. 2008). Die beschriebenen Veränderungen der Dio1 unter hyper- und hypothyreoten Bedingungen wurden aber dennoch bestätigt, da nach Applikation von T_4 sowohl die Expression als auch die Aktivität erhöht waren, während in hypothyreoten Tieren reprimierte Transkriptlevel sowie entsprechend reduzierte enzymatische Aktivitäten nachgewiesen wurden (Bianco et al. 2002; Köhrle 2002).

Die Validierung des Modells zeigt, dass neben den hier exemplarisch dargestellten klassischen in Hyper- und Hypothyreose untersuchten Parametern, welche die Serumanalyse sowie die morphologische Betrachtung der Schilddrüse einschließen, auch eine Charakterisierung organspezifischer Wirkungen der applizierten Testsubstanzen möglich ist.

4.2 Der UV-Filter 4-MBC wirkt goitrogen und verursacht Hypothyreose

In Anbetracht der stets wachsenden atmosphärischen Belastung durch UV-Strahlung wird jährlich eine Vielzahl neuer Kosmetikprodukte auf dem Markt etabliert, die den Körper vor den kurzwelligen UVA- und UVB-Strahlen schützen und somit vorzeitiger Hautalterung sowie der Entstehung von Erythemen und Hautkrebs vorbeugen sollen. Im Gegensatz zu physikalischen UV-Filtern wie Titandioxid und Zinkoxid, deren Streuvermögen von der Lichtwellenlänge und der Partikelgröße abhängt, wirken chemische UV-Filter durch Energiedissipation, indem sie aufgrund ihrer chromophoren Struktur hochenergetische Strahlung im Bereich von 250 - 350 nm absorbieren und durch strahlungslose Desaktivierung in Wärme umwandeln (Matissek 1984; Langhals und Fuchs 2004). Das Kampferderivat 4-MBC, welches zunächst als Auslöser photoallergischer Reaktionen beschrieben wurde, zeigt zudem weitreichendes endokrines Potential, das nicht ausschließlich auf die gonadotrope Achse beschränkt ist, sondern auch die Regulation der thyreotropen Achse beeinträchtigt (Hunloh und Goerz 1983; Schlumpf et al. 2004b).

Erste Effekte des UVB-Filters auf die Schilddrüse wurden von Schlumpf et al. beschrieben, die in einem generationsübergreifenden Experiment mit Long-Evans-Ratten in der F1-Generation zunächst unabhängig vom Geschlecht ein erhöhtes Schilddrüsengewicht feststellten, dann aber in nachfolgenden Analysen bei identischem Versuchsaufbau geschlechtsabhängig veränderte Serumparameter nach oraler Applikation von 4-MBC nachweisen konnten (Schlumpf et al. 2004b; Maerkel et al. 2007). Parallel dazu wurden von Schmutzler et al. im Jahr der Erstbeschreibung die Wirkungen chronischer Applikation von 4-MBC auf die thyreotrope Achse ovariektomierter Sprague-Dawley-Ratten dargestellt, die in Auszügen in dieser Arbeit beschrieben und nachfolgend im Kontext mit den Befunden zur subakuten Applikation diskutiert werden (Schmutzler et al. 2004).

Die humane Relevanz dieser Arbeit wird durch zwei unabhängige Studien verdeutlicht, die einerseits die transdermale Aufnahme der Testsubstanz nach äußerlicher Anwendung nachweisen und weiterhin eine komplexe Biotransformation von 4-MBC über enterohepatische Cytochrom P450-Signalwege zu 3-(4-Carboxybenzyliden)-6-hydroxycampher und 3-(4-Carboxybenzyliden)-campher beschreiben (Janjua et al. 2004; Völkel et al. 2006). Zudem wird auf Basis der Serumanalytik ein hohes Bioakkumulationspotential der lipophilen Testsubstanz und dessen glucuronidierten Spaltprodukten einschließlich geschlechtsspezifischer Unterschiede angenommen (Schlumpf et al. 2004b; Schauer et al. 2006).

4.2.1 Chronische Effekte

Der UV-Filter 4-MBC ist durch seine östrogene Wirkung als EAC bereits etabliert, während Effekte auf die thyreotrope Achse bisher nur als Nebenbefunde der Analysen beschrieben wurden. Nachdem bisher primär generationsübergreifende Effekte untersucht wurden, beschreibt die vorliegende Arbeit erstmals den Einfluss von 4-MBC auf die Feedbackregulation der thyreotropen Achse sowie die Effekte auf Synthese, Transport und Metabolismus von Schilddrüsenhormonen. Im Vergleich mit den Daten der Literatur, die erhöhtes Schilddrüsengewicht nach Applikation von 4-MBC beschreiben, konnte die Wirkung von 4-MBC auf die Schilddrüse mit Hilfe der hier durchgeführten Analysen bestätigt werden (Schlumpf et al. 2004b; Maerkel et al. 2007). Im Vergleich zu den Untersuchungen im generationsübergreifenden Experiment wurden hier durch die Verwendung adulter Tiere komplizierende embryonale Effekte ausgeschlossen (Schlumpf et al. 2004b). Dies kann die Unterschiede bezüglich der Regulation von TSH, T_4 und T_3 im Vergleich der Modelle erklären.

In den 4-MBC-behandelten adulten Ratten war die TSH-Konzentration im Serum signifikant erhöht, während die T_4 -Spiegel signifikant erniedrigt waren, unerwarteter Weise ohne Veränderung der T_3 -Konzentrationen (Abb. 6). Entsprechend waren in der Hypophyse *Tshb* und *Dio2* verstärkt exprimiert, die für die kompensatorisch erhöhte TSH-Sekretion verantwortlich sind. Diese Konstellation ist charakteristisch für eine Hypothyreose und konsistent mit der in den 4-MBC-behandelten Ratten beschriebenen Entwicklung einer Struma (Schlumpf et al. 2004b). Ob dieser Effekt aus einer reduzierten Synthese von Schilddrüsenhormonen oder mangelnder Verfügbarkeit von Iodid resultiert, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Ein möglicher Pathomechanismus ist die Inhibition des Iodidtransports über NIS, der sich im erhöhten

Verhältnis von $T_4:T_3$ niederschlägt, das auch bei Patienten mit Iodmangel beschrieben ist. Ein weiterer möglicher Pathomechanismus ist die reduzierte Synthese von T_4 und T_3 durch Hemmung der TPO. In der Tat war die Expression von Nis und von Tpo nach Applikation von 4-MBC reduziert (Abb. 7), möglicherweise infolge der reduzierten Expression von TSH-R, der über cAMP/PKA die Expression von NIS und TPO aktiviert (Suzuki und Kohn 2006). Die erniedrigte Expression von TSH-R könnte das Resultat einer Desensitivierung sein, die bei Hypothyreose mit erhöhtem TSH auftritt und auch bei chronischer Applikation von 4-MBC zu erwarten ist (Kronenberg et al. 2007). Auf molekularer Ebene wird die Desensitivierung durch *targeting* des TSH-R in das Endosom sowie durch G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion vermittelt (Nagayama et al. 1996; Eszlinger et al. 2004; Singh et al. 2004). Diese Effekte auf Proteinebene können in Zellkultorexperimenten durch Fusionsproteine untersucht werden, jedoch fehlt für Untersuchungen *in vivo* ein geeigneter Antikörper, sodass die Transkriptdaten keine abschließende Beurteilung der Desensitivierung zulassen.

Während E_2 als Referenzsubstanz keine signifikante Wirkung auf die thyreotrope Achse hatte, zeigte sich bei sojahaltiger Diät im Vergleich zu unbehandelten Tieren einzig ein deutlich reduzierter T_4 -Spiegel bei unverändertem TSH und T_3 . Dies kann u.a. auf die Inhibition von TPO zurückgeführt werden, welche für GEN und andere Isoflavone des Soja beschrieben ist (Chang und Doerge 2000). Sowohl 4-MBC als auch sojahaltige Diät supprimierten die T_4 -Spiegel; die Effekte waren jedoch nicht additiv und könnten damit über einen gemeinsamen Wirkmechanismus erklärt werden, z.B. einen ähnlichen Effekt auf die Expression der TPO. Die fehlende Wirkung von Soja auf T_3 und den TSH-Spiegel, die nach Applikation von 4-MBC deutlich verändert waren, weist auf eine komplexe Interaktion von 4-MBC mit der thyreotropen Achse hin. Diese betrifft auch die Interaktion von T_4 mit seinen Bindungsproteinen, deren Expression die Verfügbarkeit von FT_4 bestimmt. Anders als 4-MBC verdrängt GEN T_4 von TTR, wobei die Interaktion mit Albumin und TGB in humanem Serum nicht beeinflusst wird (Radovic et al. 2006). Obwohl die freien T_4 -Werte in der Ratte bisher nicht überprüft werden können (fehlende Verfügbarkeit kommerzieller Assays) bietet die unterschiedliche Wirkung von GEN und 4-MBC auf die Interaktion von T_4 und TTR eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Wirkung auf die thyreotrope Achse.

Die Betrachtung der Endorgane zeigte bei chronischer Applikation deutliche periphere Effekte von 4-MBC und Soja. Besonders auffällig war der unterschiedliche Effekt auf Leber und Niere (Abb. 8). In der Leber war die Expression der Dio1 durch 4-MBC supprimiert, ein Effekt, der jedoch über erhöhte Enzymaktivität kompensiert wurde. Im

Gegensatz dazu wurde in der Niere nach Applikation von 4-MBC eine Suppression der Dio1 auf Protein- und Transkriptebeine festgestellt. Dieser Leber-spezifische Kompensationsmechanismus ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Das in der Standarddiät enthaltene Soja wirkt sich allein auf die Niere aus, wobei die Aktivität der DIO1 bei gleichbleibender Expression erhöht ist. Dies kann als Kompensation für die reduzierten Serum-T₄-Werte interpretiert werden kann. Damit ist die Niere, anders als die Leber, in der Lage, langfristig über vermehrte Aktivierung von T₄ zu T₃ den systemisch reduzierten T₄-Spiegeln entgegenzuwirken. Dieser organspezifische Effekt ist konsistent mit der Rolle der Leber als primäres Organ für die systemische T₃-Produktion.

Ein gut charakterisierter Parameter der Wirkung von Schilddrüsenhormonen ist die Expression von Malatenzym (ME). Dieses Protein ist besonders stark in der Leber exprimiert und spielt eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel, indem es NADPH für die Fettsäure-Biosynthese liefert (Mariash et al. 1980). So wurde insbesondere in der Leber T₃-behandelter Ratten eine > 15-fache Induktion der mRNA-Spiegel von ME und eine > 10-fache Induktion der Enzymaktivität nachgewiesen. In anderen Organen wie Herz und Niere war der Effekt weniger stark ausgeprägt (Dozin et al. 1985). Um ME als Marker für endokrine Effekte zu untersuchen, wurde zunächst die basale Aktivität in Leber, Niere und Herz ermittelt. Nach Applikation von 4-MBC zeigte allein die Leber eine leicht erhöhte ME-Aktivität (1,2-fach), die jedoch nicht statistisch signifikant war. Im Gegensatz dazu war die Wirkung von Soja auf die ME-Aktivität der Leber signifikant (1,5 bis 2-facher, alleine und in Kombination mit E₂). Für E₂ ist ein 2,3-facher Effekt auf die ME-Aktivität beschrieben, der von einer 8-fach erhöhten mRNA Menge begleitet ist (Schmutzler et al. 2004). Die fehlende Korrelation von ME-Enzymaktivität und T₄-Serumspiegeln in 4-MBC-behandelten Ratten erschwert jedoch die Nutzung von ME als möglichen Biomarker für die Funktion der thyreotropen Achse. Zusätzlich lässt sich durch die bekannte Koregulation von ME durch T₃ und E₂ die östrogene und T₃-agonistische Wirkung von 4-MBC nicht differenzieren (Cho und Park 1990; Sissan und Leelamma 1996). Obwohl dadurch die Klassifizierung einer Substanz als EAC nicht beeinträchtigt wird, ergeben sich Probleme in der Aufklärung von Pathomechanismen und daraus resultierend in der Entwicklung therapeutischer Strategien zu adäquater Substitution.

Die Untersuchung des Wirkmechanismus von 4-MBC bei chronischer Applikation zeigte die erwarteten Änderungen der Serumspiegel von TSH und T₄. Dennoch gab es keine einheitliche Korrelation unter den gemessenen Parametern der unterschiedlichen

Ebenen der thyreotropen Achse, wie sie unter Berücksichtigung des bekannten Feedbackmechanismus zu erwarten waren. So waren T_4 -Spiegel sowohl mit und ohne Soja im Tierfutter erniedrigt - assoziiert mit dem gegenläufig erhöhten TSH-Spiegel, wobei T_3 entgegen der Erwartung ebenso hochreguliert wurde.

Die hier diskutierten Ergebnisse zur chronischen Exposition von 4-MBC in der ovariectomierten Ratte lassen keine direkten Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Wirkmechanismus zu, da kompensatorische Effekte bei chronischer Applikation des UV-Filters neue Stellgrößen setzen können. Daher wurde in einem weiteren Versuch nach subakuter Exposition die Wirkung von 4-MBC auf die thyreotrope Achse näher charakterisiert.

4.2.2 Subakute Effekte

Um auch die initialen Beeinflussungen der thyreotropen Achse nach Applikation von 4-MBC zu erfassen und die möglichen mechanistischen Aspekte der bereits beschriebenen Hypothyreose zu untersuchen, wurden auch die subakuten Effekte der Testsubstanz analysiert. Die Applikation erfolgte im Gegensatz zur chronischen Exposition oral *per gavage*, um eine möglichst genaue Dosierung und somit neben individuellen Schwankungen einzelner Tiere möglichst geringe Varianzen innerhalb einer Gruppe zu gewährleisten, was den vergleichsweise hohen Aufwand dieser Applikationsform rechtfertigt.

In Übereinstimmung mit den Experimenten zur Langzeitexposition hatte auch die subakute Applikation von 4-MBC einen erheblichen Einfluss auf die Konstitution der Tiere, wobei das Körpergewicht den Gesundheitszustand widerspiegelte (Abb. 12). Insbesondere bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. wurde parallel zur Verringerung des Körpergewichts auch eine verminderte Nahrungsaufnahme der Tiere dokumentiert, welche bei maximaler Konzentration der Testsubstanz vor Reduktion der Dosis auf 600 mg/kg b.w. von Apathie und epileptischen Anfällen begleitet wurde. Studien von Maerkel et al. bestätigen den Effekt der Testsubstanz auf das Körpergewicht, da auch in der F1-Generation chronisch 4-MBC-behandelter Long-Evans-Ratten eine vorübergehende Reduktion des Körpergewichts bei deutlich geringen Konzentrationen beschrieben wurde (Maerkel et al. 2007). Mögliche östrogene Effekte, die aufgrund verminderter Fettsäuresynthese sowie verstärkter Lipolyse ebenfalls zu einer Verringerung des Körpergewichts führen, wurden in der entsprechenden

Kontrollgruppe bestätigt, spielen aber aufgrund der beschriebenen Beobachtungen nach Applikation von 4-MBC vermutlich eine untergeordnete Rolle in Bezug auf das Körpergewicht (Hansen et al. 1980; D'Eon et al. 2005). Diese Annahme wird durch die von Seidlova-Wuttke et al. beschriebenen anti-lipotrophen bzw. lipolytischen Effekte von 4-MBC nach chronischer Applikation unterstützt, da neben den parallel zur E₂-Behandlung verringerten Leptinkonzentrationen bei reduziertem Körpergewicht gegenüber der Kontrollgruppe keine östrogenen Effekte auf die Serumkonzentrationen von Cholesterin, HDL, LDL und Triglyzeriden festgestellt wurden (Seidlova-Wuttke et al. 2006). Entsprechend der neuroendokrinen Funktionen von Leptin bezüglich der Regulation von Appetit und Energiestoffwechsel wird bei verminderter oder ausbleibender Nahrungsaufnahme und infolge dessen reduzierten Leptinkonzentrationen im Serum die über einen STAT3-abhängigen Mechanismus regulierte Promotoraktivität der Prohormonkonvertasen PC1 und PC2 wie auch die Prozessierung der neuronalen Peptidhormone ppTRH und POMC moduliert (Sanchez et al. 2004; Nillni 2007). Die Transkriptanalyse von *Pomc2* (Abb. 17 F) gibt Grund zu der Annahme, dass auch nach subakuter Applikation von 4-MBC die Serumkonzentration von Leptin gegenüber den Kontrolltieren erniedrigt ist, da unter den vorliegenden physiologischen Bedingungen reprimierte Transkriptlevel von *Pomc2* und dessen Spaltprodukt α -MSH beschrieben werden, welches neben Leptin die Expression und Biosynthese von ppTRH über das Melanocortinsystem beeinflusst (Nillni et al. 2000; Fekete et al. 2000). Überdies vermittelt Leptin die Koordination der mRNA-Synthese von ppTrh und proteolytisch spaltenden Enzymen, wodurch eine effektive Prozessierung des Peptidhormons gewährleistet wird, während bei Mangelernährung parallel zu POMC die Expression von ppTRH durch Suppression STAT3-responsiver Elemente in TRH-Neuronen reprimiert wird (Harris et al. 2001; Huo et al. 2004; Nillni 2007). Die Ergebnisse der subakuten Applikation deuten einen sekundären Effekt von 4-MBC auf das Leptin-Melanocortinsystem an. Aufgrund der signifikant erhöhten Transkriptlevel von ppTRH (Abb. 15 B) muss jedoch davon ausgegangen werden, dass 4-MBC primär auf die Feedbackregulation der thyreotropen Achse wirkt, was durch die verstärkte Expression der Prohormonkonvertasen belegt wird (Abb. 17 D, E), deren Transkription durch die Serumkonzentration von Schilddrüsenhormonen selektiv über negative TREs in der Promotorregion reguliert ist (Shen et al. 2004; Shen et al. 2005).

4.2.2.1 *Beeinträchtigung der Feedbackregulation durch 4-MBC*

Um die chronischen Effekte von 4-MBC auf die Feedbackregulation der thyreotropen Achse hinsichtlich möglicher kompensatorischer Mechanismen einzuordnen und darüber hinaus die Wirkungsweise der Testsubstanz zu charakterisieren, wurden die Ergebnisse der Serumanalysen wie auch die Resultate der Transkriptanalysen Feedback-assoziiierter Gene in Hypothalamus und Hypophyse hinsichtlich östrogenen bzw. thyreoidaler Effekte der Testsubstanz ausgewertet.

Die Serumanalyse zeigte einen leichten, aber nicht signifikanten Einfluss von 4-MBC auf die Serumkonzentrationen von LH und Prolaktin (Abb. 13 A, B), wobei die bereits nach chronischer Applikation von 4-MBC beobachtete Erhöhung der LH-Konzentration (Daten nicht gezeigt) auch nach subakuter Applikation des UV-Filters bei Konzentrationen ≤ 100 mg/kg b.w. in deutlich abgeschwächter Form festgestellt wurde. Dieser Effekt ist jedoch schwerlich auf eine antiöstrogene Wirkung der Testsubstanz zurückzuführen, da die Sekretion von LH über ER α moduliert wird, 4-MBC hingegen als selektiver ER β -Ligand beschrieben wird (Schlumpf et al. 2004a; Seidlova-Wuttke et al. 2006). Indes konnte nach einem Applikationszeitraum von 5 Tagen eine dosisabhängige Erhöhung der TSH-Konzentration festgestellt werden (Abb. 13 C), wenngleich die Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone nach subakuter Applikation nahezu unbeeinflusst blieben (Abb. 14 A, B). Ausgehend von den Serumkonzentrationen der untersuchten Hypophysenhormone scheint 4-MBC unabhängig von östrogenen Effekten auf die Feedbackregulation der thyreotropen Achse Einfluss zu nehmen, wobei die Konstellation der Serumparameter, insbesondere unter Berücksichtigung der Expositionszeit, auf die Entstehung einer primären Hypothyreose hinweist, die neben einer erhöhten TSH-Konzentration durch normale/verminderte Serumkonzentrationen freier Schilddrüsenhormone gekennzeichnet ist (Stockigt 2003; Fliers et al. 2001). Dabei wird einerseits durch verstärkte Freisetzung von intrazellulär gebundenem T₃ und andererseits durch präferentielle Biosynthese des thyromimetisch aktiven T₃ die Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone zunächst aufrechterhalten bevor im weiteren Verlauf der Erkrankung der Schilddrüsenhormonspiegel sinkt (Cavalieri 1997). Darüber hinaus ist bei unveränderter Bindungsaffinität von T₄ gegenüber TTR, wie sie bereits nach chronischer Applikation beschrieben wurde, eine Anpassung der Biosynthese des in der Leber und im *Choroid plexus* exprimierten Bindungsproteins denkbar. Infolge dessen würde sich das Verhältnis von freiem und gebundenem T₄ und somit auch die Expression Feedback-assoziiierter Gene in Hypothalamus und Hypophyse verändern,

da abhängig von der Konzentration an FT₄ und FT₃ die Expression T₃-sensitiver Gene reguliert wird (Richardson 2007). Diese Annahme wird durch die von Janjua et al. publizierten Daten partiell unterstützt, die nach transdermaler Aufnahme der Testsubstanz in weiblichen Probanden neben unveränderten Serumkonzentrationen von T₄ eine signifikante Erhöhung der FT₄-Konzentration nachweisen konnten, jedoch unveränderte TSH-Konzentrationen beschreiben (Janjua et al. 2007). Des Weiteren ist anzunehmen, dass die bei einer Konzentration von 600 mg/kg b.w. beobachteten Effekte von 4-MBC nicht ausschließlich durch das endokrine Potential der Testsubstanz begründet sind, sondern vorrangig auf die toxische Wirkung von 4-MBC zurückzuführen sind, da auch bei verminderter Nahrungszufuhr und allgemeinen Erkrankungen mit schlechtem Grundzustand eine reduzierte Konzentration der zirkulierenden Schilddrüsenhormone beschrieben wird (Chopra 1996; De Groot 2006).

Die im Folgenden diskutierte Transkriptanalyse der Feedback-assozierten Gene in Hypothalamus und Hypophyse belegt nicht nur den Einfluss der Testsubstanz 4-MBC auf die Regulation des Feedbacks der thyreotropen Achse, sondern zeigt auch die E₂-unabhängige Genregulation differentiell regulierter Transkripte in der Hypophyse. Entsprechend der erstmals von Motta et al. beschriebenen TSH-induzierten Regulation hypothalamischer TRH-Neurone konnte bei erhöhten TSH-Konzentrationen nach Applikation von 4-MBC bereits bei Konzentrationen ≥ 10 mg/kg b.w. neben der Induktion des G-Protein gekoppelten Rezeptors Tshr eine verstärkte mRNA-Synthese des Vorläuferproteins ppTrh nachgewiesen werden (Abb. 15 A, B) (Motta et al. 1969; Clerget-Froidevaux et al. 2004). Der Vergleich mit der Positivkontrolle MMI bestätigt die thyreostatische Wirkungsweise der Testsubstanz, da auch experimentell induzierte Hypothyreose beispielsweise nach Thyreoidektomie mit einem Anstieg der TRH-Konzentration in der *Eminentia mediana* verbunden ist, während hohe Schilddrüsenhormonkonzentrationen in der Zirkulation die Transkription des Tripeptids reprimieren (Segerson et al. 1987; Rondeel et al. 1992). Biosynthese und Sekretion von TRH werden in der Regel maßgeblich durch den Schilddrüsenhormonstatus beeinflusst, jedoch konnte trotz beinahe unveränderter Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum sowie gleichbleibender Expressionsstärke von Thra1 eine Erhöhung der Transkriptlevel von Thra2 und Thrb festgestellt werden, wobei insbesondere der Effekt auf Thra2 gegenüber der vergleichsweise schwachen Zunahme der Expression MMI-behandelter Tiere unerwartet stark ausfiel (Abb. 15 C - E) (Zoeller et al. 1988). Das Expressionsprofil der untersuchten Rezeptorisoformen, insbesondere die Modulation von Thrb deutet bei minimaler

Reduktion zirkulierender T_4 -Konzentrationen sowie unveränderter T_3 -Konzentrationen im Serum eine Dysregulation des Feedbacksystems auf Ebene des Hypothalamus an, da die Synthese von TRH vorrangig über die Expression der in Hypothalamus und Hypophyse dominanten Isoform $TR\beta_2$ reguliert wird, deren Deletion mit einer Zunahme der Transkriptlevel von ppTrh assoziiert ist und somit unweigerlich zu einem hypothyreoten Phänotyp im Knockout führt (Koibuchi et al. 1993; Lechan et al. 1994; Nobrega et al. 1997; Abel et al. 2001; Alkemade et al. 2005). Die Einordnung der Effekte auf Thra2 ist ungleich schwieriger, da einerseits die Rolle dieser Splicevariante bezüglich der Regulation des Feedbacks derzeit nicht hinreichend aufgeklärt ist und neben einer verstärkten Expression nach Thyreoidektomie bzw. nach Induktion des „Niedrig- T_3 -Syndroms“ im Tiermodell keine weiteren Krankheitsbilder mit vergleichbaren Veränderungen der Transkription auf Ebene der TRs beschrieben sind (Koibuchi et al. 1993; Bakker et al. 1998; Clerget-Froidevaux et al. 2004). Entsprechend den von Salto et al. publizierten Daten wird aufgrund der Überexpression von $TR\alpha_1$ in $TR\alpha_2$ -defizienten Tieren ein *silencing*-Effekt des dominant-negativen Repressors $TR\alpha_2$ vermutet, der die grundlegenden Funktionen von $TR\alpha_1$ abhängig von physiologischen Bedingungen moduliert, jedoch hinsichtlich des Fehlens dieser Rezeptorisoform in aquatischen Lebewesen scheinbar eine untergeordnete Rolle bezüglich der Feedbackregulation der thyreotropen Achse spielt (Salto et al. 2001; Dupre et al. 2004). Die Arbeiten von Timmer et al. deuten jedoch darauf hin, dass die Sensitivität einzelner Gewebe gegenüber veränderten Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum durch das Verhältnis von $TR\alpha_1:TR\alpha_2$ beeinflusst wird, indem durch alternatives Spleißen die Expression beider Rezeptorisoformen reguliert wird, auch wenn ausschließlich $TR\alpha_1$ nach Ligandenbindung und Transaktivierung die Transkription T_3 -regulierter Zielgene aktiv moduliert (Munoz et al. 1988; Schwartz et al. 1992; Timmer et al. 2003). Hypothyreose bewirkt eine Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten von Thra2, wobei durch Bindung des intronischen *splicing enhancer elements* $SE\alpha_2$ an SF2 aus der Familie der RNA-bindenden Serin-Arginin-Proteine das Spleißen der proximal gelegenen *5'-splice site* und somit die Expression dieser Isoform gegenüber $TR\alpha_1$ begünstigt wird (Hastings et al. 2001; Timmer et al. 2003). Infolge dessen verändert sich das Verhältnis von hnRNP A1:SF2, wobei hnRNP A1 unter Verwendung der distalen *5'-splice site* die mRNA-Konzentration von Thra1 erhöht (Mayeda und Krainer 1992; Hanamura et al. 1998; Timmer et al. 2003). Im Kontext mit diesen Untersuchungen ist ein durch 4-MBC vermittelter Effekt auf die Spleißfaktoren und somit auf das alternative Spleißen von Thra vorstellbar, da neben den signifikant erhöhten mRNA-Konzentrationen von Thra2

gegenüber den Kontrolltieren auch der Vergleich des Expressionsniveaus beider Rezeptorisoformen die unter hypothyreoten Bedingungen erläuterten Effekte bestätigte (Daten nicht gezeigt). Diese Hypothese wird durch eine von Maerkel et al. publizierte Studie unterstützt, welche nach Applikation von 4-MBC bei Konzentrationen von 24 mg/kg b.w. eine signifikante Induktion des Koaktivators SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*) im ventromedialen Hypothalamus beschreibt (Maerkel et al. 2007). Dabei interagiert SRC-1 nicht ausschließlich mit der gonadotropen Achse, sondern moduliert auch TR α - bzw. TR β -abhängige Signalwege in vorwiegend TR β exprimierenden Geweben, wobei TR β_2 die stärkste modulierende Wirkung bei Schilddrüsenhormonmangel zeigt (Oberste-Berghaus et al. 2000; Yang und Privalsky 2001; Takeuchi et al. 2002). Darüber hinaus belegen Studien im Doppelknockout-Modell TR $\alpha^{0/0}$ SRC-1 $^{-/-}$ im Vergleich zu konventionellen Knockout-Modellen (TR $\alpha^{0/0}$; SRC-1 $^{-/-}$), dass TR α über SRC-1 an der Modulation der Genexpression von TSH beteiligt ist und dieser Effekt vermutlich über TR α_2 vermittelt wird (Macchia et al. 2001; Sadow et al. 2003). Bei einem verändertem Verhältnis von TR α_1 :TR α_2 und infolge dessen verstärkter Expression von SRC-1 wäre bei gleichzeitig erhöhter Sensitivität gegenüber Modifikationen des Schilddrüsenhormonstatus nach Applikation von 4-MBC eine Induktion der TR β_2 /TRH-vermittelten TSH-Synthese in der Hypophyse vorstellbar. Zur genaueren Charakterisierung der Situation im Hypothalamus und zur weiteren Bestätigung der Hypothese wären weitere Expressionsanalysen Transport- und Metabolismus-assoziiierter Gene im ZNS hilfreich, da bioaktives T₃ entsprechend der kürzlich beschriebenen Kompartimente erst nach 5'-Deiodierung durch die in Tanyzyten exprimierte Dio2 und anschließendem Transport über MCT8 oder OATP1C1 die benachbarten TRH-Neurone erreicht (Alkemade et al. 2006; Bernal 2006).

Die Transkriptanalyse bestätigte den bereits im Hypothalamus detektierten hypothyreoten Phänotyp der 4-MBC-behandelten Tiere durch das charakteristische Expressionsmuster Feedback-assoziiierter Gene der Hypophyse. Konsistent mit dem bereits im Abschnitt zuvor erwähnten Anstieg der mRNA-Konzentration des hypothalamischen Neuropeptids ppTrh, wurden analog der Applikation des Thyreostatikums MMI um Faktor ~ 2 erhöhte Transkriptlevel des in Follikulostellarzellen exprimierten Trhr (Trhr1) festgestellt, der im Gegensatz zu einer weiteren Rezeptorisoform (Trhr2) für TRH spezifisch ist und vornehmlich in der Adenohypophyse sowie neuroendokrinen Regionen des Gehirns exprimiert wird (Abb. 17 A) (Sun et al. 2003; Prummel et al. 2004). Diese Ergebnisse sind auch mit den in der Literatur publizierten Daten vergleichbar, da Studien von Schomburg et al. in

euthyreoten männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach 4-tägiger Behandlung mit PTU ebenfalls eine 2-fache Induktion der Transkriptmenge von *Trhr* beschreiben (Schomburg und Bauer 1995). Jedoch kann die von Schomburg et al. postulierte prä-translationale Regulation der mRNA-Synthese von *Trhr* durch Schilddrüsenhormone, die letztlich die Responsivität gegenüber TRH modulieren, hier nur partiell nachvollzogen werden (Schomburg und Bauer 1995). Nach Applikation von 4-MBC bei nahezu unveränderten Konzentrationen von T_4 und T_3 in der Zirkulation sowie fehlenden Informationen bezüglich der Expression von TTR ist somit auch hinsichtlich der Konzentration von FT_4 und FT_3 nur bedingt ein Rückschluss auf die hypophysären Schilddrüsenhormonkonzentrationen möglich. Unabhängig von TRH wird die Expression von *Tshb*, die bereits bei einer Konzentration von 33 mg/kg b.w. gegenüber der Kontrolle um Faktor 2,6 erhöht war, auch über cAMP/CREBP (*cAMP response element binding protein*) durch den spezifisch in der Hypophyse exprimierten Transkriptionsfaktor PIT-1 stimuliert, der zur Familie der POU-Homöodomänen-Proteine gehört (Abb. 16 B) (Steinfelder et al. 1991). Dabei ist PIT-1, das nur in Kombination mit dem Homöobox-Gen *GATA binding protein 2* (GATA-2) die Expression von TSH β zu modulieren vermag, nicht nur für Wachstum und Entwicklung von somatotrophen, lactotrophen und thyreotropen Zellen verantwortlich, sondern reguliert auch die mRNA-Synthese von Gh und Prl (Nelson et al. 1988; Ingraham et al. 1990; Haugen et al. 1994; Shupnik 2000). Analog der pathobiochemischen Veränderungen einer klassischen Hypothyreose war auch der in 4-MBC behandelten Tieren beobachtete Anstieg der Transkriptmenge von Pit-1 und *Trhr* mit einer dosisabhängig erhöhten Expression von *Tshb* assoziiert, während nach Applikation der Referenzsubstanz T_4 reprimierte Transkriptlevel von *Tshb* detektiert wurden (Abb. 16 B, Abb. 17 C) (Pfäffle et al. 1996; Rondeel et al. 1992). Dies ist auf eine reduzierte mRNA-Stabilität der Transkripte zurückzuführen, die auf einer T_3 -vermittelten Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes von *Tshb* basiert (Yen 2001). Im Gegensatz zu *Tshb* zeigte die Transkriptanalyse der α -Untereinheit 4-MBC behandelte Tiere unter den verwendeten experimentellen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen des Expressionsmusters (Abb. 16 A). Damit bestätigen diese Ergebnisse auch unter Berücksichtigung der T_4 -injizierten Tiere die von Carr et al. publizierten Daten eines divergenten Effekts der mRNA-Spiegel beider Untereinheiten, während Franklyn et al. einen koordinierten Effekt der T_3 -abhängigen Reduktion von α GSu und TSH β beschreiben (Ong et al. 1985; Franklyn et al. 1987). Die hypophysäre Expression der 5'-Deiodasen, die als T_3 -regulierte Gene die Sekretion von TSH beeinflussen, stellt einen weiteren wichtigen Aspekt zur Charakterisierung der 4-MBC-vermittelten Effekte

auf die Feedbackregulation dar, zumal die mRNA-Konzentrationen von Dio1 und Dio2 auch eine Einschätzung des gewebespezifischen Schilddrüsenhormonstatus erlauben. Im Kontext mit der Literatur konnte bereits in 4.1.2 gezeigt werden, dass die hypophysäre Expression von Dio2, deren Coexpression mit Tshb in T α T1-Zellen nachgewiesen wurde, bei einem Mangel an Schilddrüsenhormonen eine schnelle Adaption an einen veränderten Schilddrüsenhormonstatus gewährleistet, indem durch präferentielle Deiodierung von T $_4$ die intrazelluläre Versorgung mit T $_3$ sichergestellt wird (Visser et al. 1983; Köhrle 2002; Christoffolete et al. 2006). Der eigentliche Anteil der jeweiligen Deiodasen an der Sekretion von TSH ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt; die subakute Applikation von 4-MBC zeigte jedoch, dass neben reduzierten mRNA-Konzentrationen der positiv regulierten Dio1 erhöhte Transkriptlevel der quantitativ stärker exprimierten Dio2 nachgewiesen wurden, welche nicht nur mit den Modifikationen der mRNA-Synthese von Tshb korrelierten, sondern im Vergleich zu MMI-behandelten Tieren mit einer ausgeprägten Hypothyreose die Vermutung nahe legt, dass bereits minimale Schwankungen peripherer Hormone ausreichen, um die TSH-Sekretion über die T $_3$ -regulierte Expression der 5'-Deiodasen zu beeinflussen (Abb. 16 C, D) (Koenig et al. 1984; Köhrle et al. 1995; Baur et al. 2002; Christoffolete et al. 2006; Köhrle 2007). Ein weiterer wichtiger Faktor für den T $_3$ -Status in der Hypophyse ist die TRH-spezifische Aminopeptidase TRH-DE, die vermutlich ein essentielles regulatorisches Element der Feedbackregulation darstellt und neben Schilddrüsenhormonen auch durch Sexualsteroiden wie beispielsweise E $_2$ moduliert wird und somit die Intensität des hypothalamischen Stimulus wie auch die Dauer des Signals beeinflusst (Schomburg und Bauer 1995; Schomburg und Bauer 1997). In 4-MBC-behandelten Tieren konnte ebenso wie nach Applikation des Thyreostatikums MMI eine reprimierte Expression dieses Ectoenzym nachgewiesen werden, die im Vergleich zu euthyreoten Kontrolltieren lediglich ~ 12 % des Ausgangsniveaus erreichte und somit auf eine deutliche Dysregulation der thyreotropen Achse hinweist. Obwohl die Wirkung von 4-MBC sowohl über thyroideale als auch gonadotrope Effekte erfolgen kann, spricht die stärkere Wirkung von 4-MBC verglichen mit E $_2$ für einen zumindest partiell über die thyreotrope Achse vermittelten Effekt.

Die Serumanalyse der Hypophysen- und Schilddrüsenhormone wie auch die Untersuchung der Feedback-assoziierten Genexpression auf Ebene von Hypothalamus und Hypophyse zeigen, dass die subakute Applikation von 4-MBC in ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten eine Dysregulation der thyreotropen Achse bewirkt, die insbesondere hinsichtlich der Serumparameter die Pathogenese einer

primären Hypothyreose vermuten lässt (Kronenberg et al. 2007). Die ursächliche Fehlfunktion ist möglicherweise auch auf den hier postulierten Spleißeffekt des hypothalamisch exprimierten *Thra2* zurückzuführen, da trotz signifikant erhöhten Serumkonzentrationen von TSH bei Konzentrationen von 10 - 333 mg/kg b.w. nahezu konstante Konzentrationen von T_4 und T_3 festgestellt wurden, so dass trotz der überaus großen Ähnlichkeit mit dem Wirkprofil des Thyreostatikums eventuell ein multifaktorieller Mechanismus der Filtersubstanz zu vermuten ist, der im nachfolgenden Abschnitt 4.2.2.2 in Bezug auf eine Fehlfunktion der Schilddrüsenhormonbiosynthese ausführlich erläutert wird. Darüber hinaus wird anhand der differentiell regulierten Gene der Hypophyse deutlich, dass die nach subakuter Applikation von 4-MBC detektierten Effekte vermutlich nicht auf einem rein östrogenen Effekt des UV-Filters basieren, sondern vielmehr durch direkte Interferenz der Testsubstanz mit der Regulation der thyreotropen Achse vermittelt werden. Erste Studien an Probanden weisen zudem auf die humane Relevanz dieser Arbeiten hin, da nach transdermaler Applikation des UV-Filters Serumkonzentrationen von 80- 200 nM detektiert wurden, sodass die im Tierexperiment verwendeten Dosierungen vor allem im unteren Konzentrationsbereich physiologische Relevanz haben. Im Tierexperiment wurden bereits bei einer Konzentration von 33 mg/kg b.w. signifikante Veränderungen bezüglich der Regulation der thyreotropen Achse festgestellt (Janjua et al. 2004; Schauer et al. 2006).

4.2.2.2 *Beeinträchtigung der Schilddrüsenhormonbiosynthese durch 4-MBC*

Analog zum klinischen Erscheinungsbild einer primären Hypothyreose, das parallel zu einer erhöhten TSH-Konzentration durch normale oder verminderte Konzentrationen von freier Schilddrüsenhormone gekennzeichnet ist, deuten die in 4.2.2.1 diskutierten Befunde nach subakuter Applikation des UV-Filters 4-MBC einen primären Effekt der Filtersubstanz auf die Schilddrüsenhormonbiosynthese an, der morphologisch und biochemisch charakterisiert wurde (Stockigt 2003; Fliers et al. 2001).

Strumabildung, die auf eine nahrungsbedingte Ioddefizienz oder den Gebrauch von Thyreostatika zurückzuführen ist, zeichnet sich durch eine kompensatorische Erhöhung des Organgewichts infolge zellulärer Hyperplasie sowie durch Hypervaskularisierung des Gewebes aus (Wollman et al. 1978; Smeds und Wollman 1983). Die phänotypische Untersuchung der Schilddrüsen 4-MBC-behandelter Tiere zeigte eine Hypertrophie des Gewebes mit einer dosisabhängigen Erhöhung des Organgewichts. Die morphologische Analyse bei Konzentrationen ≥ 100 mg/kg b.w.

zeigte neben einer Zunahme der Epithelzellhöhe des Thyrozyten und einer Reduktion des Kolloidanteils im Follikel auch strukturelle Veränderungen des Schilddrüsengewebes (Abb. 18; Abb. 19). Zudem war ab einer Konzentration ≥ 333 mg/kg b.w. bei verstärkter Durchblutung das Volumen des Gewebes vergrößert. Studien von Gerard et al. beschreiben während früher Phasen der Strumabildung, die bei normalen TSH-Werten zunächst allein mit sinkenden intrazellulären Iodidkonzentrationen assoziiert sind, eine verstärkte Vaskularisierung der Schilddrüse (Gerard et al. 2008). Im weiteren Verlauf der Erkrankung wird das *Remodeling* des Gewebes in erster Linie durch die parakrine Wirkung von VEGF vermittelt, dessen Expression über TSH/cAMP moduliert wird (Sato et al. 1995). Die verstärkte Expression des Angiogenesemarkers VEGF sowie der in Epithelzellen detektierten Rezeptoren Flt-1 und Flt-1/KDR aus der Familie der Tyrosinkinase, bestätigte die in 4-MBC behandelten Tieren vermutete Angiogenese, die auf Transkriptionsebene bei Konzentrationen ≥ 333 mg/kg b.w. statistisch signifikante Resultate lieferte (Abb. 25, Abb. 26).

Die Akkumulation von extrazellulärem Iodid im Lumen des Thyrozyten ist der initiale Schritt der Schilddrüsenhormonbiosynthese, die über den basolateral gelegenen Transporter NIS katalysiert wird, der zur Familie der Na-abhängigen *sodium glucose transporter-1*-Proteine (SGLT-1) gehört (Dohan und Carrasco 2003). Nach subakuter Applikation von 4-MBC wurde entsprechend der erhöhten Serumkonzentrationen von TSH eine verstärkte Expression von *Tshr* sowie der über TSH/cAMP regulierten Gene *Nis* und *Tpo* nachgewiesen. Entsprechend publizierter Daten war zu erwarten, dass inhibitorische Elemente im N-terminalen Bereich des follikulären TG als autokrine Regulatoren über die Transkriptionsfaktoren TTF-1, TTF-2 und Pax8 die Expression von *Tshr*, *Nis*, *Tpo*, *Duox1/2* wie auch *Tg* selbst beeinflussen (Suzuki et al. 1999; Dunn und Dunn 2001; Suzuki und Kohn 2006). In den hier verwendeten ovariektomierten Ratten war die Expression von *Tshr*, *Nis*, *Tpo* und *Duox1/2* ebenso erhöht, allerdings war nur ein marginaler Effekt auf *Tg* nachzuweisen (Abb. 22, Abb. 23). Trotz der erhöhten mRNA-Konzentration von TPO wurden im *hrTPO*-basierten *in vitro*-Assays keine Effekte auf die Aktivität der TPO festgestellt (Schmutzler et al. 2007). Das Gesamtbild entspricht damit der kompensatorisch induzierten Hormonbiosynthese bei erhöhtem TSH mit leicht reduziertem T_4 , die jedoch aufgrund der Hemmung des Iodidtransports langfristig zu einer Reduktion der T_4 -Konzentration führt (Kronenberg et al. 2007).

Im Sinne der Regulation der thyreotropen Achse wurde nach Applikation von 4-MBC der hypothyreoten Stoffwechsellage der Tiere entsprechend eine verstärkte Expression von NIS auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen (Abb. 20 B, Abb. 21). Das Zellkulturexperiment in FRTL-5-Zellen zeigte, dass nach Inkubation mit 4-MBC der Iodidtransport bei einer Konzentrationen von 10^{-7} M um mindestens ~ 30 % inhibiert wurde, während bei einer Dosis von 10^{-5} M eine Restaktivität von nur 12 % detektiert wurde (Abb. 31). Dagegen zeigte der Ansatz der direkten Kompetition, dass 4-MBC nicht direkt mit der Transportrate interferiert (Abb. 31). Daher ist ein Effekt auf die Expression oder die subzelluläre Lokalisation wahrscheinlich. Parallel dazu wurde *in vitro* nach Inkubation von 3 Tagen bzw. 5 Tagen eine erhöhte Transkription von Nis nachgewiesen, während im Western blot die Expression von NIS konzentrationsabhängig reduziert war (Abb. 32).

Die Zellpolarisierung und subzelluläre Lokalisation von NIS beeinflussen dessen Halbwertszeit und spielen somit neben der Stimulation über TSH eine wichtige Rolle hinsichtlich der Regulation der Aktivität des Transportproteins (Dohan et al. 2003a). Intrazelluläres NIS hat mit 5 Tagen eine um 40 % längere Halbwertszeit als in der Plasmamembran lokalisiertes NIS (Riedel et al. 2001). Im Gegensatz zur TSH/cAMP-vermittelten Induktion von NIS auf Protein- und Transkriptebene *in vivo* ist die Proteinkonzentration in der Plasmamembran von FRTL-5-Zellen zeit- und dosisabhängig reduziert und impliziert damit eine fehlerhafte oder ausbleibende Integration von NIS in die Plasmamembran. Somit wäre nicht nur die Diskrepanz zwischen Protein- und Transkriptebene erklärbar, sondern auch die TSH-vermittelten Effekte die Schilddrüsenhormonbiosynthese mit erhöhten mRNA-Konzentrationen bei leicht reduzierten T_4 -Serumkonzentrationen.

Die Expression der beiden 5'-Deiodasen Dio1 und Dio 2 wurde von MMI und 4-MBC gleichsinnig reguliert und zeigte eine Induktion von Dio1 und Repression von Dio2 auf RNA-Ebene (Abb. 24). Während die Aktivität von Dio2 den Literaturdaten entsprechend nicht messbar war, wurde die Aktivität von Dio1 allein von 4-MBC und nicht von MMI induziert. Dies spricht für einen direkten Effekt von 4-MBC auf Dio1, der nicht durch die hypothyreote Stoffwechsellage vermittelt wird. Insbesondere in Nagern trägt die Schilddrüse signifikant mit bis zu 80 % zur Produktion von Serum- T_3 bei (Köhrle 2007). Da im Menschen 75 % der Spiegel des biologisch aktiven T_3 aus der Peripherie stammen ist die Betrachtung der peripheren Effekte durchaus relevant.

4.2.2.3 Hemmung T_3 -regulierter Gene der Peripherie durch 4-MBC

Der Einfluss von 4-MBC auf die Peripherie zeigt sich insbesondere in Leber und Niere, während das Herz weniger stark betroffen war. Die hepatische Dio1 ist ein gut charakterisiertes T_3 -responsives Gen mit TRE-Sequenzen im Promoterbereich (Köhrle 2002). Die subakuten Effekte auf DIO1 (Abb. 27) entsprechen den Effekten bei chronischer Applikation und sind in 4.2.1 und 4.2.2.3 vergleichend diskutiert. Auf die Expression von Dio2 wirkte 4-MBC gewebespezifisch (Abb. 28) mit reduzierter Expression in der Leber, erhöhter Expression in der Niere und unveränderter Expression im Herzen. Da Dio2 nicht kompensatorisch zu Dio1 reguliert ist, war keine gegenläufige Expression der Deiodasen nach Applikation von 4-MBC zu erwarten (Streckfuss et al. 2005). Die unterschiedliche Regulation im Gewebe könnte einerseits durch unterschiedliche Akkumulation von 4-MBC im Gewebe erklärt werden oder auf einer differentiellen kompensatorischen Kapazität beruhen. Da Leber und Niere zur systemischen Versorgung mit T_3 beitragen, während das Herz nur lokal T_3 produziert, war eine unterschiedliche gewebespezifische Regulation der Deiodasen zu erwarten (Bianco et al. 2002). Insgesamt ist eine Reduktion der Dio1 als mechanistische Ursache unwahrscheinlich, sondern möglicherweise eine Folge der leicht verminderten Serum- T_4 -Werte.

Im Vergleich zu den Deiodasen war der Effekt von 4-MBC auf weitere T_3 -responsive Gene konsistent über alle betrachteten Organe mit Suppression von Spot14, Gpd2, und Me1 (Abb. 29), wobei die Stärke der Effekte unterschiedlich war; in der Regel waren sie ab der mittleren Dosis von 100 mg/kg pro Tag signifikant. Das Herz war auch hier am schwächsten betroffen. Die Wirkung auf Myh6 (Tab. 18) trat nur in der höchsten Konzentration mit 600 mg/kg b.w. pro Tag 4-MBC auf und ist daher als toxischer Effekt zu werten. Die Problematik in der Verwendung von ME als Reporter mit bekannter Kombination östrogenen und thyroidalen Effekte ist in 4.2.1 diskutiert. Zur Unterscheidung von Effekten des 4-MBC und seiner Metabolite sind weiterführende Experimente notwendig.

Obwohl die T_4 -Plasmaspiegel durch 4-MBC nur marginal erniedrigt wurden, war die Expression der TRs der Peripherie signifikant verändert (Tab. 19) - möglicherweise ein direkter Effekt oder eine Folge der veränderten Konzentrationen von FT_4 und FT_3 , die als nicht genomische Wirkung über Integrin $\alpha V\beta 3$ den MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg stimuliert (Cody et al. 2007; Davis et al. 2007). Dies führt zur

Phosphorylierung von TR und fördert die Angiogenese und Zellproliferation (Bergh et al. 2005b; Davis et al. 2005).

Die unterschiedliche 4-MBC-Antwort im Herzen setzte sich bei der Expression der TRs fort - nur TR α 2 ist in human-relevanten Konzentrationen verändert, während in Niere und Leber eine konstante Induktion aller Isoformen vorlag. Im kardiovaskulären System reguliert T₃ über den PI3-K/Akt-Signalweg die Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS (endotheliale NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase) und übt dadurch blutdrucksenkende und neuroprotektive Wirkungen aus (Hiroi et al. 2006). Möglicherweise ist die kardiale Wirkung von 4-MBC stärker kompensiert. Die Expression der TR-Isoformen in der Leber entspricht den publizierten Daten bei Hypothyreose (Zandieh-Doulabi et al. 2004). Für die Niere sind keine Literaturdaten vorhanden. Die Regulation in der Niere nach Applikation von 4-MBC entspricht jedoch den hepatischen Effekten. Die erhöhte Expression der TRs ist ebenso wie die reduzierte Aktivität der 5'-Deiodasen mit einem lokalen T₄-Mangel vereinbar. Die überproportional erhöhte Expression von Thra2 verglichen mit Thra2 in der Leber bewirkt eine zusätzlich gesteigerte Sensitivität gegenüber Schilddrüsenhormonen (Timmer et al. 2003).

Zusätzlich zur direkten Wirkung auf die gonadotrope und thyreotrope Achse kann die Wirkung von 4-MBC auch über das Immunsystem vermittelt werden. So wurde bei der „*non-thyroidal illness*“ (unspezifische Veränderungen der Schilddrüsenachse bei Erkrankungen anderer Genese) eine reduzierte Aktivität und Expression von Dio1 in der Leber beschrieben (Boelen et al. 2004). Die Entzündungsparameter IL-6 und das Akutphaseprotein Mt2 waren konzentrationsabhängig erhöht (Abb. 30), während die Expression von IL1 β und TNF α jedoch nicht verändert war. Obwohl die veränderten Entzündungsparameter die reduzierte Expression von Dio1 und auch den Gewichtsverlust erklären kann, sind die direkten Effekte auf die Schilddrüse nicht als „*non-thyroidal illness*“ zu erklären, da in der Schilddrüse Tshr-mRNA anders als in den 4MBC-behandelten Tieren reduziert sein sollte (Boelen et al. 2004). Weiterführende Untersuchungen im Zeitverlauf sind nötig, um zu unterscheiden ob die T₄-unabhängige Wirkung von 4-MBC auf das Immunsystem oder die Wirkung auf die thyreotrope Achse im Vordergrund des Pathomechanismus steht.

Die Ergebnisse des Subakut-Versuches (zusammengefasst in Abb. 45) zeigen, dass die thyreotrope Achse von 4-MBC auf allen Ebenen beeinflusst wird. Besonders auffällig ist der nahezu unveränderte Plasmaspiegel von T₄ und T₃ bei deutlicher und

konsistenter Wirkung auf regulatorische Gene in Hypothalamus und Hypophyse sowie erhöhte Biosynthese, Angiogenese und Transport auf Ebene der Schilddrüse. Zusammen mit der Suppression von T₃-abhängigen Genen in der Peripherie und Gegenregulation der TRs ergibt sich das Bild einer hypothyreoten Stoffwechsellaage, die durch 4-MBC induziert wird.

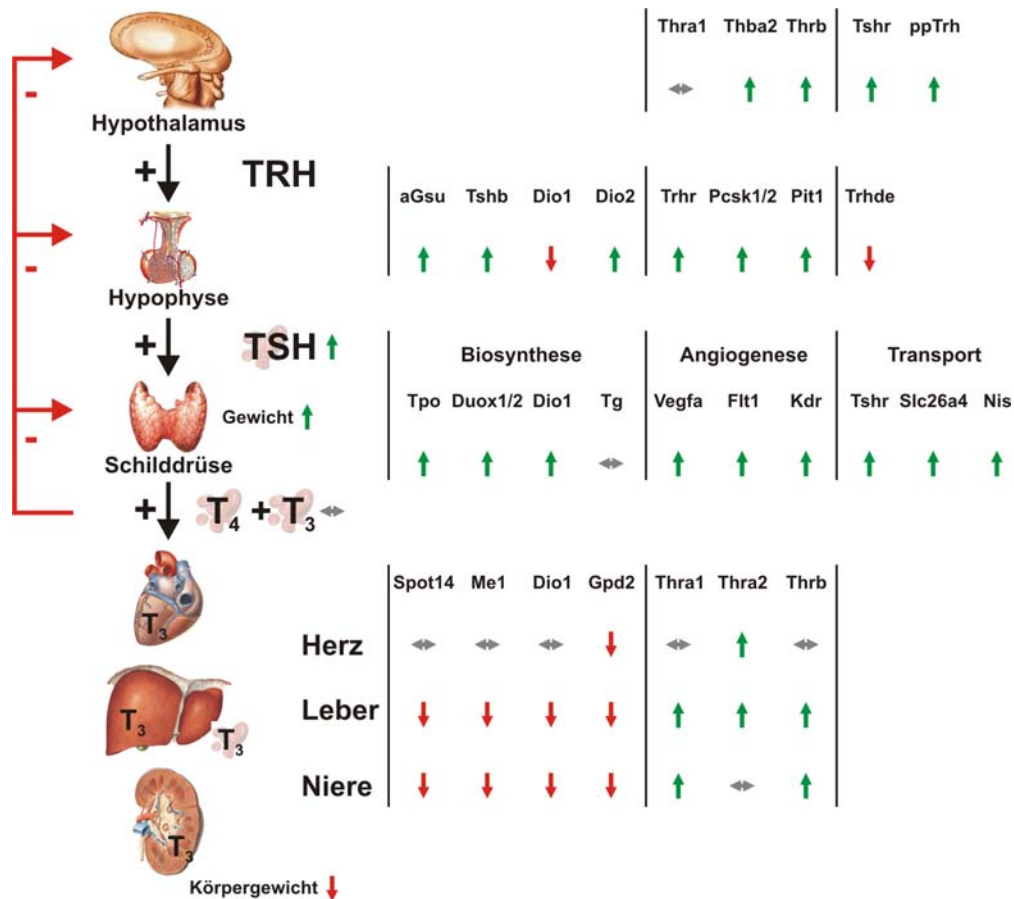


Abb. 45: Wirkung von 4-MBC nach subakuter Applikation in der Ratte.

Zusammenfassung der erhobenen Expressionsdaten entlang der thyreotropen Achse (links) inklusive der peripheren Organe Herz, Leber und Niere. 4-MBC wirkt auf allen Ebenen der Regulation und des Stoffwechsels, wobei nach subakuter Applikation keine Veränderung der T₄- bzw. T₃-Spiegel im Serum detektiert wurde. Auf Ebene der thyreotropen Achse wurde eine verminderte Expression aller Gene mit regulatorischer Funktion sowie der an Stoffwechsel und Transport beteiligten Gene reduziert. Ausgenommen sind Tg und Slc26A4 auf Ebene der Schilddrüse, sowie Dio1 und Trhde, welches gegenläufig zu Trhr reguliert ist. Alle Zielorgane sind gleichsinnig betroffen und zeigen erhöhte Expression der TRs bei reduzierter Expression der T₃-regulierten Gene Spot14, Me1, Dio1 und Gpd2, allerdings mit abgeschwächter Beteiligung des Herzens. Als trophische Effekte ergeben sich bei verstärkter Expression an der Angiogenese beteiligter Genen ein erhöhtes Gewicht der Schilddrüse und ein reduziertes Körpergewicht nach Applikation von 4-MBC.

Die konsistente Wirkung von 4-MBC auf allen Ebenen der thyreotropen Achse lässt keine abschließende Betrachtung der primären Wirkung von 4-MBC zu. Insbesondere die Wirkung auf die 5'-Deiodasen könnte direkt oder sekundär sein, wobei die

unterschiedliche Regulation in Schilddrüse und Peripherie einen sekundären Effekt vermuten lässt. Die unveränderte Konzentration von T_4 und T_3 im Serum impliziert eine Wirkung von 4-MBC auf die freie Schilddrüsenhormonkonzentration. Vorläufige Daten aus der Arbeitsgruppe sprechen jedoch gegen eine Wirkung von 4-MBC auf die T_4/T_3 -Bindeproteine. Theoretisch kann 4-MBC auch als cAMP-Analogen die Freisetzung von TSH und die Expression von NIS stimulieren, jedoch sind dazu weiterführende Untersuchungen notwendig, z.B. die Verwendung von cAMP Antagonisten *in vitro*.

4.2.3 Vergleich chronischer und subakuter Applikation von 4-MBC

Die Charakterisierung der hier erstmals mechanistisch diskutierten chronischen und subakuten Effekte des UV-Filters 4-MBC zeigte, dass das Kampferderivat, unabhängig von der östrogenen Wirkung der Substanz, nicht nur mit der gonadotropen Achse interferiert, sondern darüber hinaus auch eine Dysregulation der thyreotropen Achse bewirkt, die den molekularen Veränderungen einer primären Hypothyreose entspricht (Stockigt 2003). Die Serumanalyse chronisch behandelte ovariektomierter Sprague-Dawley-Ratten zeigte analog einer Iodmangelstruma parallel zu einer signifikant erhöhten Serumkonzentration von TSH ein gestörtes Verhältnis von $T_4:T_3$ (Kronenberg et al. 2007). Angesichts dieser Informationen liegt die Vermutung nahe, dass dem Organismus keine ausreichenden Kompensationsmechanismen zur Verfügung stehen, um diese Dysregulation der thyreotropen Achse bei chronischer Exposition auszugleichen. Demgegenüber deuten die Ergebnisse der subakuten Applikation des UV-Filters einen multifaktoriellen Mechanismus von 4-MBC an, da trotz eines nahezu unveränderten Schilddrüsenhormonstatus eine deutliche Erhöhung der TSH-Konzentration im Serum festgestellt wurde, die möglicherweise durch verändertes alternatives Spleißen des hypothalamisch exprimierten *Thra2* zu erklären ist; jedoch sind für die Verifikation des hier postulierten Wirkmechanismus weitere Untersuchungen notwendig. Daneben ist auch der adverse Effekt von 4-MBC auf die Schilddrüse bereits bei subakuter Applikation ersichtlich, da die Inhibition des Iodidtransports, die sich *in vitro* durch eine drastisch verminderte Transportrate ^{125}I -markierten Iodids in das Follikellumen von FRTL-5-Zellen darstellt, mit einer Hemmung der Schilddrüsenhormonbiosynthese assoziiert ist. Morphologische und funktionelle Analysen der Schilddrüse bestätigen zudem die thyreostatische Wirkungsweise von 4-MBC, da entsprechend der erhöhten TSH-Konzentration im Serum eine über TSH-R vermittelte induzierte Expression von NIS festgestellt wurde, obgleich die Störung der Schilddrüsenhormonbiosynthese erst bei langfristiger Exposition zu einer signifikanten

Reduktion der T₄-Konzentration im Serum führte. Dagegen wurde in peripheren Organen unabhängig von der Expositionsdauer beispielsweise eine verringerte Aktivität der DIO1 sowie eine Repression T₃-regulierter Gene detektiert, so dass davon auszugehen ist, dass bereits minimale Schwankungen des bioverfügbaren T₄ bzw. T₃ die periphere Genexpression beeinflussen.

Neben 4-MBC wurden auch für den UV-Filter Benzophenon-2 (BP2) in einer vergleichbaren Studie thyreostatische Eigenschaften nachgewiesen, dessen Einsatz zur Herstellung von Kosmetika gemäß EU-Verordnung zwar untersagt ist, der jedoch weiterhin zum Produktschutz von Gummi- und Plastikerzeugnissen eingesetzt wird. Im Gegensatz dazu ist die Verwendung von BP2 in kosmetischen Produkten des asiatischen Marktes lediglich auf 10 % (w/w) limitiert. Interferenzen mit der thyreotropen Achse wurden zunächst im Zusammenhang mit *in vivo*-Analysen ovariectomierter Sprague-Dawley-Ratten festgestellt, da infolge *per oraler* Aufnahme der UV-Filtersubstanz ein Anstieg der Serumkonzentration von TSH sowie eine Reduktion der T₄-Konzentration in der Zirkulation detektiert wurde (Schmutzler et al. 2007). Unter Verwendung eines *hrTPO* basierten *in vitro*-Assays konnte BP2 als potenter Inhibitor der TPO identifiziert werden, der mit einem IC₅₀-Wert von 0,45 µmol/l im Guaiacol-Assay und 0,37 µmol/l im Iodoxidationsassay ca. 20 - 200-fach niedrigere IC₅₀-Werte aufweist als die klassischen Thyreostatika MMI und PTU (Schmutzler et al. 2007).

Die gesundheitlichen Risiken humaner Exposition sind derzeit nicht vollständig absehbar, jedoch geben die hier analysierten Daten auch unter Berücksichtigung der in männlichen und weiblichen Probanden nach transdermaler Applikation von 4-MBC detektierten Plasmakonzentrationen von 80 - 200 nM Anlass, den Wirkmechanismus dieser goitrogenen Substanz weiter aufzuklären und das von UV-Filtern ausgehende endokrine Potential in Bezug auf die gonadotrope wie auch auf die thyreotrope Achse keinesfalls zu unterschätzen (Janjua et al. 2004; Schauer et al. 2006). Zudem sind angesichts der von Maerkel et al. durchgeführten generationsübergreifenden Experimente, die unter Verwendung von Long-Evans-Ratten insbesondere für männliche Tiere bei einer Konzentration von 24 mg/kg b.w. einen verringerten Schilddrüsenhormonstatus beschreiben, neben ausführlicheren Untersuchungen der geschlechtsspezifischen Effekte hinsichtlich der thyreotropen Achse weiterführende Studien zur detaillierten Analyse möglicher Entwicklungsdefekte des ZNS notwendig, da die im adulten Tier bei chronischer Applikation nachgewiesene Hypothyreose die prä- und postnatale Entwicklung geistiger und motorischer Leistungen einschränken

kann (Bernal 2002; Radetti et al. 2002; Schlumpf et al. 2004b; Zoeller und Rovet 2004; Maerkel et al. 2007).

4.3 Speziespezifische Wirkungen von EACs auf die thyreoptrope Achse

Das Gros endokrinologischer Untersuchungen zur Toxizitätsprüfung wird nach OECD- bzw. U.S. EPA-Richtlinien unter Verwendung von Wistar- bzw. Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, die entsprechend ihrer Homologie entwicklungs-genetischer und metabolischer Prozesse das bevorzugte Tiermodell darstellen, während mechanistische Analysen aufgrund des definierten exogenen Milieus zumeist in Zellkulturmodellen erfolgen (Menditto und Turrio-Baldassarri 1999; Younes 1999; Colborn 2002; Yamasaki et al. 2002; Cho et al. 2003; Zoeller et al. 2007).

Demgegenüber spielten Mausmodelle bezüglich der Charakterisierung exogener Substanzen bislang eine eher untergeordnete Rolle, sodass angesichts der wenigen zur Verfügung stehenden Literaturangaben, welche toxikologische Untersuchungen im murinen Modell beschreiben, die Kalkulation der Dosierungen zunächst in Anlehnung an den für GEN bekannten ADI-Wert mit Hilfe eines Faktors erfolgte, dessen Berechnung inklusive aller notwendigen Hintergrundinformationen in 3.4 näher erläutert ist. Darüber hinaus bildet die Analyse der hier diskutierten Vorversuche zur Dosisfindung im Wildtyp-Mausmodell (129S2/SvPasCrl; C57BL/6) auch die Basis der anschließend in 4.4 erläuterten Untersuchungen zur Charakterisierung TR-vermittelter Effekte von EACs im TR α ^{0/0}-Modell.

Die für das in erster Linie als Sojainhaltsstoff bekannte Isoflavonoid GEN ausgewählte Dosierung lag mit 2,5 - 15 mg/kg b.w. durchaus im Bereich humanrelevanter Konzentrationen. Neben Sojapräparaten, die zur Behandlung klimakterischer Beschwerden als Alternative zur Hormonersatztherapie eingesetzt werden, stellen insbesondere bei Laktoseintoleranz verabreichte Säuglingsdiäten auf Sojabasis ein gesundheitliches Risiko hinsichtlich der thyreotropen Achse dar (Irvine et al. 1998; Setchell et al. 1998; Doerge und Sheehan 2002; Wuttke et al. 2002). Zudem belegt eine von Setchell et al. veröffentlichte Studie, dass die von Säuglingen und Kleinkindern über sojabasierte Ersatzdiäten aufgenommenen Konzentrationen an Isoflavonoiden östrogen wirksame Dosierungen um ein Vielfaches überschreiten (Setchell et al. 1997). Im Kontext mit einer von Janjua et al. publizierten humanen

Studie, die nach dermalen Applikation einer speziell angefertigten Formulierung eine ~ 30 %ige Resorption der UV-Filtersubstanz 4-MBC beschreibt, wurde auch unter Berücksichtigung der in 4.2 diskutierten Daten eine Dysregulation der thyreotropen Achse infolge der hier gewählten Dosierungen des Kampferderivats von 62,5 - 185 mg/kg b.w. angenommen (Janjua et al. 2004). Überdies sind angesichts des von Schauer et al. analysierten Bioakkumulationspotentials der Testsubstanz die Folgen dauerhafter Applikation in Bezug auf entwicklungsphysiologische Prozesse derzeit nur schwer einzuschätzen, sodass diesbezüglich weiterführende Studien dringend erforderlich sind (Schauer et al. 2006).

Die Analyse der in 129S2/SvPasCrl- bzw. C57BL/6-Tieren erhobenen Daten zeigte jedoch, dass bei einem adäquaten Versuchsdesign speziesspezifische Effekte auftreten können, welche die Interpretation der Ergebnisse und deren Extrapolation hinsichtlich des humanen Gefährdungspotentials erschweren.

4.3.1 Effekte von 4-MBC im Wildtyp-Mausmodell

Schilddrüsenhormone beeinflussen in Vertebraten und Invertebraten die Regulation von Entwicklung, Wachstum und Metabolismus und sind überdies für die Aufrechterhaltung der Homöostase durch Adaptation an äußere Veränderungen verantwortlich (Heyland et al. 2005; Tan und Zoeller 2007). Insbesondere Amphibien eignen sich aufgrund ihrer kurzen Generationsdauer sowie exakt definierbarer experimenteller Bedingungen gegenüber anderen *in vivo*-Modellen auch für Hochdurchsatz-Screenings zur Klassifizierung thyreomimetischer bzw. thyreostatischer Substanzen, da die Metamorphose als T₃-abhängiger Prozess der Entwicklung einen sensitiven Indikator für Störungen der thyreotropen Achse darstellt (Tata 1999; Opitz et al. 2005; Kloas und Lutz 2006; Opitz et al. 2006). Im Krallenfrosch *X. laevis*, der im Vergleich zu anderen aquatischen Lebewesen äußerst sensitiv auf Veränderungen des umgebenden Milieus reagiert, führte die Applikation von 4-MBC zu Modifikationen ER-vermittelter Signalwege physiologischer und metabolischer Prozesse und bestätigte somit die östrogene Wirkungsweise des als ER-Liganden beschriebenen UV-Filters (Klann et al. 2005; Schlumpf et al. 2008). Dagegen korrelierten die in ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten nachgewiesenen Interferenzen mit der thyreotropen Achse nicht mit den von Kunz et al. publizierten Ergebnissen, die bei unveränderter Rumpf- und Schwanzlänge gegenüber den Kontrolltieren keine adversen Effekte von 4-MBC

auf die Metamorphose von *X. laevis* feststellen konnten und somit eine speziesabhängige Wirkung des UV-Filters andeuteten (Kunz et al. 2004).

Innerhalb der Vertebraten sind T_3 -regulierte Prozesse hoch konserviert - trotz allem erfolgt die Charakterisierung entwicklungsgenetischer oder physiologischer Effekte von EACs weitgehend in Ratten- und Mausmodellen, die bezüglich der gonadotropen Achse von Padilla-Blanks et al. als gleichwertige Tiermodelle zur Untersuchung exogener Substanzen beschrieben werden (Padilla-Banks et al. 2001). Diese Aussage ist hinsichtlich der untersuchten EACs und ihrer Wirkung auf die thyreotrope Achse nur bedingt zutreffend, denn neben den nachfolgend in 4.3.2 diskutierten positiv korrelierenden Effekten der (Iso-)Flavonoide GEN und F21388, die auch im Mausmodell eine Dysregulation der Schilddrüsenhormonbiosynthese zur Folge hatten, wurden nach Applikation des UV-Filters 4-MBC speziesspezifische Effekte der Testsubstanz festgestellt. Während in ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten eine gestörte Feedbackregulation der thyreotropen Achse wie auch eine direkte Beeinträchtigung der Schilddrüsenhormonbiosynthese durch Inhibition des Iodidtransports nachgewiesen wurde, lieferte der Vergleich mit murinen Wildtyptieren (129S2/SvPasCrl; C57BL/6) unabhängig von Applikationsform, Expositionszeit und Geschlecht keine Übereinstimmung mit den in Ratten detektierten Befunden, was insbesondere auch die im Wildtyp fehlende Induktion negativ regulierter Markergene des hypophysären Feedbacks betraf. Auch der Vergleich der Expressionsdaten verschiedener zur Dosisfindung durchgeführten Vorversuche lieferte keine konsistenten Resultate bezüglich der präferentiell untersuchten Feedback-assoziierten Gene *Tshb* und *Dio2* (Abb. 33 A, B; Daten nicht gezeigt).

Ferner zeigten die Untersuchungen zum pharmakokinetischen Profil der Testsubstanz keinen signifikanten Einfluss von 4-MBC auf hepatische Biotransformationsprozesse, da die Expression des Xenobiotika-sensitiven konstitutiven Androstan-Rezeptors (CAR/Nr1i3) wie auch die mRNA-Konzentrationen der als Phase II-Enzyme bezeichneten Sulfotransferasen *Sult1c1* und *Sult1e1*, die durch Konjugation die Löslichkeit und somit die biliäre bzw. renale Ausscheidung von endogenen und exogenen Substanzen begünstigen, unbeeinflusst blieb (Daten nicht gezeigt) (Wei et al. 2000; Maglich et al. 2002). Diese Effekte sind unter Berücksichtigung der von Völkel et al. im Serum detektierten Metabolite 3-(4-Carboxybenzyliden)-6-hydroxycampher und 3-(4-Carboxybenzyliden)campher, deren Verhältnis mitunter durch die Applikationsform beeinflusst wird, vermutlich auf Speziesunterschiede der Regulation enterohepatischer Cytochrom P450-vermittelter Signalwege zurückzuführen (Schauer

et al. 2006; Völkel et al. 2006). Nicht nur die Transkription des in Leber und Darmmukosa exprimierten Pregnan-X-Rezeptors (PXR/Nr1i2), sondern auch die mRNA-Synthese der konstitutiv exprimierten und am *first pass*-Metabolismus beteiligten Monooxygenasen Cyp2a, Cyp2b und Cyp3a wird durch Xenobiotika speziesspezifisch induziert (Makowski et al. 1982; Moore und Kliewer 2000; Su und Ding 2004; Kretschmer und Baldwin 2005). Schließlich stellt auch die durch Glucuronidasen und Sulfotransferasen katalysierte Inaktivierung von Iodthyroninen durch Konjugation der phenolischen Hydroxylgruppe, welche die Bioverfügbarkeit zirkulierender FT₄- und FT₃-Konzentrationen direkt beeinflusst, ein potentielles Ziel verschiedenster EACs dar; jedoch ist die Untersuchung der Schilddrüsenhormonkonjugate aufgrund fehlender adäquater analytischer Verfahren derzeit nur begrenzt möglich (Brouwer et al. 1998; Schuur et al. 1998; Ebmeier und Anderson 2004; Hamers et al. 2006).

Die Analyse der Daten zeigte deutlich, dass die in weiblichen Sprague-Dawley-Ratten nachgewiesene thyreostatische Wirkung der UV-Filtersubstanz nicht direkt auf andere Spezies übertragbar ist, weshalb diese Substanz letztlich nicht im TR α ^{0/0}-Modell untersucht wurde, da die in Wildtyptieren beobachteten Effekte von 4-MBC zunächst weitere Analysen erfordern. Die Wahl des Modellsystems zur Beurteilung und Charakterisierung toxikologischer Effekte exogener Substanzen natürlichen oder synthetischen Ursprungs und deren Wirkmechanismus ist damit von essentieller Bedeutung, da neben Spezies und Geschlecht auch die Applikationsform das pharmakokinetische Profil der Testsubstanzen entscheidend beeinflussen kann und somit eine Beurteilung der humanrelevanten Toxizität erschwert (Kato und Yamazoe 1992; Su und Ding 2004).

4.3.2 Effekte von GEN und F21388 im Wildtyp-Mausmodell

Das Isoflavonoid GEN, das wie andere flavonoidhaltige Pflanzenauszüge wegen seiner östrogenen Eigenschaften auch als Alternative zur Hormonersatztherapie eingesetzt wird, zeigt bei inadäquater Iodversorgung goitrogene Wirkung und begünstigt somit die Strumabildung (van Wyk et al. 1959; Hydovitz 1960). Der Konsum von Sojaprodukten birgt daher insbesondere für Säuglinge und Kleinkinder, die vornehmlich bei diagnostizierter Laktoseintoleranz, aber auch bei Prädisposition für allergische Erkrankungen Ersatzdiäten auf Sojabasis erhalten, gesundheitliche Risiken (Barrett 2002; Chen und Rogan 2004). Dazu wird bei paralleler Behandlung einer

(kongenitalen) Hypothyreose in der Regel eine Korrektur der Levothyroxindosis (LT_4) erforderlich, da GEN die Bioverfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen beeinflusst, indem der sekundäre Pflanzeninhaltsstoff bereits bei Serumkonzentrationen von $0,1 \mu\text{M}$ mit dem Transport von T_4 und T_3 interferiert, während nach dem Verzehr sojabasierter Säuglingsdiäten mit $2 - 7 \mu\text{M}$ wesentlich höhere Konzentrationen des Polyphenols im Serum erreicht werden (Doerge und Sheehan 2002; van der Heide et al. 2003; Messina und Redmond 2006; Radovic et al. 2006). Ein von Román et al. publizierter Übersichtsartikel verdeutlicht überdies den kausalen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Inzidenz von Autismus und transientser intrauteriner Hypothyroxinämie, welche auch durch den maternalen Konsum flavonoidhaltiger Nahrungsmittel ausgelöst werden kann, da die zerebralen Modifikationen, die mit einem Schilddrüsenhormonmangel im ersten Trimester einer Schwangerschaft assoziiert sind, den morphologischen Veränderungen der kortikalen Strukturen dieser Patienten äußerst ähnlich sind (Román 2007). Ferner scheint die von Pinchera et al. beschriebene Malabsorption des synthetischen LT_4 durch eine vermehrte fäkale Ausscheidung des Supplements begründet, da neben tierexperimentellen Analysen auch in einer humanen Studie gezeigt werden konnte, dass der Konsum von Sojaprodukten mit einer erhöhten Exkretion von T_4 assoziiert ist (van Middlesworth 1957; Pinchera et al. 1965). Die heterogenen Ergebnisse humaner Studien erfordern weiterführende Untersuchungen, die den Wirkmechanismus wie auch die systemischen Effekte von GEN näher charakterisieren, um schließlich das endokrine Potential hinsichtlich der thyreotropen Achse und damit auch die Wirkung auf Wachstum und Entwicklung beurteilen zu können, da eine Risikoabschätzung auf Basis einer Serumanalyse die komplexen Regulationen oftmals nur partiell erfasst (Duncan et al. 1999a; Duncan et al. 1999b; Bruce et al. 2003).

Dagegen sind für das als Referenzsubstanz eingesetzte synthetisch erzeugte Flavonoid F21388, ein bromiertes Derivat des natürlich vorkommenden Luteolins, das ursprünglich als T_4 -Analogon entwickelt wurde, keine humanen Daten verfügbar, da tierexperimentelle Analysen bei perinataler Exposition eine Dysregulation der thyreotropen Achse im Fetus zeigten (Köhrle et al. 1988; Pedraza et al. 1996). Ähnlich der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Effekte von GEN beruht die teratogene Wirkung des Flavonoids in erster Linie auf Interferenzen mit dem Transportprotein TTR, so dass nicht nur die Bioverfügbarkeit von T_4 beeinträchtigt wird, sondern darüber hinaus auch die Akkumulation des Flavonoids in Gehirn und peripheren Geweben begünstigt wird, wodurch weitreichende Folgen für die fetale

Entwicklung äußerst wahrscheinlich sind (Schröder-van der Elst et al. 1997; Schröder-van der Elst et al. 1998; Chang et al. 2000).

Im Gegensatz zu F21388, dessen Wirkung auf die thyreotrope Achse auch in Abhängigkeit des Expositionszeitraums in der Ratte umfassend charakterisiert ist, sind für GEN in erster Linie Informationen hinsichtlich der thyroidalen Wirkung des Isoflavonoids bekannt, so dass für die Durchführung der Dosisfindungsversuche im Wildtyp-Mausmodell (129S2/SvPasCrl) initial ein Applikationszeitraum von 5 Tagen gewählt wurde (Divi et al. 1997; Doerge und Sheehan 2002; Hamann et al. 2006). Die Applikation der strukturell verwandten Testsubstanzen erfolgte bei Konzentrationen von 2,5 - 15 mg/kg b.w. mittels subkutaner Injektion, um auch während der Untersuchungen zur chronischen Exposition im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell eine exakte Applikation der Testsubstanzen zu ermöglichen. Die Wahl der Dosierung erfolgte auf Basis der mittels RIA durchgeführten Serumanalysen wie auch unter Berücksichtigung der Transkriptanalyse der in 4.3.1 angesprochenen Markergene des hypophysären Feedbacksystems, da infolge einer Regulation auf hypophysärem Niveau weitere Modifikationen der thyreotropen Achse in peripheren Geweben zu erwarten waren.

Die Resultate dieses Akutversuchs zeigten einen leichten, aber nicht signifikanten Effekt von GEN auf die Serumkonzentration von TSH, der sich in der Hypophyse auch durch reduzierte Transkriptmengen von Tshb und Dio2 widerspiegelte, wohingegen die Serumparameter T₄ und T₃ nahezu unverändert blieben (Abb. 33 A - D; Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde nach Applikation von F21388 parallel zu einer signifikanten Suppression der TSH-Sekretion auch eine Reduktion der T₄-Spiegel detektiert, während die mRNA-Konzentration der untersuchten hypophysären Markergene um wenigstens Faktor 2 verringert war, wodurch sich F21388 deutlich von der klassischen Wirkungsweise der Thyreostatika MMI/NaClO₄ (MMI) unterscheidet (Abb. 33 A - D; Daten nicht gezeigt). Der Vergleich mit den von Chang et al. publizierten Daten zeigt, dass die im Wildtyp detektierte Suppression der TSH-Konzentration nach Applikation von GEN möglicherweise einen speziesspezifischen Effekt darstellt, da in der Ratte keine Veränderung der Serumparameter festgestellt wurde, allerdings beziehen sich diese Angaben auf einen wesentlich längeren Expositionszeitraum (Chang und Doerge 2000). Die Repression der hypophysären Markergene legt jedoch die Vermutung nahe, dass bei unveränderter T₄-Konzentration im Serum der Anteil an FT₄ durch die bereits beschriebenen Interferenzen mit dem Bindungsprotein TTR erhöht wird und infolge dessen bei subakuter Applikation des Isoflavonoids eine leichte TSH-Suppression zu beobachten ist, solange die durch GEN

inhibierte Biosynthese der Schilddrüsenhormone noch durch intrazellulär gebundenes T_4 kompensiert werden kann. Eine Studie von White et al., die den Einfluss von Soja auf die Serumparameter T_4/FT_4 und T_3/FT_3 untersucht, zeigt mit einem leichten Anstieg der FT_4 -Konzentration um 14 % einen moderaten Effekt auf die thyreotrope Achse und unterstützt damit diese Hypothese (White et al. 2004). Das synthetische Flavonoid F21388 beeinträchtigt ebenso wie GEN den Transport von Schilddrüsenhormonen, indem es als kompetitiver Inhibitor T_4 aus der Bindung des Transportproteins TTR verdrängt, das in Nagetieren das einzige spezifische Transportprotein für T_4 darstellt, während in der humanen Zirkulation T_4 nur zu ca. 20 % an das tetramere Serumprotein TTR gebunden ist (Köhrle et al. 1989; Mendel et al. 1992; Cody 2002). Abhängig von der Expositionszeit wurden nach akuter Applikation von F21388 entsprechend der transient erhöhten FT_4 -Konzentrationen durch Interferenz mit dem Bindungsprotein TTR reduzierte TSH-Konzentrationen im Serum festgestellt, die aber im Gegensatz zu T_4 und T_3 , deren Serumkonzentration durch Injektion der Testsubstanz reduziert wurde, vermutlich nur vorübergehender Natur sind, da zumindest in der Ratte bei längeren Expositionszeiten keine anhaltenden Veränderungen der TSH-Konzentration detektiert wurden, was potentiell auf eine Verschiebung des physiologischen *Setpoints* hindeutet (Köhrle et al. 1988; Köhrle et al. 1989; Lueprasitsakul et al. 1990; Abend et al. 1991; Schröder-van der Elst et al. 1991). Somit scheint die im Wildtyp-Modell detektierte Suppression der TSH-Freisetzung auf speziesspezifische Unterschiede bezüglich der Regulation des thyreotropen Feedbacks oder aber auf Differenzen bezüglich der *Clearance*-Rate von T_4 und T_3 zurückzuführen sein, da auch die subkutane Injektion des strukturell verwandten Isoflavonoids GEN nach subakuter Applikation zu einer leichten Reduktion der TSH-Spiegel führte (Kaptein et al. 1993). Da in beiden Tiermodellen eine um wenigstens 25 % reprimierte Genexpression von Dio2 detektiert wurde, ist in Anlehnung an die von Mendel et al. beschriebene „freie Hormonhypothese“ davon auszugehen, dass die Suppression der TSH-Freisetzung indirekt durch den Anstieg der FT_4 -Konzentration im Serum vermittelt wird, wohingegen Lim et al. einen direkten Effekt von F21388 auf die TSH-Sekretion in primären Hypophysenzellkulturen postulieren (Köhrle et al. 1989; Mendel 1989; Abend et al. 1991; Lim et al. 1996). Darüber hinaus zeigte die initiale Analyse peripherer Wirkungen im Wildtyp-Mausmodell eine Reduktion der hepatischen Deiodaseaktivität nach Applikation von GEN, während die enzymatische Aktivität der DIO1 durch F21388 nicht signifikant beeinflusst wurde, wodurch die vornehmlich in Zellkulturmodellen erhobenen Daten weitgehend bestätigt wurden (Daten nicht gezeigt) (Köhrle et al. 1988; Köhrle et

al. 1989; Lueprasitsakul et al. 1990; Schröder-van der Elst et al. 1991; Mori et al. 1996; Schröder-van der Elst et al. 1997).

Die Analyse der Dosisfindungsversuche zeigt, dass die für GEN und F21388 kalkulierten Dosierungen auch im Wildtyp-Mausmodell eine Dysregulation der thyreotropen Achse bewirken, wobei für die nachfolgend in 4.4 erörterten Untersuchungen im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell eine Konzentration von 7,5 mg/kg b.w. gewählt wurde, da diese Konzentration in Bezug auf GEN der täglich aufgenommenen Sojamege von Säuglingen und Kleinkindern entspricht, deren Gefährdungspotential während einer entwicklungsphysiologisch sensiblen Phase derzeit nicht abschließend beurteilt werden kann.

4.4 Analyse TR-vermittelter Effekte von (Iso-)Flavonoiden im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell

Interferenzen exogener Substanzen mit der gonadotropen Achse werden in erster Linie durch Bindung an Steroidhormonrezeptoren vermittelt, sodass sich die (anti)androgene bzw. (anti)östrogene Wirkung von EACs häufig über ihren Einfluss auf Steroidhormon-regulierte Genexpression manifestiert. Eine Konformationsänderung des Rezeptors verändert nicht nur dessen Stabilität, sondern beeinflusst auch die Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie sowie den Phosphorylierungsstatus (Landel et al. 1994). Da auch TRs aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Steroidhormonrezeptoren der Superfamilie nukleärer Rezeptoren angehören, ist eine Interaktion der thyreotropen Achse mit TR-vermittelten Effekten von EACs plausibel (Evans 1988). So zeigen beispielsweise Zellkulturexperimente mit Bisphenol A (BPA), welches bei der industriellen Fertigung verschiedenster Konsumgüter vor allem als Weichmacher verwendet wird, aber auch als Bestandteil von Epoxyharzen in Verbundmaterialien z.B. in der Zahnmedizin zum Einsatz kommt, dass diese phenolische Substanz durch T₃-antagonistische Wirkung mit der thyreotropen Achse interferiert, indem es mit T₃ um die Bindung an TR α konkurriert und überdies die Rekrutierung von CoR begünstigt, so dass die Expression T₃-regulierter Gene inhibiert wird (Olea et al. 1996; Moriyama et al. 2002; Iwamuro et al. 2003; Zoeller 2007).

Die Identifizierung und Charakterisierung TR-vermittelter Effekte ist prinzipiell auch mit Hilfe von *in vitro*-Analysen wie beispielweise Ligandenbindungsassays möglich, jedoch bleibt auf diese Weise die Unterscheidung agonistischer und antagonistischer Effekte

offen (Furlow et al. 2004). Auch Reporterassays, die mitunter zur Charakterisierung genregulatorischer DNA-Sequenzen eingesetzt werden und im Gegensatz zu anderen *in vitro*-Assays eine Unterscheidung agonistischer und antagonistischer Effekte ermöglichen, erlauben keine Aussage hinsichtlich Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Exkretion exogener Substanzen (DeVito et al. 1999). Fundierte Aussagen hinsichtlich der komplexen *in vivo*-Situation sind somit ausschließlich im Tiermodell möglich, da Schilddrüsenhormone für physiologische Regulationsvorgänge wie Thermogenese, Struktur- und Intermediärstoffwechsel sowie entwicklungsbiologische Prozesse, insbesondere für die Entwicklung des Nervensystems, aber auch für Körper- und Knochenwachstum essentiell sind (Yen 2001). Zudem weisen TR α und TR β nicht nur gewebespezifische Expressionsmuster auf, sondern beeinflussen auch abhängig vom Entwicklungsstatus eines Organismus entsprechend ihrer Funktion als ligandenmodulierte Transkriptionsfaktoren die Expression T₃-regulierter Gene.

Die Untersuchungen zur Rezeptorinteraktion der in 4.3 näher charakterisierten (Iso-)Flavonoide wurden im TR α ^{0/0}-Modell durchgeführt, das sich im Vergleich zu anderen TR α ^{-/-}-Modellen durch die Deletion aller Spleißvarianten des TR α -Locus auszeichnet, die jeweils einzeln zur Ausprägung sehr unterschiedlicher Phänotypen führen (O'Shea und Williams 2002; Flamant und Samarut 2003). Der Vergleich mit TR β ^{-/-}-Tieren unterstreicht den Vorteil dieses Tiermodells, das einen euthyreoten Schilddrüsenhormonstatus aufweist, während TR β -defiziente Tiere mit einer deutlichen Erhöhung der TSH-Konzentration im Serum die Schlüsselrolle von TR β hinsichtlich der Kontrolle des *Setpoints* der thyreotropen Achse verdeutlichen (Forrest et al. 1996; Gauthier et al. 2001). Somit stellen TR α -defiziente Tiere ein ideales Modell zur Untersuchung der TR-vermittelten Wirkung bekannter goitrogener Substanzen dar, da in diesem Modell agonistische wie auch antagonistische Effekte gleichermaßen untersucht werden können. Zudem weisen TR α ^{0/0}-Tiere eine höhere Sensitivität gegenüber Schilddrüsenhormonen auf, sodass nach Applikation der Referenzsubstanzen T₄ und MMI/NaClO₄ (MMI) eine Verstärkung der Effekte zu erwarten war, wobei MMI/NaClO₄ im Vergleich zu MMI allein eine schnellere Iodiddepletion der Schilddrüse bewirkt und somit die Ausbildung einer Hypothyreose beschleunigt (Hildebrandt und Halmi 1981; Macchia et al. 2001). Basierend auf den Ergebnissen der in 4.3 diskutierten Vorversuche zur Dosisfindung wurden die (Iso-)Flavonoide GEN und F21388 über einen Expositionszeitraum von 4 Wochen mit einer Konzentration eingesetzt, die der chronischen Belastung von Säuglingen und

Kleinkindern entspricht, die beispielsweise aufgrund einer Laktoseintoleranz sojabasierte Säuglingsdiäten erhalten.

4.4.1 Hypersensitivität gegenüber T₄ und MMI/NaClO₄

Nachdem für die männlichen TR α -defizienten Tiere die Hypersensitivität gegenüber T₄ und PTU in der Literatur dokumentiert ist, ergab die erweiterte Untersuchung des Tiermodells geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Induktion von Hyper- und Hypothyreose (Macchia et al. 2001).

Zur initialen Phäntypisierung der EACs wie auch der Referenzsubstanzen T₄ und MMI/NaClO₄ wurde die Gewichtsentwicklung der behandelten Tiere nach Applikation der Testsubstanzen dokumentiert (Abb. 35). Die Kombination der Thyreostatika MMI und NaClO₄ führte zu einer Gewichtsreduktion - ein Effekt, der in der Literatur beschrieben ist, jedoch nicht zwingend auf die thyreostatische Wirkung der Substanzen zurückgeht, obwohl die Hypothyreose u.a. durch Retention von Salz und Wasser in der Regel zu erhöhtem Körpergewicht führt (Akatsuka et al. 1979; Kronenberg et al. 2007). Wie in Abb. 35 dargestellt, zeigten die weiblichen TR α ^{0/0}-Tiere einen ausgeprägteren Gewichtsverlust verglichen mit männlichen Knockouttieren, der zudem bereits eine Woche früher signifikant war.

Der TR α -Knockout zeigte normale TSH-Spiegel trotz erniedrigtem T₄, was als erhöhte T₄-Sensitivität interpretiert werden muss und durch die Unterbindung der konstitutiv negativen Genregulation von TR α vermittelt werden könnte (Macchia et al. 2001). In den T₄-behandelten Positivkontrollen, die sowohl Effekte auf die thyreotrope Achse, als auch auf die Konversion von T₄ in T₃ einschließen, bestätigte sich das Ausbleiben der TSH-Antwort (Abb. 36). Im Gegensatz dazu führte die Induktion von Hypothyreose durch MMI allein in männlichen Knockouttieren zu der erwarteten Suppression von T₄ und T₃ mit einer stark erhöhten TSH-Konzentration im Serum. Die Serumwerte weiblicher Tiere waren dagegen nur marginal verändert, was insbesondere vor dem Hintergrund der geschlechtsunabhängig verstärkten Expression von Tshb in der Hypophyse nicht zu erwarten war. In den weiblichen Knockouttieren ließ sich demzufolge ein primärer Effekt auf Ebene der Hypophyse feststellen, da hier zusätzlich die Expression Feedback-assoziiertes Gene im Hypothalamus nicht verändert war (Abb. 37). Im Gegensatz dazu wurde in männlichen Tieren nach Induktion einer Hypothyreose eine erhöhte Expression von Tshr und insbesondere ppTrh im

Hypothalamus festgestellt, die konsistent mit den erhöhten TSH-Serumwerten und erniedrigtem T_4 war. Des Weiteren waren nur in männlichen Knockouttieren *Thrb1* und *Thrb2* kompensatorisch hochreguliert. Insgesamt zeigte sich auf allen Ebenen der thyreotropen Achse ein deutlicher geschlechtsspezifischer Unterschied bezüglich der Antwort auf MMI im $TR\alpha^{0/0}$ -Modell.

Die hypothalamische Genregulation nach Applikation von T_4 entsprach den Erwartungen für Patienten mit Hyperthyreose, da in beiden Geschlechtern eine Reduktion der Expression von TSH-Rezeptor und *ppTrh* nachgewiesen wurde (Kronenberg et al. 2007). Gleiches gilt für die Genexpression in der Hypophyse, die konsistent zwischen den Geschlechtern war und die Suppression von *Tshb* durch T_4 in beiden Geschlechtern einschließt (Abb. 38). Die hypophysäre Genexpression war nach MMI-Behandlung konsistent zwischen den Geschlechtern reguliert. Sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren entsprach die Genexpression einer klassischen Hypothyreose, obwohl die Serumspiegel der Schilddrüsenhormone nicht signifikant verändert waren.

Die Morphologie der Schilddrüsen zeigte keine Veränderungen, die auf den genetischen Defekt der $TR\alpha$ -Knockouttiere zurückzuführen sind, da die Expression der an Iodidtransport und Schilddrüsenhormonbiosynthese beteiligten Gene dem klassischen Bild einer Hyperthyreose bei Applikation von T_4 und der Hypothyreose bei Applikation von MMI entsprach (Abb. 39, 40, 41). Gleiches war in den Organen der Peripherie festzustellen (Abb. 42, 43), wobei der Effekt auf die *Dio2* im Gegensatz zu *Dio1* nicht abschließend zu bewerten war, da in der Maus allein die *Dio2* mRNA-Spiegel und nicht die Aktivität beurteilt wurden. Die Enzymaktivität der *DIO1* entsprach nach Applikation der Referenzsubstanzen T_4 und $MMI/NaClO_4$ (MMI) mit Ausnahme der in weiblichen Nieren bestimmten Aktivität den in der Literatur beschriebenen Werten (Streckfuss et al. 2005).

Im Vergleich der $TR\alpha^{0/0}$ - und Wildtypiere zeigte sich, dass insbesondere die Expression von *TSH β* - und *Dio2* im Knockout stark und geschlechtsunabhängig reduziert war, wobei die Expression nach Applikation von T_4 - und MMI exemplarisch in Hypophyse und Leber vergleichbar war (Abb. 44). Im Gegensatz dazu war die Expression von *Thrb1* und *Thrb2* in der Leber der T_4 -induzierten männlichen Knockouttiere stärker induziert.

Weiterführende Experimente sind nötig, um die selektiven geschlechtsspezifischen Unterschiede der induzierten Hypo- und Hyperthyreose im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell zu klären, die ein Nebenergebnis der Kontrollbehandlung mit T₄ und MMI waren.

4.4.2 TR-vermittelte Effekte von GEN und F21388

Die Untersuchung von GEN und F21388 zeigte, dass bereits DMSO, das als deren Lösungsmittel dient, allein in weiblichen Tieren zur Gewichtsreduktion führt. Die Wirkung von DMSO kann über veränderte Signaltransduktion oder Methylierung erfolgen, wobei ein Effekt über die thyreotrope Achse in DMSO-behandelten TR $\alpha^{0/0}$ -Mäusen u.a. über den Schilddrüsenfunktionsmarker NIS ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt) (Watanabe und Iizuka 1986; Yokochi und Robertson 2004; Iwatani et al. 2006). Diese Ergebnisse sind mit Literaturdaten konsistent, u.a. mit einem fehlenden über die thyreotrope Achse vermittelten Effekt von DMSO in Sprague-Dawley-Ratten (Goldman 1973). Unter Berücksichtigung der Solvens-Effekte wurde die Wirkung von F21388 und GEN, die in DMSO gelöst werden, im Vergleich mit der DMSO-behandelten Gruppe betrachtet. Im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle war als geschlechtsspezifischer Effekt ein erhöhtes Körpergewicht in F21388- und GEN-behandelten Weibchen festzustellen, der für F21388 bereits in der ersten Behandlungswoche auftrat und im Vergleich zu GEN zu einer stärkeren Gewichtszunahme führte (Abb. 35). Dieser Effekt ist mit der Induktion einer Hypothyreose vereinbar, die auch in Patienten zu einer Gewichtszunahme führen kann (Kronenberg et al. 2007). Das konstante Gewicht der männlichen Tiere kann entweder aus einem reduzierten Effekt der EACs resultieren, oder aus einer kompensatorischen Gegenregulation auf Ebene der thyreotropen Achse.

Unter Berücksichtigung der publizierten Daten und eigener Vorexperimente mit Ausschluss der Wirkung von DMSO auf die thyreotrope Achse wurden für die folgenden Untersuchungen unbehandelte Tiere als Kontrollgruppe verwendet (Goldman 1973).

Sowohl GEN als auch F21388 verdrängen T₄ aus der Bindung von TTR, so dass in der Regel die Konzentration von FT₄ erhöht und T₄ erniedrigt ist (Radovic et al. 2006; Köhrle et al. 1989). Verglichen mit dem marginalen Effekt von GEN zeigt F21388 einen deutlichen Effekt auf T₄, der sogar stärker ausgeprägt ist, als nach Applikation von MMI (Abb. 36). Da F21388 ein optimiertes T₄-antagonistisches Flavonoid mit besserer

Bioverfügbarkeit und besserer Spezifität für Iodthyronin-Bindungsstellen als GEN ist, waren diese Unterschiede zu erwarten (Köhrle et al. 1988). Die Wirkung der Flavonoide war nicht geschlechtsspezifisch verändert und betraf weder T_3 noch TSH im $TR\alpha^{0/0}$ -Modell. Die Regulation entsprach damit der Applikation von F21388 in der Ratte, die mit einer erniedrigten Serumkonzentration von T_3 und T_4 assoziiert ist (Köhrle et al. 1989). Für F21388 ist beschrieben, dass es schnell FT_4 , aber nicht FT_3 erhöht und damit die Untersuchung von endogen erhöhtem FT_4 erlaubt (Lueprasitsakul et al. 1990). Während in der Ratte bereits 2h nach akuter Applikation von F21388 die Serumkonzentration von TSH erhöht war, hatte die chronische Applikation eine Suppression von TSH zur Folge, wobei in hypothyreoten Ratten erhöhte TSH Spiegel unverändert blieben (Abend et al. 1991). Als mögliche Erklärung für den erhöhten TSH-Spiegel wurde das transient erhöhte T_4 oder FT_3 angeführt, das zu erhöhtem Schilddrüsenhormon-Gehalt der Hypophyse führt (Köhrle et al. 1989). Im Gegensatz dazu bewirkte die langfristige Applikation von GEN und F21388 im $TR\alpha^{0/0}$ -Modell eine erhöhte Expression von *Tshr* und *ppTrh* im Hypothalamus mit erhöhter Expression von *Tshb* in der Hypophyse (Abb. 37, 38). Diese führte jedoch nicht zu einem erhöhte TSH-Plasmaspiegel, was für einen Sekretionsdefekt sprechen könnte. Da die Transkriptlevel von *Tshb* in der Hypophyse unverändert waren (Abb. 36), sind die Alternativen verstärkter Abbau bzw. reduzierte Translation von TSH wahrscheinlicher.

Für die Untersuchungen im Hypothalamus (Abb. 37) sind keine Vergleichsdaten in der Literatur verfügbar. Hier wird hauptsächlich $TR\beta$ exprimiert, der für die Feedbackregulation unentbehrlich ist, sodass kein primärer Effekt der $TR\alpha$ -Defizienz im Knockout-Modell zu erwarten war. F21388 führte zu einer klassisch hypothyreoten Situation im Hypothalamus mit erhöhtem *Tshr*, *ppTrh*, *Thrb1* (nur in Männchen) und *Thrb2*, die unabhängig von der $TR\alpha$ -Expression ist. Dieses Bild der Hypothyreose setzte sich in der Analyse der Hypophyse fort (Abb. 38). Auch hier zeigte sich der stärkere Effekt von F21388 im Vergleich zu GEN, das keinen Effekt auf die Expression von *Trhr* und *Trhde* hatte und auf *Tshb*, *Dio1* und *Dio2* Expression schwächer als F21388 wirkte. Bezüglich der Regulation von *Dio1* und *Dio2* wurde eine gleichsinnige Regulation mit Induktion durch GEN und F21388 in beiden Geschlechtern festgestellt. Die verstärkte Expression von *Dio1* schützt somit vor Thyrotoxikose durch den Abbau von T_4 zu rT_3 . *Dio2* ist erhöht, wenn T_4 erniedrigt ist, um lokal ausreichend T_3 zu produzieren. Dabei ist der Effekt auf die Deiodasen sekundär. Zumindest für F21388 wurde gezeigt, dass lokal reduziertes T_3 nicht durch den Effekt auf *Dio1* und *Dio2*

Aktivität bedingt ist, sondern dadurch, dass *in vivo* weniger T₄ als Substrat zur Verfügung steht (Schröder-van der Elst et al. 1997).

Die Morphologie der Schilddrüse zeigte nach Applikation von GEN und F21388 keine auffälligen Veränderungen. Die in Zellkultur beschriebenen Effekte von GEN umfassen die Inhibition der Zell-Ausbreitung und Ausbildung von *Focal-Adhesions*, die offensichtlich keinen Effekt auf den bestehenden Gewebeverband hatten, der in der H&E-Färbung nicht nachweisbar war (Abb. 39) (Yap et al. 1994). Dennoch fanden sich bei chronischer Behandlung marginale Veränderungen mit leicht erhöhter Expression von MCT8 insbesondere nach Applikation von GEN in männlichen Tieren (Abb. 39). Bei der vorliegenden Hypothyreose mit reduzierter T₄ Konzentration im Serum sollte kompensatorisch über MCT8 verstärkt T₄ mobilisiert werden, der geschlechtsspezifisch exprimiert war (Köhrle 2007). Die Wirkung von GEN und F21388 auf weitere Parameter der Schilddrüsenfunktion war stärker ausgeprägt als die morphologischen Veränderungen (Abb. 40). So führte die Applikation von GEN zu einer Repression von Nis und Tpo. Die Expression von Tshr und Tg blieb unverändert - entsprechend der Morphologie der Schilddrüse. Gleiches gilt für Dio1, während Dio2 in Männchen stärker als in Weibchen induziert war (Abb. 41). Für Dio2 beschränkte sich die Analyse auf die Expression, da in der Maus keine Dio2-Aktivität in der Schilddrüse bestimmt werden kann. F21388 verursachte stärkere Veränderungen in der Schilddrüse mit reduziertem Tshr alleine in Männchen und Suppression von Nis, Tpo und Tg in beiden Geschlechtern (Abb. 41). Die Dio1-Aktivität war unverändert - bei reduzierter Expression allein im Männchen; die Dio2-Expression war erhöht. Einzig vergleichbare Daten aus der Literatur zu Langzeiteffekten (2 Wochen Behandlung verglichen mit 4 Wochen im TR α -Knockout) betreffen männliche Ratten mit F21388 Behandlung (Schröder-van der Elst et al. 1991).

In der Leber und Niere der TR α -Knockout-Tiere war nach Applikation von Gen und F21388 die Aktivität der DIO1 reduziert, während die mRNA-Spiegel von Dio2 geschlechtsspezifisch reguliert waren (Abb. 42). Dieser Unterschied zu den publizierten Daten, die keinen Effekt von F21388 auf DIO1 in der Leber zeigten, könnten auf den unterschiedlichen TR α -Status zurückzuführen sein (Köhrle et al. 1989). In den TR α ^{0/0}-Tieren entspricht die Regulation der thyreotropen Achse dem klassischen Bild einer Hypothyreose. Unterschiede von GEN und F21388 betrafen insbesondere die Feedbackregulation auf Ebene von Hypothalamus und Hypophyse, die jeweils empfindlicher auf F21388 reagierten. Ansonsten waren die Wirkungen ähnlich, wobei geschlechtsspezifische Effekten fast ausschließlich die Expression der

Dio2 in Leber und Niere beeinflussten. Der zugrunde liegende Mechanismus kann durch die Wechselwirkung mit Geschlechtshormonen erklärt werden. Ein weiterer Unterschied in der Wirkung von F21388 und GEN in der Leber war die Induktion von Thrb1 und Thrb2 allein durch F21388 (Abb. 43) - übereinstimmend mit der komplexeren molekularen Wirkung, die nicht nur die Bindung von Schilddrüsenhormonen an TTR betrifft, sondern u.a. zusätzliche Wirkungen auf NIS zeigt (Schröder-van der Elst et al. 2004).

Der molekularen Wirkmechanismus ist insbesondere für F21388 gut charakterisiert und mit den gezeigten Effekten *in vivo* konsistent, die offensichtlich nicht über TR α vermittelt werden und mit ähnlicher Regulation der thyreotropen Achse auch im Wildtyp-Modell nachgewiesen wurden (Schröder-van der Elst et al. 1991). Beide (Iso-)Flavonoide verdrängen T₄ spezifisch aus der Bindung mit TTR, nicht jedoch von Albumin oder Apolipoproteinen (Mendel et al. 1992; Benvenega et al. 1993; Benvenega et al. 1994; Radovic et al. 2006). Die Betrachtung des Tiermodells ermöglicht dabei einen Einblick in die physiologische Regulation der thyreotropen Achse, obwohl Experimente im Tiermodell nicht immer 1:1 das humane System nachbilden. Dazu gehört z.B., dass TETRAC unterschiedlich an menschliches TTR und TTR der Ratte bindet, wie die Analyse der Kristallstruktur von TTR-Komplexen zeigte (Cody 2002).

GEN blockiert TPO als alternatives Substrat (Divi et al. 1997). Seine zelluläre Wirkung wurde insbesondere in kultivierten Schilddrüsenzellen der Linie FRTL-5 untersucht. Hier zeigte GEN Tyrosinkinase-Inhibition und wirkte als ein kompetitiver Antagonist für P1-purinerge Rezeptoren, indem es die PIA (*A1-adenosine-receptor-agonist*)-vermittelte Stimulation von TSH-induzierter PLC-Aktivierung inhibierte (Dohan et al. 2003b; Okajima et al. 1994). Die inhibitorische Wirkung von GEN auf Dio1 (ebenso über Tyrosin-Phosphorylierung) war weniger unter Normalbedingungen nachzuweisen, als bei erhöhter Aktivität nach Gabe von TSH, Bu2cAMP und Forskolin in Zellkultur oder nach Gabe von Hydrokortison oder Bu2cAMP in Astrozyten (Mori et al. 1996). Damit war ohne Vorbehandlung im Knockout-Modell keine direkte Wirkung auf die DIO1 zu erwarten. Als *in vivo*-Modell zur Analyse der Wirkung von EACs auf Schilddrüsenhormone diente bisher u.a. die Metamorphose im Frosch, die abhängig von Schilddrüsenhormonen erfolgt. Die fehlende Wirkung über TR α ist konsistent mit den vergleichbaren *in vivo*-Effekten bei Wildtyptieren (Schröder-van der Elst et al. 1991).

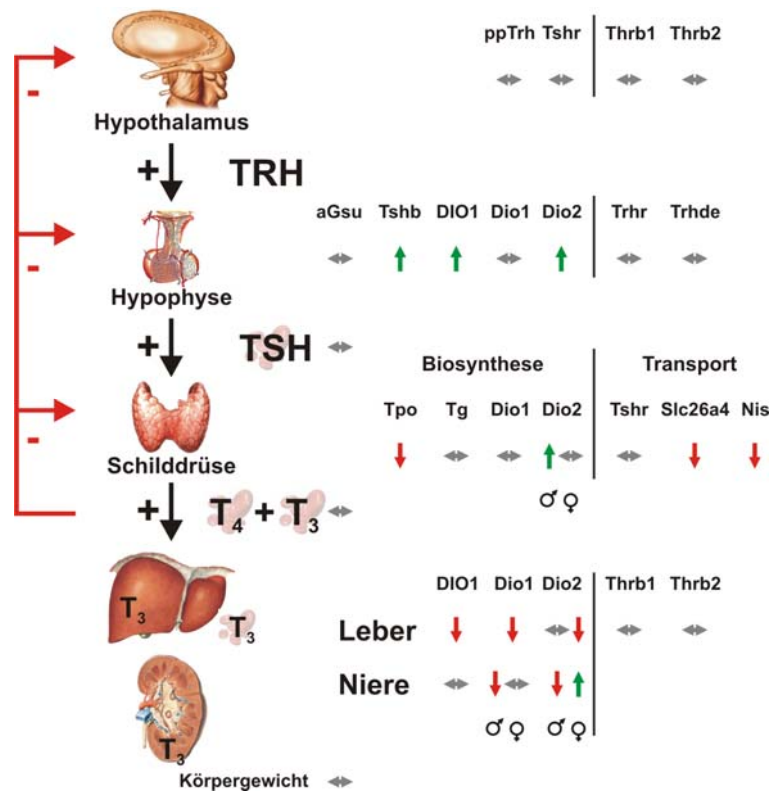


Abb. 46: Wirkung von GEN im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.

Zusammenfassung der erhobenen Expressionsdaten sowie der Enzymaktivitäten für DIO1 entlang der thyreotropen Achse inklusive der Endorgane Leber und Niere. GEN inhibiert den Iodidtransport, wie auch die Schilddrüsenhormonbiosynthese in der Schilddrüse. Die parallele Suppression von Dio1 und Dio2 resultierte in unveränderten T₄-Spiegeln. Geschlechtsspezifische Unterschiede sind gekennzeichnet und beschränken sich auf die Wirkung auf Dio2 in Schilddrüse, Leber und Niere sowie die Dio1 in der Niere.

Die Wirkungen von GEN *in vivo* im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell sind in Abb. 46 zusammengefasst. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Effekte auf die 5'-Diodasen in der Hypophyse und der Schilddrüse (Induktion) gegenüber der Peripherie (Repression), die entsprechend als sekundär interpretiert werden müssen. Als primäre Effekte zeigten sich die Wirkung auf die Schilddrüse mit Suppression der TPO und die Wirkung auf die Transportproteine NIS und Slc26a4.

4.5 Klinische Relevanz der Daten

Bisherige Untersuchungen exogener Substanzen zielten insbesondere auf die Rezeptor-vermittelte Wirkung der Steroid-, Schilddrüsenhormon- und Retinoidrezeptor-Genfamilien, da diese der Analyse besonders gut zugänglich sind. Zusammen mit funktionellen Untersuchungen z.B. unter Verwendung verschiedener Zellkulturmodelle sind diese Verfahren besonders geeignet, um die endokrine Aktivität von Chemikalien

nachzuweisen, die entsprechend des in 1.3.3 geschilderten Sachverhalts vielfältige biologische und gesundheitliche Konsequenzen hat. Während die östrogenen Effekte von EACs gut belegt sind, ist deren Wirkung auf die Schilddrüsenachse nur oberflächlich verstanden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine komplexe Wirkung von EACs auf unterschiedliche Ebenen von Regulation, Synthese und Abbau von Schilddrüsenhormonen, deren klinische Relevanz sich aus der Rolle der Schilddrüse im Organismus ableiten lässt. Die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 sind phylogenetisch konserviert und in Vertebraten essentiell für unterschiedliche physiologische Funktionen wie Wachstum und Differenzierung von Knochen und ZNS sowie Energie- und Wärmehaushalt und Regulation der Herzfunktion. Reduzierte T_4/T_3 -Spiegel z.B. bei Iodmangel führen zur Strumabildung und embryonal in schweren Fällen zu Entwicklungsstörungen, u.a. mit Wachstumsdefekten und mentaler Retardierung. Bereits leichte Veränderungen im Schilddrüsenhormonhaushalt können zu reduzierten Intelligenzquotienten bei Schulkindern führen (Santiago-Fernandez et al. 2004). Nach Daten der WHO (World Health Organization, 1999) gehören 30 % der Weltbevölkerung zur Risikogruppe für Schilddrüsenfunktionsstörungen, wobei nicht nur Entwicklungsländer sondern auch Industrienationen betroffen sind (Andersson et al. 2005). Insbesondere Schwangere, stillende Mütter und Vegetarier/Veganer sowie deren Nachwuchs sind häufiger von den Folgen eines Iodmangels betroffen (Ares et al. 2005; Borak 2005). Die gegenseitige Verstärkung von Iodmangel und der Wirkung von endokrin aktiven Substanzen zeigt sich in der erhöhten (reversiblen) Strumabildung in ioddefizienten Kindern bei der Ernährung mit Sojamilch, die durch die Inhibition der TPO durch GEN erklärt wird (van Wyk et al. 1959; Hydovitz 1960).

Unterschiedliche EACs können über Effekte auf die thyreotrope Achse neben Iodmangel auch Schilddrüsenerkrankungen verstärken (Ericsson und Lindgarde 1991; Knudsen et al. 2002a). Die hohe Prävalenz dieser Erkrankungen zusammen mit der starken Verbreitung von EACs unterstreicht die gesundheitspolitische Relevanz der Ergebnisse. Einerseits sollte die Exposition der Bevölkerung mit EACs reduziert werden, andererseits könnten die untersuchten Substanzklassen die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der Hyperthyreose bilden.

5 **Ausblick**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden postnatale Effekte ausgewählter EACs in Bezug auf mögliche Interferenzen mit der Feedbackregulation der thyreotropen Achse charakterisiert. Durch die Analyse T_3 -regulierter Zielgene, die das endokrine Potential exogener Substanzen auch unabhängig von der Regulation der gonadotropen Achse verdeutlichen, konnte der UV-Filter 4-MBC aufgrund dessen thyreostatischer Wirkungsweise als goitrogene Substanz identifiziert werden. Überdies wurde in $TR\alpha$ -defizienten Tieren eine gewebespezifische Wirkung des Sojainhaltsstoffes GEN festgestellt. Ferner zeigen die hier gewonnen Erkenntnisse, dass die untersuchten Testsubstanzen in Konzentrationen, die bislang als unbedenklich eingestuft wurden, abhängig von Spezies und Geschlecht nicht nur die Expression Feedback-assoziiierter Gene in Hypothalamus und Hypophyse modulieren, sondern darüber hinaus auch die Schilddrüsenhormonbiosynthese und den peripheren Metabolismus von T_4 und T_3 beeinflussen.

Zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus von 4-MBC sind ergänzende Analysen erforderlich, die nicht nur die Überprüfung der hier diskutierten Hypothesen, sondern auch weiterführende Untersuchungen der von Völkel et al. identifizierten Metabolite und ihre Interaktion mit der thyreotropen Achse einschließen, um zwischen einer direkten Wirkung des UV-Filters und dessen glucuronidierten Spaltprodukten unterscheiden zu können (Völkel et al. 2006). Des Weiteren eignen sich spezielle *Mammalian-Two-Hybrid*-Systeme, um die Rekrutierung von CoA/CoR zu analysieren und somit die von Maerkel et al. beschriebenen Effekte auf die Expression von SRC-1 zu untersuchen, da 4-MBC unter Umständen das alternative Spleißen von Thra2 beeinflusst (Lim et al. 2002; Maerkel et al. 2007). Angesichts der kritischen Rolle von T_3 hinsichtlich Differenzierung und Wachstum sind bei Durchführung perinataler Expositionsstudien gravierende Folgen für die (zerebrale) Entwicklung des Nachwuchses zu erwarten, da aufgrund des hohen Bioakkumulationspotentials der Testsubstanz bereits in generationsübergreifenden Experimenten eine Erhöhung des Schilddrüsenengewichts wie auch Veränderungen des Schilddrüsenhormonstatus nachgewiesen wurden (Schlumpf et al. 2004b; Schauer et al. 2006; Völkel et al. 2006). Die im Rahmen einer skandinavischen Studie analysierten Muttermilchproben bestätigen durch den Nachweis von Phthalaten nicht nur die humane Relevanz dieser Arbeit, sondern unterstreichen gleichermaßen die Notwendigkeit bei stetig wachsender Umweltbelastung und derzeit nicht absehbaren Folgen chronischer Exposition, den

Wirkmechanismus wie auch mögliche teratogene Effekte von 4-MBC mit Hilfe der vorgestellten Daten weiter aufzuklären (Hany und Nagel 1995). Zudem wurde unter Verwendung von MCF-7-Zellen gezeigt, dass die zur Herstellung von Kosmetika vielfach eingesetzten Mischungen verschiedener UV-Filter additive östrogene Effekte verursachen, die jedoch ohne weitere Informationen im Kontext mit der thyreotropen Achse die Einordnung der humanen Exposition erschweren, da nicht ausschließlich die Kombination der Filtersubstanzen, sondern auch deren Galenik das Wirkpotential nachhaltig beeinflusst (Heneweer et al. 2005). Überdies spielen vermutlich auch die Iodversorgung sowie der Sojakonsum hinsichtlich der Ausprägung der Effekte eine bedeutende Rolle, da bereits in den 60er Jahren gezeigt wurde, dass die sojabasierte Ernährung von Säuglingen mit einer verstärkten Strumabildung assoziiert ist (Hydovitz 1960; Ripp 1961).

In diesem Zusammenhang ist auch die EU-Verordnung „REACH“ (*Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*; <http://www.reach-info.de/>) von besonderem Interesse, welche die toxikologische Untersuchung von ca. 30.000 Substanzen bis zum Jahr 2018 anstrebt, um im Rahmen einer Reform des Chemikalienrechts die Verwendung „sicherer“ Chemikalien zu gewährleisten. Die fundierte Beurteilung erfordert jedoch nicht nur ein valides Screening der Testsubstanzen im Zellkulturmodell, sondern vor allem deren multifaktorielle Charakterisierung in Tierexperimenten, da ausschließlich *in vivo*-Assays die Analyse metabolischer und kompensatorischer Prozesse sowie Untersuchungen des Hormonstatus abhängig von Applikationsform, Expositionszeit und diurnalen Rhythmen ermöglichen. Im Vergleich zu *in vitro*-Assays, die vorwiegend zur mechanistischen Endpunktanalyse eingesetzt werden, sind dagegen tierexperimentelle Analysen geeignet, um die komplexen regulatorischen Beziehungen verschiedener Gewebe und mögliche Interferenzen mit dem Immunsystem aufzeigen, die auch kanzerogene oder allergische Wirkungen der Testsubstanzen einschließen.

Darüber hinaus wurde während der Analysen zur Untersuchung TR α -vermittelter Effekte von GEN, abgesehen von der in TR α -defizienten Tieren bereits bekannten Hypersensitivität gegenüber Schilddrüsenhormonen, eine unterschiedlich stark ausgeprägte Reaktion auf eine MMI/NaClO₄-induzierte Hypothyreose in Abhängigkeit vom Geschlecht festgestellt. Basierend auf den hier gezeigten Daten sind unter Verwendung der in der Literatur beschriebenen TR-Knockout-Modelle weiterführende Analysen zum mechanistischen Verständnis TR-abhängiger Effekte in Hyper- und Hypothyreose unter besonderer Berücksichtigung Feedback-assoziiertes Gene in

Hypothalamus und Hypophyse vorstellbar (O'Shea und Williams 2002). Ferner könnten Steroidhormone abhängig von der jeweiligen TR-Isoform die Sensitivität gegenüber einem veränderten Schilddrüsenhormonstatus beeinflussen.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch den erweiterten Einblick in die molekularen Wirkungen ausgewählter EACs die Notwendigkeit, zusätzliche Nachweismethoden zu entwickeln, welche gewebespezifische Biomarker zur Beurteilung der Schilddrüsenfunktion während der Embryonalentwicklung wie auch im adulten Organismus berücksichtigen und somit perspektivisch sowohl ein sensibles, robustes und effektives Screening als auch eine solide Risikobeurteilung ermöglichen.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Biosynthese der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 .	5
Abb. 2: Deiodasen.	6
Abb. 3: Isoformen der Schilddrüsenhormonrezeptoren.	10
Abb. 4: Molekularer Wirkmechanismus von T_3 .	11
Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der <i>in vivo</i> -Experimente in Ratte und Maus.	70
Abb. 6: Feedbackregulation nach chronischer Applikation von 4-MBC.	83
Abb. 7: Iodidtransport und Hormonbiosynthese nach chronischer Applikation von 4-MBC.	85
Abb. 8: Regulation der peripheren DIO1 nach chronischer Applikation von 4-MBC.	87
Abb. 9: Serumparameter der thyreotropen Achse nach Applikation von T_4 und MMI.	89
Abb. 10: Morphologische und molekulare Analyse der Schilddrüse nach Applikation von T_4 und MMI.	90
Abb. 11: Gewebespezifische Unterschiede der 5'-Deiodasen nach Applikation von T_4 und MMI.	93
Abb. 12: Veränderung des Körpergewichts nach subakuter Applikation von 4-MBC.	95
Abb. 13: Serumkonzentrationen der Hypophysenhormone LH, Prolaktin und TSH nach subakuter Applikation von 4-MBC.	97
Abb. 14: Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T_4 und T_3 nach subakuter Applikation von 4-MBC.	98
Abb. 15: Hypothalamische Feedbackregulation nach subakuter Applikation von 4-MBC.	100
Abb. 16: Hypophysäre Feedbackregulation nach subakuter Applikation von 4-MBC.	101
Abb. 17: Differentielle Genregulation in der Hypophyse nach subakuter Applikation von 4-MBC.	104
Abb. 18: Relatives Schilddrüsengewicht nach subakuter Applikation von 4-MBC.	105
Abb. 19: Morphologie der Schilddrüse nach subakuter Applikation von 4-MBC.	106
Abb. 20: Expressionsanalyse des Iodidtransports nach subakuter Applikation von 4-MBC.	108
Abb. 21: Immunhistochemische Analyse von NIS nach subakuter Applikation von 4-MBC.	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 22: Expressionsanalyse der Hormonbiosynthese nach subakuter Applikation von 4-MBC.	110
Abb. 23: Immunhistochemische Analyse von TG nach subakuter Applikation von 4-MBC.	111
Abb. 24: Analyse der 5'-Deiodasen in der Schilddrüse nach subakuter Applikation von 4-MBC.	113
Abb. 25: Immunhistochemische Analyse von VEGF nach subakuter Applikation von 4-MBC.	114
Abb. 26: Expressionsanalyse der Angiogeneseregulation nach subakuter Applikation von 4-MBC.	115
Abb. 27: Gewebespezifische Unterschiede der peripheren DIO1 nach subakuter Applikation von 4-MBC.	116
Abb. 28: Gewebespezifische Unterschiede der peripheren Dio2 nach subakuter Applikation von 4-MBC.	117
Abb. 29: Expressionsanalyse T ₃ -regulierter Zielgene in peripheren Organen nach subakuter Applikation von 4-MBC.	118
Abb. 30: Analyse klassischer Entzündungsparameter nach subakuter Applikation von 4-MBC.	121
Abb. 31: Effekte von 4-MBC auf den Iodidtransport in FRTL-5-Zellen.	123
Abb. 32: Effekte von 4-MBC auf Iodidtransport und Hormonbiosynthese in FRTL-5-Zellen.	127
Abb. 33: Analyse der hypophysären Feedbackregulation zur Dosisfindung im Wildtyp-Mausmodell.	129
Abb. 34: Genotypisierung des TRα ^{0/0} -Modells.	132
Abb. 35: Einfluss der Testsubstanzen auf das Wachstum im TRα ^{0/0} -Modell.	133
Abb. 36: Analyse des negativen Feedbacksystems im TRα ^{0/0} -Modell.	134
Abb. 37: Expressionsanalyse der hypothalamischen Feedbackregulation im TRα ^{0/0} -Modell.	136
Abb. 38: Hypophysäre Feedbackregulation im TRα ^{0/0} -Modell.	138
Abb. 39: Histologische Analyse der Schilddrüse im TRα ^{0/0} -Modell.	140
Abb. 40: Iodidtransport und Hormonbiosynthese im TRα ^{0/0} -Modell.	141
Abb. 41: Analyse der 5'-Deiodasen der Schilddrüse im TRα ^{0/0} -Modell.	142
Abb. 42: Gewebespezifische Unterschiede der peripheren 5'-Deiodasen im TRα ^{0/0} -Modell.	143
Abb. 43: Hepatische Genexpression von Thrb1 und Thrb2 im TRα ^{0/0} -Modell.	145

Abbildungsverzeichnis

Abb. 44: Vergleichende Analyse von Wildtyp und TR $\alpha^{0/0}$ -Modell nach Induktion von Hyper- und Hypothyreose.....	146
Abb. 45: Wirkung von 4-MBC nach subakuter Applikation in der Ratte.....	173
Abb. 46: Wirkung von GEN im TR $\alpha^{0/0}$ -Modell.....	191

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ursachen von Hypo- und Hyperthyreose.....	16
Tab. 2: Endokrin aktive Substanzen (EACs).....	18
Tab. 3: Molekularbiologische Reaktionssysteme.....	26
Tab. 4: Geräte.....	27
Tab. 5: Primäre Antikörper für Immunhistochemie (IHC) und Western blot (WB).....	28
Tab. 6: Sekundäre Antikörper für Immunhistochemie (IHC).....	29
Tab. 7: Sekundäre Antikörper für Western blot (WB).....	29
Tab. 8: Sonden zur mRNA-Detektion mittels Northern blot-Analyse.....	30
Tab. 9: Datenbanken.....	31
Tab. 10: Software.....	31
Tab. 11: Herkunft und Kulturbedingungen der Zelllinie FRTL-5.....	32
Tab. 12: Bakterienstämme.....	35
Tab. 13: Übersicht der zur cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Mengen.....	48
Tab. 14: Spezies- und Gewebeunterschiede im Deiodase-Assay.....	55
Tab. 15: Referenzsubstanzen und Lösungsmittelkontrollen.....	68
Tab. 16: Testsubstanzen.....	69
Tab. 17: Reaktionssysteme zur Bestimmung von T ₄ und T ₃ in der Ratte.....	73
Tab. 18: Expression von Myh6 und Myh7 im Herzen.....	119
Tab. 19: Expression von Thra1, Thra2 und Thrb in peripheren Geweben.....	120
Tab. 20: Primer zur Genotypisierung der TR $\alpha^{0/0}$ -Mäuse.....	238
Tab. 21: qPCR-Primer zur Analyse der mRNA-Expression in der Maus.....	238
Tab. 22: qPCR-Primer zur Analyse der mRNA-Expression in der Ratte.....	239

Literaturverzeichnis

Abel, E. D.; Ahima, R. S.; Boers, M. E.; Elmquist, J. K. und Wondisford, F. E. (2001): Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons, *J.Clin.Invest* (Band 107), Nr. 8, Seite 1017-1023.

Abend, S. L.; Fang, S. L.; Alex, S.; Braverman, L. E. und Leonard, J. L. (1991): Rapid alteration in circulating free thyroxine modulates pituitary type II 5' deiodinase and basal thyrotropin secretion in the rat, *J.Clin.Invest* (Band 88), Nr. 3, Seite 898-903.

Akatsuka, K.; Hashimoto, T.; Takeuchi, K. und Ohhira, M. (1979): [Mutagenicity test of antithyroid agent, methimazole--dominant lethal mutation test on male mice (author's transl)], *J Toxicol Sci* (Band 4), Nr. 2, Seite 127-137.

Alkemade, A.; Friesema, E. C.; Kuiper, G. G.; Wiersinga, W. M.; Swaab, D. F.; Visser, T. J. und Fliers, E. (2006): Novel neuroanatomical pathways for thyroid hormone action in the human anterior pituitary, *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* (Band 154), Nr. 3, Seite 491-500.

Alkemade, A.; Vuijst, C. L.; Unmehopa, U. A.; Bakker, O.; Vennström, B.; Wiersinga, W. M.; Swaab, D. F. und Fliers, E. (2005): Thyroid hormone receptor expression in the human hypothalamus and anterior pituitary, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Band 90), Nr. 2, Seite 904-912.

Ambesi-Impiombato, F. S.; Parks, L. A. und Coon, H. G. (1980): Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 77), Nr. 6, Seite 3455-3459.

Amendola, E.; De Luca P.; Macchia, P. E.; Terracciano, D.; Rosica, A.; Chiappetta, G.; Kimura, S.; Mansouri, A.; Affuso, A.; Arra, C.; Macchia, V.; Di Lauro R. und De Felice M. (2005): A mouse model demonstrates a multigenic origin of congenital hypothyroidism, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 12, Seite 5038-5047.

Andersson, M.; Takkouche, B.; Egli, I.; Allen, H. E. und de Benoist B. (2005): Current global iodine status and progress over the last decade towards the elimination of iodine deficiency, *Bull World Health Organ* (Band 83), Nr. 7, Seite 518-525.

Anway, M. D.; Cupp, A. S.; Uzumcu, M. und Skinner, M. K. (2005): Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility, *Science* (Band 308), Nr. 5727, Seite 1466-1469.

Ares, S.; Quero, J. und Morreale de Escobar G. (2005): Neonatal iodine deficiency: clinical aspects, *J Pediatr Endocrinol Metab* (Band 18 Suppl 1), Seite 1257-1264.

Bakker, O.; Razaki, H.; de Jong, J.; Ris-Stalpers, C. und Wiersinga, W. M. (1998): Expression of the alpha 1, alpha 2, and beta 1 T3-receptor mRNAs in the fasted rat measured using competitive PCR, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (Band 242), Nr. 3, Seite 492-496.

- Baniahmad, A.; Tsai, S. Y.; O'Malley, B. W. und Tsai, M. J. (1992): Kindred S thyroid hormone receptor is an active and constitutive silencer and a repressor for thyroid hormone and retinoic acid responses, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 89), Nr. 22, Seite 10633-10637.
- Barbesino, G.; Tomer, Y.; Concepcion, E. S.; Davies, T. F. und Greenberg, D. A. (1998): Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. II. Selected gender-related genes and the X-chromosome. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 83), Nr. 9, Seite 3290-3295.
- Barrett, J. R. (2002): Soy and children's health: a formula for trouble, *Environmental Health Perspectives* (Band 110), Nr. 6, Seite A294-A296.
- Bassett, J. H.; Harvey, C. B. und Williams, G. R. (2003): Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 213), Nr. 1, Seite 1-11.
- Bassett, J. H.; Swinhoe, R.; Chassande, O.; Samarut, J. und Williams, G. R. (2006): Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 1, Seite 295-305.
- Bates, J. M.; St Germain, D. L. und Galton, V. A. (1999): Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat, *Endocrinology* (Band 140), Nr. 2, Seite 844-851.
- Bauer, M. und Whybrow, P. C. (2001): Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation, *World J.Biol.Psychiatry* (Band 2), Nr. 2, Seite 59-69.
- Baur, A.; Bauer, K.; Jarry, H. und Köhrle, J. (2000): Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'-deiodinase type I and type II, *The Journal of Endocrinology* (Band 167), Nr. 3, Seite 505-515.
- Baur, A.; Buchfelder, M. und Köhrle, J. (2002): Expression of 5'-deiodinase enzymes in normal pituitaries and in various human pituitary adenomas, *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* (Band 147), Nr. 2, Seite 263-268.
- Baur, A. und Köhrle, J. (1999): Type 1 deiodinase is stimulated by iodothyronines and involved in thyroid hormone metabolism in human somatomammotroph GX cells, *Eur.J Endocrinol* (Band 140), Nr. 4, Seite 367-370.
- Behne, D.; Kyriakopoulos, A.; Meinhold, H. und Köhrle, J. (1990): Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 173), Nr. 3, Seite 1143-1149.
- Benvenga, S.; Cahnmann, H. J.; Rader, D.; Kindt, M.; Facchiano, A. und Robbins, J. (1994): Thyroid hormone binding to isolated human apolipoproteins A-II, C-I, C-II, and C-III: homology in thyroxine binding sites, *Thyroid* (Band 4), Nr. 3, Seite 261-267.

Benvenega, S.; Cahnmann, H. J. und Robbins, J. (1993): Characterization of thyroid hormone binding to apolipoprotein-E: localization of the binding site in the exon 3-coded domain, *Endocrinology* (Band 133), Nr. 3, Seite 1300-1305.

Bergh, J. J.; Lin, H. Y.; Lansing, L.; Mohamed, S. N.; Davis, F. B.; Mousa, S. und Davis, P. J. (2005a): Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 7, Seite 2864-2871.

Bergh, J. J.; Lin, H. Y.; Lansing, L.; Mohamed, S. N.; Davis, F. B.; Mousa, S. und Davis, P. J. (2005b): Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 7, Seite 2864-2871.

Bernal, J. (2002): Action of thyroid hormone in brain, *J.Endocrinol.Invest* (Band 25), Nr. 3, Seite 268-288.

Bernal, J. (2006): Role of monocarboxylate anion transporter 8 (MCT8) in thyroid hormone transport: Answers from mice, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 9, Seite 4034-4035.

Bianco, A. C.; Salvatore, D.; Gereben, B.; Berry, M. J. und Larsen, P. R. (2002): Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases, *Endocrine Reviews* (Band 23), Nr. 1, Seite 38-89.

Biro, J.; Eneroth, P. und Ritzen, E. M. (1984): Effects of hysterectomy and in-vivo treatment with uterine extracts on plasma concentrations of growth hormone, thyrotrophin and thyroid hormones in rats: a kinetic study, *J Endocrinol* (Band 101), Nr. 3, Seite 243-248.

Blake, C. A. (1977): Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone release in ovariectomized rats, *Endocrinology* (Band 101), Nr. 4, Seite 1122-1129.

Bodenner, D. L.; Mroczynski, M. A.; Weintraub, B. D.; Radovick, S. und Wondisford, F. E. (1991): A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotrophin beta-subunit gene, *J Biol Chem* (Band 266), Nr. 32, Seite 21666-21673.

Boelen, A.; Kwakkel, J.; Thijssen-Timmer, D. C.; Alkemade, A.; Fliers, E. und Wiersinga, W. M. (2004): Simultaneous changes in central and peripheral components of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in lipopolysaccharide-induced acute illness in mice, *The Journal of Endocrinology* (Band 182), Nr. 2, Seite 315-323.

Boelen, A.; Platvoet-ter Schiphorst, M. C.; Bakker, O. und Wiersinga, W. M. (1995): The role of cytokines in the lipopolysaccharide-induced sick euthyroid syndrome in mice, *The Journal of Endocrinology* (Band 146), Nr. 3, Seite 475-483.

Bogazzi, F.; Raggi, F.; Ultimieri, F.; Russo, D.; Campomori, A.; McKinney, J. D.; Pinchera, A.; Bartalena, L. und Martino, E. (2003): Effects of a mixture of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) on the transcriptional activity of thyroid hormone receptor, *J.Endocrinol.Invest* (Band 26), Nr. 10, Seite 972-978.

- Bohme, K.; Conscience-Egli, M.; Tschan, T.; Winterhalter, K. H. und Bruckner, P. (1992): Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine, *J Cell Biol* (Band 116), Nr. 4, Seite 1035-1042.
- Borak, J. (2005): Neonatal hypothyroidism due to maternal vegan diet, *J Pediatr Endocrinol Metab* (Band 18), Nr. 6, Seite 621.
- Bottner, M.; Christoffel, J.; Rimoldi, G. und Wuttke, W. (2006): Effects of long-term treatment with resveratrol and subcutaneous and oral estradiol administration on the pituitary-thyroid-axis, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (Band 114), Nr. 2, Seite 82-90.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem.* (Band 72), Seite 248-254.
- Brawer, J. R.; Naftolin, F.; Martin, J. und Sonnenschein, C. (1978): Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat, *Endocrinology* (Band 103), Nr. 2, Seite 501-512.
- Brix, K.; Linke, M.; Tepel, C. und Herzog, V. (2001): Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid, *Biol.Chem.* (Band 382), Nr. 5, Seite 717-725.
- Brouwer, A.; Morse, D. C.; Lans, M. C.; Schuur, A. G.; Murk, A. J.; Klasson-Wehler, E.; Bergman, A. und Visser, T. J. (1998): Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health, *Toxicol.Ind.Health* (Band 14), Nr. 1-2, Seite 59-84.
- Bruce, B.; Messina, M. und Spiller, G. A. (2003): Isoflavone supplements do not affect thyroid function in iodine-replete postmenopausal women, *Journal of Medicinal Food* (Band 6), Nr. 4, Seite 309-316.
- Buckley, D. A.; O'Sullivan, D. und Murphy, G. M. (1993): Contact and photocontact allergy to dibenzoylmethanes and contact allergy to methylbenzylidene camphor, *Contact Dermatitis* (Band 29), Nr. 1, Seite 47.
- Buettner, C.; Grasberger, H.; Hermansdorfer, K.; Chen, B.; Treske, B. und Janssen, O. E. (1999): Characterization of the thyroxine-binding site of thyroxine-binding globulin by site-directed mutagenesis, *Mol Endocrinol* (Band 13), Nr. 11, Seite 1864-1872.
- Burmeister, L. A.; Pachucki, J. und St Germain, D. L. (1997): Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms, *Endocrinology* (Band 138), Nr. 12, Seite 5231-5237.
- Buser, H. R.; Balmer, M. E.; Schmid, P. und Kohler, M. (2006): Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants, *Environ.Sci.Technol.* (Band 40), Nr. 5, Seite 1427-1431.

Cagampang, F. R.; Maeda, K. I.; Tsukamura, H.; Ohkura, S. und Ota, K. (1991): Involvement of ovarian steroids and endogenous opioids in the fasting-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats, *The Journal of Endocrinology* (Band 129), Nr. 3, Seite 321-328.

Campos-Barros, A.; Hoell, T.; Musa, A.; Sampaolo, S.; Stoltenburg, G.; Pinna, G.; Eravci, M.; Meinhold, H. und Baumgartner, A. (1996): Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 81), Nr. 6, Seite 2179-2185.

Casla, A.; Rovira, A.; Wells, J. A. und Dohm, G. L. (1990): Increased glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism, *Biochem Biophys. Res Commun* (Band 171), Nr. 1, Seite 182-188.

Cavalieri, R. R. (1997): Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts, *Thyroid* (Band 7), Nr. 2, Seite 177-181.

Chang, G. G. und Tong, L. (2003): Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases, *Biochemistry* (Band 42), Nr. 44, Seite 12721-12733.

Chang, H. C.; Churchwell, M. I.; Delclos, K. B.; Newbold, R. R. und Doerge, D. R. (2000): Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats, *The Journal of Nutrition* (Band 130), Nr. 8, Seite 1963-1970.

Chang, H. C. und Doerge, D. R. (2000): Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect, *Toxicology and Applied Pharmacology* (Band 168), Nr. 3, Seite 244-252.

Chang, S. F.; Liu, J. Y.; Yang, B. T.; Hwang, C. S.; Hwang, C. Y.; Day, C. H. und Wang, P. S. (1989): In vivo and in vitro studies on the release of thyrotropin in aging rats, *Chin J Physiol* (Band 32), Nr. 1, Seite 13-20.

Chanoine, J. P.; Braverman, L. E.; Farwell, A. P.; Safran, M.; Alex, S.; Dubord, S. und Leonard, J. L. (1993): The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat, *J Clin Invest* (Band 91), Nr. 6, Seite 2709-2713.

Chen, A. und Rogan, W. J. (2004): Isoflavones in soy infant formula: a review of evidence for endocrine and other activity in infants, *Annual Review of Nutrition* (Band 24), Seite 33-54.

Chen, C. W. (2001): Assessment of endocrine disruptors: approaches, issues, and uncertainties, *Folia Histochem. Cytobiol.* (Band 39 Suppl 2), Seite 20-23.

Chen, J. D. und Evans, R. M. (1995): A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors, *Nature* (Band 377), Nr. 6548, Seite 454-457.

Cheron, R. G.; Kaplan, M. M. und Larsen, P. R. (1979): Physiological and pharmacological influences on thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3'-triiodothyronine binding in rat anterior pituitary, *J Clin Invest* (Band 64), Nr. 5, Seite 1402-1414.

- Cho, B. H. und Park, J. R. (1990): Estrogen induces hyperlipidemia in fasted chicks, *Proc.Soc.Exp Biol Med* (Band 193), Nr. 2, Seite 104-109.
- Cho, S. D.; Kim, J. H.; Kim, D. Y.; Lee, Y. S. und Kang, K. S. (2003): Pre-validation study for OECD enhanced test guideline 407 protocol by gavage for 4 weeks using propylthiouracil and tamoxifen, *Toxicol.Lett.* (Band 144), Nr. 2, Seite 195-204.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem.* (Band 162), Nr. 1, Seite 156-159.
- Chopra, I. J. (1996): Nonthyroidal illness syndrome or euthyroid sick syndrome?, *Endocrine Practice: Official Journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* (Band 2), Nr. 1, Seite 45-52.
- Chopra, I. J.; Solomon, D. H.; Chopra, U.; Wu, S. Y.; Fisher, D. A. und Nakamura, Y. (1978): Pathways of metabolism of thyroid hormones, *Recent Prog.Horm Res* (Band 34), Seite 521-567.
- Christoffolete, M. A.; Ribeiro, R.; Singru, P.; Fekete, C.; da Silva, W. S.; Gordon, D. F.; Huang, S. A.; Crescenzi, A.; Harney, J. W.; Ridgway, E. C.; Larsen, P. R.; Lechan, R. M. und Bianco, A. C. (2006): Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 4, Seite 1735-1743.
- Clerget-Froidevaux, M. S.; Seugnet, I. und Demeneix, B. A. (2004): Thyroid status co-regulates thyroid hormone receptor and co-modulator genes specifically in the hypothalamus, *FEBS Letters* (Band 569), Nr. 1-3, Seite 341-345.
- Cody, V. (2002): Mechanisms of molecular recognition: crystal structure analysis of human and rat transthyretin inhibitor complexes, *Clin.Chem.Lab Med.* (Band 40), Nr. 12, Seite 1237-1243.
- Cody, V.; Davis, P. J. und Davis, F. B. (2007): Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin, *Steroids* (Band 72), Nr. 2, Seite 165-170.
- Colborn, T. (2002): Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption, *Environ.Health Perspect.* (Band 110 Suppl 3), Seite 363-367.
- Cook, C. B.; Kakucska, I.; Lechan, R. M. und Koenig, R. J. (1992): Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus, *Endocrinology* (Band 130), Nr. 2, Seite 1077-1079.
- Cooke, G. M.; Tryphonas, H.; Pulido, O.; Caldwell, D.; Bondy, G. S. und Forsyth, D. (2004): Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry, *Food Chem.Toxicol.* (Band 42), Nr. 2, Seite 211-220.
- Crews, D. und McLachlan, J. A. (2006): Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 6 Suppl, Seite S4-10.

D'Eon, T. M.; Souza, S. C.; Aronovitz, M.; Obin, M. S.; Fried, S. K. und Greenberg, A. S. (2005): Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 280), Nr. 43, Seite 35983-35991.

Dai, G.; Levy, O. und Carrasco, N. (1996): Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter, *Nature* (Band 379), Nr. 6564, Seite 458-460.

Darras, V. M.; Hume, R. und Visser, T. J. (1999): Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 151), Nr. 1-2, Seite 37-47.

Davis, P. J.; Davis, F. B. und Cody, V. (2005): Membrane receptors mediating thyroid hormone action, *Trends Endocrinol.Metab* (Band 16), Nr. 9, Seite 429-435.

Davis, P. J.; Leonard, J. L. und Davis, F. B. (2007): Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone, *Front Neuroendocrinol.*

De Deken, X.; Wang, D.; Dumont, J. E. und Miot, F. (2002): Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system, *Exp Cell Res* (Band 273), Nr. 2, Seite 187-196.

de Groot, A. C.; van der Walle, H. B.; Jagtman, B. A. und Weyland, J. W. (1987): Contact allergy to 4-isopropyl-dibenzoylmethane and 3-(4'-methylbenzylidene) camphor in the sunscreen Eusolex 8021, *Contact Dermatitis* (Band 16), Nr. 5, Seite 249-254.

De Groot, L. J. (1999): Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 84), Nr. 1, Seite 151-164.

De Groot, L. J. (2006): Non-thyroidal illness syndrome is a manifestation of hypothalamic-pituitary dysfunction, and in view of current evidence, should be treated with appropriate replacement therapies, *Critical Care Clinics* (Band 22), Nr. 1, Seite 57-86, vi.

De Lean A. und Labrie, F. (1977): Sensitizing effect of treatment with estrogens on TSH response to TRH in male rats, *Am.J Physiol* (Band 233), Nr. 3, Seite E235-E239.

DeVito, M.; Biegel, L.; Brouwer, A.; Brown, S.; Brucker-Davis, F.; Cheek, A. O.; Christensen, R.; Colborn, T.; Cooke, P.; Crissman, J.; Crofton, K.; Doerge, D.; Gray, E.; Hauser, P.; Hurley, P.; Kohn, M.; Lazar, J.; McMaster, S.; McClain, M.; McConnell, E.; Meier, C.; Miller, R.; Tietge, J. und Tyl, R. (1999): Screening methods for thyroid hormone disruptors, *Environ.Health Perspect.* (Band 107), Nr. 5, Seite 407-415.

Dillmann, W. H. (2002): Cellular action of thyroid hormone on the heart, *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* (Band 12), Nr. 6, Seite 447-452.

Divi, R. L.; Chang, H. C. und Doerge, D. R. (1997): Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action, *Biochemical Pharmacology* (Band 54), Nr. 10, Seite 1087-1096.

Divi, R. L. und Doerge, D. R. (1996): Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids, *Chemical Research in Toxicology* (Band 9), Nr. 1, Seite 16-23.

Doerge, D. R. und Sheehan, D. M. (2002): Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones, *Environ.Health Perspect.* (Band 110 Suppl 3), Seite 349-353.

Dohan, O. und Carrasco, N. (2003): Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond, *Molecular and Cellular Endocrinology* (Band 213), Nr. 1, Seite 59-70.

Dohan, O.; de la Vieja, A.; Paroder, V.; Riedel, C.; Artani, M.; Reed, M.; Ginter, C. S. und Carrasco, N. (2003a): The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance, *Endocrine Reviews* (Band 24), Nr. 1, Seite 48-77.

Dohan, O.; De, la, V.; Paroder, V.; Riedel, C.; Artani, M.; Reed, M.; Ginter, C. S. und Carrasco, N. (2003c): The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance, *Endocr.Rev.* (Band 24), Nr. 1, Seite 48-77.

Dohan, O.; De, la, V.; Paroder, V.; Riedel, C.; Artani, M.; Reed, M.; Ginter, C. S. und Carrasco, N. (2003b): The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance, *Endocr.Rev.* (Band 24), Nr. 1, Seite 48-77.

Dozin, B.; Magnuson, M. A. und Nikodem, V. M. (1985): Tissue-specific regulation of two functional malic enzyme mRNAs by triiodothyronine, *Biochemistry* (Band 24), Nr. 20, Seite 5581-5586.

Duncan, A. M.; Merz, B. E.; Xu, X.; Nagel, T. C.; Phipps, W. R. und Kurzer, M. S. (1999a): Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 84), Nr. 1, Seite 192-197.

Duncan, A. M.; Underhill, K. E.; Xu, X.; Lavalleur, J.; Phipps, W. R. und Kurzer, M. S. (1999b): Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 84), Nr. 10, Seite 3479-3484.

Dunn, J. T. und Dunn, A. D. (2001): Update on intrathyroidal iodine metabolism, *Thyroid* (Band 11), Nr. 5, Seite 407-414.

Dupre, S. M.; Guissouma, H.; Flamant, F.; Seugnet, I.; Scanlan, T. S.; Baxter, J. D.; Samarut, J.; Demeneix, B. A. und Becker, N. (2004): Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone, *Endocrinology* (Band 145), Nr. 5, Seite 2337-2345.

Durrer, S.; Ehnes, C.; Fuetsch, M.; Maerkel, K.; Schlumpf, M. und Lichtensteiger, W. (2007): Estrogen sensitivity of target genes and expression of nuclear receptor co-regulators in rat prostate after pre- and postnatal exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor, *Environ.Health Perspect.* (Band 115 Suppl 1), Seite 42-50.

Durrer, S.; Maerkel, K.; Schlumpf, M. und Lichtensteiger, W. (2005): Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 5, Seite 2130-2139.

Ebmeier, C. C. und Anderson, R. J. (2004): Human thyroid phenol sulfotransferase enzymes 1A1 and 1A3: activities in normal and diseased thyroid glands, and inhibition by thyroid hormones and phytoestrogens, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Band 89), Nr. 11, Seite 5597-5605.

Elnour, A.; Lieden, S.; Bourdoux, P.; Eltom, M.; Khalid, S. A. und Hambraeus, L. (1998): Traditional fermentation increases goitrogenic activity in pearl millet, *Ann.Nutr.Metab* (Band 42), Nr. 6, Seite 341-349.

Emerson, C. H.; Cohen, J. H., III; Young, R. A.; Alex, S. und Fang, S. L. (1990): Gender-related differences of serum thyroxine-binding proteins in the rat, *Acta Endocrinol (Copenh)* (Band 123), Nr. 1, Seite 72-78.

Engler, D. und Burger, A. G. (1984): The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man, *Endocrine Reviews* (Band 5), Nr. 2, Seite 151-184.

Ericsson, U. B. und Lindgarde, F. (1991): Effects of cigarette smoking on thyroid function and the prevalence of goitre, thyrotoxicosis and autoimmune thyroiditis, *J Intern.Med* (Band 229), Nr. 1, Seite 67-71.

Eszlinger, M.; Holzapfel, H. P.; Voigt, C.; Arkenau, C. und Paschke, R. (2004): RGS 2 expression is regulated by TSH and inhibits TSH receptor signaling, *Eur.J Endocrinol* (Band 151), Nr. 3, Seite 383-390.

Evans, R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* (Band 240), Nr. 4854, Seite 889-895.

Evans, R. M. (2005): The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology, *Mol.Endocrinol.* (Band 19), Nr. 6, Seite 1429-1438.

Fauci, A. S.; Braunwald, E.; Kasper, D. L.; Hauser, S. L.; Longo, D. L.; Jameson, J. L. und Loscalzo, J. (2008): *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition, McGraw-Hill Professional, ISBN: 0071466339.

Fei, X.; Chung, H. und Taylor, H. S. (2005): Methoxychlor disrupts uterine Hoxa10 gene expression, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 8, Seite 3445-3451.

Fekete, C.; Legradi, G.; Mihaly, E.; Huang, Q. H.; Tatro, J. B.; Rand, W. M.; Emerson, C. H. und Lechan, R. M. (2000): alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression, *J.Neurosci.* (Band 20), Nr. 4, Seite 1550-1558.

Feng, X.; Jiang, Y.; Meltzer, P. und Yen, P. M. (2000): Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray, *Mol.Endocrinol.* (Band 14), Nr. 7, Seite 947-955.

Flamant, F.; Gauthier, K. und Samarut, J. (2006): Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming, *Mol.Endocrinol.*

Flamant, F. und Samarut, J. (2003): Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice, *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* (Band 14), Nr. 2, Seite 85-90.

Fliers, E.; Alkemade, A. und Wiersinga, W. M. (2001): The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in critical illness, *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* (Band 15), Nr. 4, Seite 453-464.

Forrest, D.; Hanebuth, E.; Smeyne, R. J.; Everds, N.; Stewart, C. L.; Wehner, J. M. und Curran, T. (1996): Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function, *EMBO J.* (Band 15), Nr. 12, Seite 3006-3015.

Franklyn, J. A.; Wood, D. F.; Balfour, N. J.; Ramsden, D. B.; Docherty, K.; Chin, W. W. und Sheppard, M. C. (1987): Effect of hypothyroidism and thyroid hormone replacement in vivo on pituitary cytoplasmic concentrations of thyrotropin-beta and alpha-subunit messenger ribonucleic acids, *Endocrinology* (Band 120), Nr. 6, Seite 2279-2288.

Friesema, E. C.; Jansen, J.; Heuer, H.; Trajkovic, M.; Bauer, K. und Visser, T. J. (2006): Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8, *Nat. Clin Pract. Endocrinol Metab* (Band 2), Nr. 9, Seite 512-523.

Friesema, E. C.; Jansen, J. und Visser, T. J. (2005): Thyroid hormone transporters, *Biochem. Soc. Trans.* (Band 33), Nr. Pt 1, Seite 228-232.

Furlanetto, T. W.; Nguyen, L. Q. und Jameson, J. L. (1999): Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells, *Endocrinology* (Band 140), Nr. 12, Seite 5705-5711.

Furlow, J. D.; Yang, H. Y.; Hsu, M.; Lim, W.; Ermio, D. J.; Chiellini, G. und Scanlan, T. S. (2004): Induction of larval tissue resorption in *Xenopus laevis* tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1, *J. Biol. Chem.* (Band 279), Nr. 25, Seite 26555-26562.

Gauthier, K.; Chassande, O.; Plateroti, M.; Roux, J. P.; Legrand, C.; Pain, B.; Rousset, B.; Weiss, R.; Trouillas, J. und Samarut, J. (1999): Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development, *The EMBO Journal* (Band 18), Nr. 3, Seite 623-631.

Gauthier, K.; Plateroti, M.; Harvey, C. B.; Williams, G. R.; Weiss, R. E.; Refetoff, S.; Willott, J. F.; Sundin, V.; Roux, J. P.; Malaval, L.; Hara, M.; Samarut, J. und Chassande, O. (2001): Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus, *Molecular and Cellular Biology* (Band 21), Nr. 14, Seite 4748-4760.

Gerard, A. C.; Poncin, S.; Caetano, B.; Sonveaux, P.; Audinot, J. N.; Feron, O.; Colin, I. M. und Soncin, F. (2008): Iodine deficiency induces a thyroid stimulating hormone-independent early phase of microvascular reshaping in the thyroid, *Am J Pathol.* (Band 172), Nr. 3, Seite 748-760.

Gereben, B.; Salvatore, D.; Harney, J. W.; Tu, H. M. und Larsen, P. R. (2001): The human, but not rat, *dio2* gene is stimulated by thyroid transcription factor-1 (TTF-1), *Mol Endocrinol* (Band 15), Nr. 1, Seite 112-124.

Gillam, M. P.; Sidhaye, A. R.; Lee, E. J.; Rutishauser, J.; Stephan, C. W. und Kopp, P. (2004): Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 13, Seite 13004-13010.

Giustina, A. und Wehrenberg, W. B. (1995): Influence of thyroid hormones on the regulation of growth hormone secretion, *Eur.J Endocrinol* (Band 133), Nr. 6, Seite 646-653.

Gloss, B.; Sayen, M. R.; Trost, S. U.; Bluhm, W. F.; Meyer, M.; Swanson, E. A.; Usala, S. J. und Dillmann, W. H. (1999): Altered cardiac phenotype in transgenic mice carrying the delta337 threonine thyroid hormone receptor beta mutant derived from the S family, *Endocrinology* (Band 140), Nr. 2, Seite 897-902.

Goldman, M. (1973): Failure of dimethyl sulfoxide (DMSO) to alter thyroid function in the Sprague-Dawley rat, *Toxicology and Applied Pharmacology* (Band 24), Nr. 1, Seite 73-80.

Grover, G. J.; Mellström, K. und Malm, J. (2007): Therapeutic potential for thyroid hormone receptor-beta selective agonists for treating obesity, hyperlipidemia and diabetes, *Current Vascular Pharmacology* (Band 5), Nr. 2, Seite 141-154.

Guadano-Ferraz, A.; Escamez, M. J.; Morte, B.; Vargiu, P. und Bernal, J. (1997): Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain, *Brain Res.Mol.Brain Res.* (Band 49), Nr. 1-2, Seite 37-44.

Guenther, M. G.; Barak, O. und Lazar, M. A. (2001): The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3, *Mol.Cell Biol.* (Band 21), Nr. 18, Seite 6091-6101.

Guillette, L. J. Jr. (2006): Endocrine disrupting contaminants - beyond the dogma, *Environmental Health Perspectives* (Band 114 Suppl 1), Seite 9-12.

Hall, J. M.; Couse, J. F. und Korach, K. S. (2001): The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 276), Nr. 40, Seite 36869-36872.

Hamann, I.; Seidlova-Wuttke, D.; Wuttke, W. und Köhrle, J. (2006): Effects of isoflavonoids and other plant-derived compounds on the hypothalamus-pituitary-thyroid hormone axis, *Maturitas* (Band 55), Seite S14-S25.

Hamers, T.; Kamstra, J. H.; Sonneveld, E.; Murk, A. J.; Kester, M. H.; Andersson, P. L.; Legler, J. und Brouwer, A. (2006): In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants, *Toxicol.Sci.* (Band 92), Nr. 1, Seite 157-173.

Hamilton, J. A. und Benson, M. D. (2001): Transthyretin: a review from a structural perspective, *Cell Mol Life Sci* (Band 58), Nr. 10, Seite 1491-1521.

- Hampl, R.; Ostatnikova, D.; Celec, P.; Putz, Z.; Lapcik, O. und Matucha, P. (2008): Short-term effect of soy consumption on thyroid hormone levels and correlation with phytoestrogen level in healthy subjects, *Endocrine Regulations* (Band 4), Nr. 2, Seite 53-61.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J.Mol.Biol.* (Band 166), Nr. 4, Seite 557-580.
- Hanamura, A.; Caceres, J. F.; Mayeda, A.; Franza, B. R., Jr. und Krainer, A. R. (1998): Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors, *RNA*. (Band 4), Nr. 4, Seite 430-444.
- Hansen, F. M.; Fahmy, N. und Nielsen, J. H. (1980): The influence of sexual hormones on lipogenesis and lipolysis in rat fat cells, *Acta Endocrinol (Copenh)* (Band 95), Nr. 4, Seite 566-570.
- Hany, J. und Nagel, R. (1995): Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch., *Dt.Lebensmittel Rundschau* (Band 91), Seite 341-345.
- Harris, M.; Aschkenasi, C.; Elias, C. F.; Chandrankunnel, A.; Nillni, E. A.; Bjoorbaek, C.; Elmquist, J. K.; Flier, J. S. und Hollenberg, A. N. (2001): Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling, *J.Clin.Invest* (Band 107), Nr. 1, Seite 111-120.
- Hastings, M. L.; Wilson, C. M. und Munroe, S. H. (2001): A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA, *RNA*. (Band 7), Nr. 6, Seite 859-874.
- Haugen, B. R.; Gordon, D. F.; Nelson, A. R.; Wood, W. M. und Ridgway, E. C. (1994): The combination of Pit-1 and Pit-1T have a synergistic stimulatory effect on the thyrotropin beta-subunit promoter but not the growth hormone or prolactin promoters, *Mol Endocrinol* (Band 8), Nr. 11, Seite 1574-1582.
- Heinzel, T.; Lavinsky, R. M.; Mullen, T. M.; Soderstrom, M.; Laherty, C. D.; Torchia, J.; Yang, W. M.; Brard, G.; Ngo, S. D.; Davie, J. R.; Seto, E.; Eisenman, R. N.; Rose, D. W.; Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (1997): A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression, *Nature* (Band 387), Nr. 6628, Seite 43-48.
- Heneweer, M.; Muusse, M.; van den Berg, M. und Sanderson, J. T. (2005): Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 208), Nr. 2, Seite 170-177.
- Hernandez, A. (2005): Structure and function of the type 3 deiodinase gene, *Thyroid* (Band 15), Nr. 8, Seite 865-874.
- Hernandez, A.; Martinez, M. E.; Fiering, S.; Galton, V. A. und St Germain, D. L. (2006): Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis, *J Clin Invest* (Band 116), Nr. 2, Seite 476-484.
- Heyland, A.; Hodin, J. und Reitzel, A. M. (2005): Hormone signaling in evolution and development: a non-model system approachs, *Bioessays* (Band 27), Nr. 1, Seite 64-75.

Hildebrandt, J. D. und Halmi, N. S. (1981): Intrathyroidally generated iodide: the role of transport in its utilization, *Endocrinology* (Band 108), Nr. 3, Seite 842-849.

Hiroi, Y.; Kim, H. H.; Ying, H.; Furuya, F.; Huang, Z.; Simoncini, T.; Noma, K.; Ueki, K.; Nguyen, N. H.; Scanlan, T. S.; Moskowitz, M. A.; Cheng, S. Y. und Liao, J. K. (2006): Rapid nongenomic actions of thyroid hormone, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 103), Nr. 38, Seite 14104-14109.

Hodin, R. A.; Lazar, M. A. und Chin, W. W. (1990): Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone, *J.Clin.Invest* (Band 85), Nr. 1, Seite 101-105.

Horlein, A. J.; Naar, A. M.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Gloss, B.; Kurokawa, R.; Ryan, A.; Kamei, Y.; Soderstrom, M.; Glass, C. K. und . (1995): Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor, *Nature* (Band 377), Nr. 6548, Seite 397-404.

Howdeshell, K. L. (2002): A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system, *Environ.Health Perspect.* (Band 110 Suppl 3), Seite 337-348.

Hsu, S. M. und Raine, L. (1981): Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* (Band 29), Nr. 11, Seite 1349-1353.

Hu, X. und Lazar, M. A. (1999): The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors, *Nature* (Band 402), Nr. 6757, Seite 93-96.

Hunloh, W. und Goerz, G. (1983): Contact dermatitis from Eusolex 6300, *Contact Dermatitis* (Band 9), Nr. 4, Seite 333-334.

Huo, L.; Munzberg, H.; Nillni, E. A. und Bjorbaek, C. (2004): Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic trh gene expression by leptin, *Endocrinology* (Band 145), Nr. 5, Seite 2516-2523.

Hydovitz, J. D. (1960): Occurrence of goiter in an infant on a soy diet, *N.Engl.J.Med.* (Band 262), Seite 351-353.

Ingraham, H. A.; Albert, V. R.; Chen, R. P.; Crenshaw 3d EB; Elsholtz, H. P.; He, X.; Kapiloff, M. S.; Mangalam, H. J.; Swanson, L. W.; Treacy, M. N. und . (1990): A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development, *Annu.Rev Physiol* (Band 52), Seite 773-791.

Inui, M.; Adachi, T.; Takenaka, S.; Inui, H.; Nakazawa, M.; Ueda, M.; Watanabe, H.; Mori, C.; Iguchi, T. und Miyatake, K. (2003): Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*), *Toxicology* (Band 194), Nr. 1-2, Seite 43-50.

Irvine, C. H.; Fitzpatrick, M. G. und Alexander, S. L. (1998): Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* (Band 217), Nr. 3, Seite 247-253.

Ishizuka, T. und Lazar, M. A. (2003): The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor, *Mol.Cell Biol.* (Band 23), Nr. 15, Seite 5122-5131.

Iwamuro, S.; Sakakibara, M.; Terao, M.; Ozawa, A.; Kurobe, C.; Shigeura, T.; Kato, M. und Kikuyama, S. (2003): Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*, *Gen.Comp Endocrinol.* (Band 133), Nr. 2, Seite 189-198.

Iwatani, M.; Ikegami, K.; Kremenska, Y.; Hattori, N.; Tanaka, S.; Yagi, S. und Shiota, K. (2006): Dimethyl Sulfoxide Has an Impact on Epigenetic Profile in Mouse Embryoid Body, *Stem Cells (Dayton, Ohio)* (Band 24), Nr. 11, Seite 2549-2556.

Jakobs, T. C.; Mentrup, B.; Schmutzler, C.; Dreher, I. und Köhrle, J. (2002): Proinflammatory cytokines inhibit the expression and function of human type I 5'-deiodinase in HepG2 hepatocarcinoma cells, *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* (Band 146), Nr. 4, Seite 559-566.

Janjua, N. R.; Kongshoj, B.; Andersson, A. M. und Wulf, H. C. (2008): Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application, *J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol.* (Band 22), Nr. 4, Seite 456-461.

Janjua, N. R.; Kongshoj, B.; Petersen, J. H. und Wulf, H. C. (2007): Sunscreens and thyroid function in humans after short-term whole-body topical application: a single-blinded study, *Br.J.Dermatol.* (Band 156), Nr. 5, Seite 1080-1082.

Janjua, N. R.; Mogensen, B.; Andersson, A. M.; Petersen, J. H.; Henriksen, M.; Skakkebaek, N. E. und Wulf, H. C. (2004): Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans, *J.Invest Dermatol.* (Band 123), Nr. 1, Seite 57-61.

Jarry, H.; Christoffel, J.; Rimoldi, G.; Koch, L. und Wuttke, W. (2004): Multi-organic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment, *Toxicology* (Band 205), Nr. 1-2, Seite 87-93.

Jiang, W.; Hall, S. R.; Moos, M. P.; Cao, R. Y.; Ishii, S.; Ogunyankin, K. O.; Melo, L. G. und Funk, C. D. (2008): Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury, *Am.J Pathol.* (Band 172), Nr. 3, Seite 592-602.

Joffe, R. T. und Sokolov, S. T. (1994): Thyroid hormones, the brain, and affective disorders, *Crit Rev.Neurobiol.* (Band 8), Nr. 1-2, Seite 45-63.

Johnston, R. F.; Pickett, S. C. und Barker, D. L. (1990): Autoradiography using storage phosphor technology, *Electrophoresis* (Band 11), Nr. 5, Seite 355-360.

Kamegai, J.; Tamura, H.; Shimizu, T.; Ishii, S.; Tatsuguchi, A.; Sugihara, H.; Oikawa, S. und Kineman, R. D. (2004): The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion: GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content, *Endocrinology* (Band 145), Nr. 8, Seite 3731-3738.

Kaptein, E. M.; Moore, G. E.; Ferguson, D. C. und Hoenig, M. (1993): Thyroxine and triiodothyronine distribution and metabolism in thyroxine-replaced athyreotic dogs and normal humans, *Am J Physiol* (Band 264), Nr. 1 Pt 1, Seite E90-100.

Kato, R. und Yamazoe, Y. (1992): Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug toxicity, *Toxicol Lett* (Band 64-65 Spec No), Seite 661-667.

Kero, J.; Ahmed, K.; Wettschureck, N.; Tunaru, S.; Wintermantel, T.; Greiner, E.; Schütz, G. und Offermanns, S. (2007): Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development, *The Journal of Clinical Investigation* (Band 117), Nr. 9, Seite 2399-2407.

Kim, B. (2008): Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate, *Thyroid* (Band 18), Nr. 2, Seite 141-144.

Kim, H.; Lee, T. H.; Hwang, Y. S.; Bang, M. A.; Kim, K. H.; Suh, J. M.; Chung, H. K.; Yu, D. Y.; Lee, K. K.; Kwon, O. Y.; Ro, H. K. und Shong, M. (2001): Methimazole as an antioxidant and immunomodulator in thyroid cells: mechanisms involving interferon-gamma signaling and H₂O₂ scavenging, *Mol.Pharmacol.* (Band 60), Nr. 5, Seite 972-980.

Kimura, N.; Arai, K.; Sahara, Y.; Suzuki, H. und Kimura, N. (1994): Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells, *Endocrinology* (Band 134), Nr. 1, Seite 432-440.

Klann, A.; Levy, G.; Lutz, I.; Muller, C.; Kloas, W. und Hildebrandt, J. P. (2005): Estrogen-like effects of ultraviolet screen 3-(4-methylbenzylidene)-camphor (Eusolex 6300) on cell proliferation and gene induction in mammalian and amphibian cells, *Environ.Res.* (Band 97), Nr. 3, Seite 274-281.

Klein, I. und Danzi, S. (2007): Thyroid disease and the heart, *Circulation* (Band 116), Nr. 15, Seite 1725-1735.

Klein, I. und Ojamaa, K. (2001): Thyroid hormone and the cardiovascular system, *N.Engl.J.Med.* (Band 344), Nr. 7, Seite 501-509.

Klein, M. und Catargi, B. (2007): VEGF in physiological process and thyroid disease, *Ann.Endocrinol (Paris)* (Band 68), Nr. 6, Seite 438-448.

Klein, M.; Schadereit, R. und Kuchenmeister, U. (2000): Energy metabolism and thyroid hormone levels of growing rats in response to different dietary proteins--soy protein or casein, *Arch.Tierernahr.* (Band 53), Nr. 2, Seite 99-125.

Kloas, W. und Lutz, I. (2006): Amphibians as model to study endocrine disrupters, *J.Chromatogr.A.*

Knudsen, N.; Bulow, I.; Laurberg, P.; Perrild, H.; Ovesen, L. und Jorgensen, T. (2002a): High occurrence of thyroid multinodularity and low occurrence of subclinical hypothyroidism among tobacco smokers in a large population study, *J Endocrinol* (Band 175), Nr. 3, Seite 571-576.

- Knudsen, N.; Laurberg, P.; Perrild, H.; Bulow, I.; Ovesen, L. und Jorgensen, T. (2002b): Risk factors for goiter and thyroid nodules, *Thyroid* (Band 12), Nr. 10, Seite 879-888.
- Koenig, R. J.; Leonard, J. L.; Senator, D.; Rappaport, N.; Watson, A. Y. und Larsen, P. R. (1984): Regulation of thyroxine 5'-deiodinase activity by 3,5,3'-triiodothyronine in cultured rat anterior pituitary cells, *Endocrinology* (Band 115), Nr. 1, Seite 324-329.
- Koenig, Ronald J. (2005): Regulation of type 1 iodothyronine deiodinase in health and disease, *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* (Band 15), Nr. 8, Seite 835-840.
- Köhrle, J. (1992): The trace components--selenium and flavonoids--affect iodothyronine deiodinases, thyroid hormone transport and TSH regulation, *Acta Med.Austriaca* (Band 19 Suppl 1), Seite 13-17.
- Köhrle, J. (1999): Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family, *Molecular and Cellular Endocrinology* (Band 151), Nr. 1-2, Seite 103-119.
- Köhrle, J. (2000): The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action, *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* (Band 57), Nr. 13-14, Seite 1853-1863.
- Köhrle, J. (2002): Iodothyronine deiodinases, *Methods Enzymol.* (Band 347), Seite 125-167.
- Köhrle, J. (2007): Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination, *Best Practice & Research.Clinical Endocrinology & Metabolism* (Band 21), Nr. 2, Seite 173-191.
- Köhrle, J. (2008): Environment and endocrinology: the case of thyroidology, *Annales D'endocrinologie* (Band 69), Nr. 2, Seite 116-122.
- Köhrle, J.; Fang, S. L.; Yang, Y.; Irmischer, K.; Hesch, R. D.; Pino, S.; Alex, S. und Braverman, L. E. (1989): Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat, *Endocrinology* (Band 125), Nr. 1, Seite 532-537.
- Köhrle, J.; Schomburg, L.; Drescher, S.; Fekete, E. und Bauer, K. (1995): Rapid stimulation of type I 5'-deiodinase in rat pituitaries by 3,3',5-triiodo-L-thyronine, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 108), Nr. 1-2, Seite 17-21.
- Köhrle, J.; Spanka, M.; Irmischer, K. und Hesch, R. D. (1988): Flavonoid effects on transport, metabolism and action of thyroid hormones, *Prog.Clin.Biol.Res.* (Band 280), Seite 323-340.
- Koibuchi, N.; Gibbs, R. B.; Jones, K. E.; Yamaoka, S.; Chin, W. W.; Pfaff, D. W. und Suzuki, M. (1993): Increase in c-erbA alpha 2 mRNA in the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus following thyroidectomy in the adult male rat, *Neurosci Lett* (Band 164), Nr. 1-2, Seite 159-162.
- Kretschmer, X. C. und Baldwin, W. S. (2005): CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters?, *Chem.Biol.Interact.* (Band 155), Nr. 3, Seite 111-128.

- Kronenberg, H. M.; Melmed, S.; Polonsky, K. S. und Larsen, P. R. (2007): Williams Textbook of Endocrinology, Saunders, ISBN: 1416029117.
- Kuiper, G. G.; Kester, M. H.; Peeters, R. P. und Visser, T. J. (2005): Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination, *Thyroid* (Band 15), Nr. 8, Seite 787-798.
- Kumar, H.; Daykin, J.; Holder, R.; Watkinson, J. C.; Sheppard, M. C. und Franklyn, J. A. (1999): Gender, clinical findings, and serum thyrotropin measurements in the prediction of thyroid neoplasia in 1005 patients presenting with thyroid enlargement and investigated by fine-needle aspiration cytology, *Thyroid* (Band 9), Nr. 11, Seite 1105-1109.
- Kunz, P. Y.; Galicia, H. F. und Fent, K. (2004): Assessment of hormonal activity of UV filters in tadpoles of frog *Xenopus laevis* at environmental concentrations, *Mar. Environ. Res.* (Band 58), Nr. 2-5, Seite 431-435.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (Band 227), Nr. 5259, Seite 680-685.
- Landel, C. C.; Kushner, P. J. und Greene, G. L. (1994): The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins, *Mol Endocrinol* (Band 8), Nr. 10, Seite 1407-1419.
- Langhals, H. und Fuchs, K. (2004): Chemie am Strand - Sonnenstrahlung, Hautreaktionen und Sonnenschutz., *Chemie in unserer Zeit* (Band 38), Seite 98-112.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A.; de Lange, P. und Goglia, F. (2001): Control of energy metabolism by iodothyronines, *J. Endocrinol. Invest* (Band 24), Nr. 11, Seite 897-913.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A. und Goglia, F. (2003): Thyroid hormone and uncoupling proteins, *FEBS Lett* (Band 543), Nr. 1-3, Seite 5-10.
- Laugwitz, K. L.; Allgeier, A.; Offermanns, S.; Spicher, K.; Van, Sande J.; Dumont, J. E. und Schultz, G. (1996): The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (Band 93), Nr. 1, Seite 116-120.
- Laurenco, R. (1996): Neurologic manifestations of thyroid disease., *Endocrinologist*, Nr. 6, Seite 467-473.
- Laurent, E.; Mockel, J.; Van, Sande J.; Graff, I. und Dumont, J. E. (1987): Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid, *Mol Cell Endocrinol* (Band 52), Nr. 3, Seite 273-278.
- Lean, A. D.; Ferland, L.; Drouin, J.; Kelly, P. A. und Labrie, F. (1977): Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones, *Endocrinology* (Band 100), Nr. 6, Seite 1496-1504.
- Lechan, R. M.; Qi, Y.; Jackson, I. M. und Mahdavi, V. (1994): Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus, *Endocrinology* (Band 135), Nr. 1, Seite 92-100.

- Leonard, J. L. und Rosenberg, I. N. (1980): Characterization of essential enzyme sulfhydryl groups of thyroxine 5'-deiodinase from rat kidney, *Endocrinology* (Band 106), Nr. 2, Seite 444-451.
- Lim, C. F.; Loidl, N. M.; Kennedy, J. A.; Topliss, D. J. und Stockigt, J. R. (1996): Drug effects on triiodothyronine uptake by rat anterior pituitary cells in vitro, *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* (Band 104), Nr. 2, Seite 151-157.
- Lim, W.; Nguyen, N. H.; Yang, H. Y.; Scanlan, T. S. und Furlow, J. D. (2002): A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action in vivo, *J.Biol.Chem.* (Band 277), Nr. 38, Seite 35664-35670.
- Lima, L. P.; Barros, I. A.; Lisboa, P. C.; Araujo, R. L.; Silva, A. C.; Rosenthal, D.; Ferreira, A. C. und Carvalho, D. P. (2006): Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats, *Steroids* (Band 71), Nr. 8, Seite 653-659.
- Lueprasitsakul, W.; Alex, S.; Fang, S. L.; Pino, S.; Irmischer, K.; Köhrle, J. und Braverman, L. E. (1990): Flavonoid administration immediately displaces thyroxine (T4) from serum transthyretin, increases serum free T4, and decreases serum thyrotropin in the rat, *Endocrinology* (Band 126), Nr. 6, Seite 2890-2895.
- Macchia, P. E.; Takeuchi, Y.; Kawai, T.; Cua, K.; Gauthier, K.; Chassande, O.; Seo, H.; Hayashi, Y.; Samarut, J.; Murata, Y.; Weiss, R. E. und Refetoff, S. (2001): Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 98), Nr. 1, Seite 349-354.
- Mackenzie, J. B.; Mackenzie, C. G. und McCollum, E. V. (1941): The Effect of Sulfanilylguanidine on the Thyroid of the Rat, *Science* (Band 94), Nr. 2448, Seite 518-519.
- Maeda, K. I.; Tsukamura, H.; Uchida, E.; Ohkura, N.; Ohkura, S. und Yokoyama, A. (1989): Changes in the pulsatile secretion of LH after the removal of and subsequent resuckling by pups in ovariectomized lactating rats, *J Endocrinol* (Band 121), Nr. 2, Seite 277-283.
- Maerkel, K.; Durrer, S.; Henseler, M.; Schlumpf, M. und Lichtensteiger, W. (2007): Sexually dimorphic gene regulation in brain as a target for endocrine disrupters: developmental exposure of rats to 4-methylbenzylidene camphor, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 218), Nr. 2, Seite 152-165.
- Maglich, J. M.; Stoltz, C. M.; Goodwin, B.; Hawkins-Brown, D.; Moore, J. T. und Kliewer, S. A. (2002): Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification, *Mol Pharmacol* (Band 62), Nr. 3, Seite 638-646.
- Makowski, R.; Davies, R. und Gibson, G. G. (1982): Species differences in cytochromes P450 and their corresponding messenger RNA's, *Q.Rev Drug Metab Drug Interact.* (Band 4), Nr. 2-3, Seite 123-170.
- Mannisto, P. T.; Ranta, T. und Leppaluoto, J. (1979): Effects of methylmercaptoimidazole (MMI), propylthiouracil (PTU), potassium perchlorate (KClO₄) and potassium iodide (KI) on the serum concentrations of thyrotrophin (TSH)

and thyroid hormones in the rat, *Acta Endocrinol (Copenh)* (Band 91), Nr. 2, Seite 271-281.

Marcocci, C.; Valente, W. A.; Pinchera, A.; Aloj, S. M.; Kohn, L. D. und Grollman, E. F. (1983): Graves' IgG stimulation of iodide uptake in FRTL-5 rat thyroid cells: a clinical assay complementing FRTL-5 assays measuring adenylate cyclase and growth-stimulating antibodies in autoimmune thyroid disease, *J.Endocrinol.Invest* (Band 6), Nr. 6, Seite 463-471.

Mariash, C. N.; Kaiser, F. E.; Schwartz, H. L.; Towle, H. C. und Oppenheimer, J. H. (1980): Synergism of thyroid hormone and high carbohydrate diet in the induction of lipogenic enzymes in the rat. Mechanisms and implications, *J Clin Invest* (Band 65), Nr. 5, Seite 1126-1134.

Martin-Belmonte, F.; Alonso, M. A.; Zhang, X. und Arvan, P. (2000): Thyroglobulin is selected as luminal protein cargo for apical transport via detergent-resistant membranes in epithelial cells, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 52, Seite 41074-41081.

Matissek, R. (1984): [Skin tanning and light protection-theory, agents and analytic aspects. 1. Skin tanning and skin tanning agents], *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* (Band 179), Nr. 4, Seite 279-287.

Mayeda, A. und Krainer, A. R. (1992): Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2, *Cell* (Band 68), Nr. 2, Seite 365-375.

McLachlan, J. A. (2001): Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals, *Endocr.Rev.* (Band 22), Nr. 3, Seite 319-341.

Mendel, C. M. (1989): The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model, *Endocrine Reviews* (Band 10), Nr. 3, Seite 232-274.

Mendel, C. M.; Cavalieri, R. R. und Köhrle, J. (1992): Thyroxine (T4) transport and distribution in rats treated with EMD 21388, a synthetic flavonoid that displaces T4 from transthyretin, *Endocrinology* (Band 130), Nr. 3, Seite 1525-1532.

Menditto, A. und Turrio-Baldassarri, L. (1999): Environmental and biological monitoring of endocrine disrupting chemicals, *Chemosphere* (Band 39), Nr. 8, Seite 1301-1307.

Mennen, L. I.; Walker, R.; Bennetau-Pelissero, C. und Scalbert, A. (2005): Risks and safety of polyphenol consumption, *Am.J.Clin.Nutr.* (Band 81), Nr. 1, Seite 326S-329S.

Messina, M. und Redmond, G. (2006): Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature, *Thyroid* (Band 16), Nr. 3, Seite 249-258.

Mitsuma, T.; Ito, Y.; Hirooka, Y.; Kayama, M.; Iyumi, M.; Hasegawa, M.; Shin, K.; Mori, Y.; Adachi, K.; Sato, T. und Tauchi, H. (1998): The effects of Soybean Diet on Thyroid Hormone and Thyrotropin Levels in Aging Rats, *Endocr.Regul.* (Band 32), Nr. 4, Seite 183-186.

Moore, J. T. und Klierer, S. A. (2000): Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions, *Toxicology* (Band 153), Nr. 1-3, Seite 1-10.

- Moreno, M.; Berry, M. J.; Horst, C.; Thoma, R.; Goglia, F.; Harney, J. W.; Larsen, P. R. und Visser, T. J. (1994): Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase, *FEBS Lett.* (Band 344), Nr. 2-3, Seite 143-146.
- Mori, K.; Stone, S.; Braverman, L. E. und Devito, W. J. (1996): Involvement of tyrosine phosphorylation in the regulation of 5'-deiodinases in FRTL-5 rat thyroid cells and rat astrocytes, *Endocrinology* (Band 137), Nr. 4, Seite 1313-1318.
- Morita, M.; Kobayashi, A.; Yamashita, T.; Shimanuki, T.; Nakajima, O.; Takahashi, S.; Ikegami, S.; Inokuchi, K.; Yamashita, K.; Yamamoto, M. und Fujii-Kuriyama, Y. (2003): Functional analysis of basic transcription element binding protein by gene targeting technology, *Mol. Cell Biol.* (Band 23), Nr. 7, Seite 2489-2500.
- Moriyama, K.; Tagami, T.; Akamizu, T.; Usui, T.; Saijo, M.; Kanamoto, N.; Hataya, Y.; Shimatsu, A.; Kuzuya, H. und Nakao, K. (2002): Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Band 87), Nr. 11, Seite 5185-5190.
- Motta, M.; Sterescu, N.; Piva, F. und Martini, L. (1969): The participation of "short" feedback mechanisms in the control of ACTH and TSH secretion, *Acta Neurol Psychiatr. Belg.* (Band 69), Nr. 7, Seite 501-507.
- Munoz, A.; Zenke, M.; Gehring, U.; Sap, J.; Beug, H. und Vennström, B. (1988): Characterization of the hormone-binding domain of the chicken c-erbA/thyroid hormone receptor protein, *EMBO J.* (Band 7), Nr. 1, Seite 155-159.
- Naciff, J. M. und Daston, G. P. (2004): Toxicogenomic approach to endocrine disrupters: identification of a transcript profile characteristic of chemicals with estrogenic activity, *Toxicol Pathol.* (Band 32 Suppl 2), Seite 59-70.
- Nagayama, Y.; Tanaka, K.; Namba, H.; Yamashita, S. und Niwa, M. (1996): Expression and regulation of G protein-coupled receptor kinase 5 and beta-arrestin-1 in rat thyroid FRTL5 cells, *Thyroid* (Band 6), Nr. 6, Seite 627-631.
- Nagy, L.; Kao, H. Y.; Love, J. D.; Li, C.; Banayo, E.; Gooch, J. T.; Krishna, V.; Chatterjee, K.; Evans, R. M. und Schwabe, J. W. (1999): Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors, *Genes Dev.* (Band 13), Nr. 24, Seite 3209-3216.
- Nelson, C.; Albert, V. R.; Elsholtz, H. P.; Lu, L. I. und Rosenfeld, M. G. (1988): Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor, *Science* (Band 239), Nr. 4846, Seite 1400-1405.
- Ness, G. C.; Lopez, D.; Chambers, C. M.; Newsome, W. P.; Cornelius, P.; Long, C. A. und Harwood, H. J., Jr. (1998): Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression, *Biochem. Pharmacol.* (Band 56), Nr. 1, Seite 121-129.
- Nikodem, V. M.; Magnuson, M. A.; Dozin, B. und Morioka, H. (1989): Coding nucleotide sequence of rat malic enzyme mRNA and tissue specific regulation by thyroid hormone, *Endocr. Res* (Band 15), Nr. 4, Seite 547-564.

- Nilni, E. A. (2007): Regulation of prohormone convertases in hypothalamic neurons: implications for prothyrotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin, *Endocrinology* (Band 148), Nr. 9, Seite 4191-4200.
- Nilni, E. A.; Vaslet, C.; Harris, M.; Hollenberg, A.; Bjorbak, C. und Flier, J. S. (2000): Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 46, Seite 36124-36133.
- Nobrega, J. N.; Raymond, R.; Puymirat, J.; Belej, T. und Joffe, R. T. (1997): Regional changes in beta1 thyroid hormone receptor immunoreactivity in rat brain after thyroidectomy, *Brain Res* (Band 761), Nr. 1, Seite 161-164.
- Nunez, J. (1984): Effects of thyroid hormones during brain differentiation, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 37), Nr. 2, Seite 125-132.
- O'Connor, J. C.; Frame, S. R. und Ladics, G. S. (2002): Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators, *Toxicol Sci* (Band 69), Nr. 1, Seite 79-91.
- O'Shea, P. J. und Williams, G. R. (2002): Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice, *The Journal of Endocrinology* (Band 175), Nr. 3, Seite 553-570.
- Oberste-Berghaus, C.; Zanger, K.; Hashimoto, K.; Cohen, R. N.; Hollenberg, A. N. und Wondisford, F. E. (2000): Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 3, Seite 1787-1792.
- Oetting, A. und Yen, P. M. (2007): New insights into thyroid hormone action, *Best Pract.Res Clin Endocrinol Metab* (Band 21), Nr. 2, Seite 193-208.
- Okajima, F.; Akbar, M.; Abdul Majid, M.; Sho, K.; Tomura, H. und Kondo, Y. (1994): Genistein, an inhibitor of protein tyrosine kinase, is also a competitive antagonist for P1-purinergic (adenosine) receptor in FRTL-5 thyroid cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 203), Nr. 3, Seite 1488-1495.
- Olea, N.; Pulgar, R.; Perez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A. M. und Sonnenschein, C. (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, *Environ.Health Perspect.* (Band 104), Nr. 3, Seite 298-305.
- Ong, T.; Whong, W. Z.; Xu, J.; Burchell, B.; Green, F. H. und Lewis, T. (1985): Genotoxicity studies of rodents exposed to coal dust and diesel emission particulates, *Environmental Research* (Band 37), Nr. 2, Seite 399-409.
- Opitz, R.; Braunbeck, T.; Bogi, C.; Pickford, D. B.; Nentwig, G.; Oehlmann, J.; Tooi, O.; Lutz, I. und Kloas, W. (2005): Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds, *Environ.Toxicol.Chem.* (Band 24), Nr. 3, Seite 653-664.
- Opitz, R.; Hartmann, S.; Blank, T.; Braunbeck, T.; Lutz, I. und Kloas, W. (2006): Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid

system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles, *Toxicol.Sci.* (Band 90), Nr. 2, Seite 337-348.

Oppenheimer, J. H.; Schwartz, H. L.; Mariash, C. N.; Kinlaw, W. B.; Wong, N. C. und Freake, H. C. (1987): Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level, *Endocr.Rev.* (Band 8), Nr. 3, Seite 288-308.

Padilla-Banks, E.; Jefferson, W. N. und Newbold, R. R. (2001): The immature mouse is a suitable model for detection of estrogenicity in the uterotrophic bioassay, *Environmental Health Perspectives* (Band 109), Nr. 8, Seite 821-826.

Palha, J. A. (2002): Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited, *Clin Chem Lab Med* (Band 40), Nr. 12, Seite 1292-1300.

Palkovits, M. (1973): Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat, *Brain Res.* (Band 59), Seite 449-450.

Parkening, T. A.; Collins, T. J. und Smith, E. R. (1982): Plasma and pituitary concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin in aged, ovariectomized CD-1 and C57BL/6 mice, *Experimental Gerontology* (Band 17), Nr. 6, Seite 437-443.

Parmentier, M.; Libert, F.; Maenhaut, C.; Lefort, A.; Gerard, C.; Perret, J.; van Sande J.; Dumont, J. E. und Vassart, G. (1989): Molecular cloning of the thyrotropin receptor, *Science* (Band 246), Nr. 4937, Seite 1620-1622.

Paxinos, G. und Watson, C. (1998): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition. Auflage, Academic Press.

Pedraza, P.; Calvo, R.; Obregon, M. J.; Asuncion, M.; Escobar del Rey F. und Morreale de Escobar, G. M. (1996): Displacement of T4 from transthyretin by the synthetic flavonoid EMD 21388 results in increased production of T3 from T4 in rat dams and fetuses, *Endocrinology* (Band 137), Nr. 11, Seite 4902-4914.

Perello, M.; Friedman, T.; Paez-Espinosa, V.; Shen, X.; Stuart, R. C. und Nillni, E. A. (2006): Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 6, Seite 2705-2716.

Perello, M. und Nillni, E. A. (2007): The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH), *Front Biosci.* (Band 12), Seite 3554-3565.

Perissi, V.; Aggarwal, A.; Glass, C. K.; Rose, D. W. und Rosenfeld, M. G. (2004): A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors, *Cell* (Band 116), Nr. 4, Seite 511-526.

Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W. und Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* (Band 30), Nr. 9, Seite e36.

- Pfäffle, RW.; Kim, C.; Otten, B.; Wit, J. M.; Eiholzer, U.; Heimann, G. und Parks, J. S. (1996): Pit-1: clinical aspects, *Hormone Research* (Band 45 Suppl 1), Seite 25-28.
- Piehl, S.; Heberer, T.; Balizs, G.; Scanlan, T. S.; Smits, R.; Kokscho, B. und Köhrle, J. (2008): Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases, *Endocrinology* (Band 149), Nr. 6, Seite 3037-3045.
- Pinchera, A.; MacGillivray, M. H.; Crawford, J. D. und Freeman, A. G. (1965): Thyroid refractoriness in an athyreotic cretin fed soybean formula, *N.Engl.J Med* (Band 273), Seite 83-87.
- Plateroti, M.; Gauthier, K.; Domon-Dell, C.; Freund, J. N.; Samarut, J. und Chassande, O. (2001): Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development, *Molecular and Cellular Biology* (Band 21), Nr. 14, Seite 4761-4772.
- Prummel, M. F.; Brokken, L. J. und Wiersinga, W. M. (2004): Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion, *Thyroid* (Band 14), Nr. 10, Seite 825-829.
- Radetti, G.; Zavallone, A.; Gentili, L.; Beck-Peccoz, P. und Bona, G. (2002): Foetal and neonatal thyroid disorders, *Minerva Pediatr.* (Band 54), Nr. 5, Seite 383-400.
- Radovic, B.; Mentrup, B. und Köhrle, J. (2006): Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid, *Br.J.Nutr.* (Band 95), Nr. 6, Seite 1171-1176.
- Raspe, E.; Laurent, E.; Andry, G. und Dumont, J. E. (1991): ATP, bradykinin, TRH and TSH activate the Ca(2+)-phosphatidylinositol cascade of human thyrocytes in primary culture, *Mol Cell Endocrinol* (Band 81), Nr. 1-3, Seite 175-183.
- Ribeiro, M. O. (2008): Effects of thyroid hormone analogs on lipid metabolism and thermogenesis, *Thyroid* (Band 18), Nr. 2, Seite 197-203.
- Richardson, S. J. (2007): Cell and molecular biology of transthyretin and thyroid hormones, *Int.Rev Cytol.* (Band 258), Seite 137-193.
- Riedel, C.; Levy, O. und Carrasco, N. (2001): Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter (NIS) by thyrotropin, *J.Biol.Chem.*, Seite M100561200-M100561200.
- Rimoldi, G.; Christoffel, J.; Seidlova-Wuttke, D.; Jarry, H. und Wuttke, W. (2007): Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina, *Environmental Health Perspectives* (Band 115 Suppl 1), Seite 62-68.
- Ripp, J. A. (1961): Soybean-induced goiter, *Am.J.Dis.Child* (Band 102), Seite 106-109.
- Roberts, C. G. und Ladenson, P. W. (2004): Hypothyroidism, *Lancet* (Band 363), Nr. 9411, Seite 793-803.
- Román, G. C. (2007): Autism: transient in utero hypothyroxinemia related to maternal flavonoid ingestion during pregnancy and to other environmental antithyroid agents, *Journal of the Neurological Sciences* (Band 262), Nr. 1-2, Seite 15-26.

Rondeel, J. M.; de Greef, W. J.; Klootwijk, W. und Visser, T. J. (1992): Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats, *Endocrinology* (Band 130), Nr. 2, Seite 651-656.

Rossmann, W. G.; Handke-Vesely, A.; Wirth, U. und Scherbaum, W. A. (1994): Does the gonadotropin pulsatility of postmenopausal women represent the unrestrained hypothalamic-pituitary activity?, *Eur.J Endocrinol* (Band 130), Nr. 5, Seite 485-493.

Roth, C.; Schrick, M.; Lakomek, M.; Strege, A.; Heiden, I.; Luft, H.; Munzel, U.; Wuttke, W. und Jarry, H. (2001): Autoregulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in a female rat model, *J Endocrinol* (Band 169), Nr. 2, Seite 361-371.

Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Methods Mol.Biol.* (Band 132), Seite 365-386.

Sadow, P. M.; Koo, E. K.; Chassande, O.; Gauthier, K.; Samarut, J.; Xu, J.; O'Malley, B. W.; Seo, H.; Murata, Y. und Weiss, R. E. (2003): Thyroid hormone receptor-specific interactions with steroid receptor coactivator-1 in the pituitary, *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.) (Band 17), Nr. 5, Seite 882-894.

Salto, C.; Kindblom, J. M.; Johansson, C.; Wang, Z.; Gullberg, H.; Nordstrom, K.; Mansen, A.; Ohlsson, C.; Thoren, P.; Forrest, D. und Vennström, B. (2001): Ablation of TRalpha2 and a concomitant overexpression of alpha1 yields a mixed hypo- and hyperthyroid phenotype in mice, *Mol.Endocrinol.* (Band 15), Nr. 12, Seite 2115-2128.

Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN: ISBN 0-87969-577-3.

Sanchez, V. C.; Goldstein, J.; Stuart, R. C.; Hovanesian, V.; Huo, L.; Munzberg, H.; Friedman, T. C.; Bjorbaek, C. und Nilni, E. A. (2004): Regulation of hypothalamic prohormone convertases 1 and 2 and effects on processing of prothyrotropin-releasing hormone, *J Clin Invest* (Band 114), Nr. 3, Seite 357-369.

Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-5467.

Santiago-Fernandez, P.; Torres-Barahona, R.; Muela-Martinez, J. A.; Rojo-Martinez, G.; Garcia-Fuentes, E.; Garriga, M. J.; Leon, A. G. und Soriguer, F. (2004): Intelligence quotient and iodine intake: a cross-sectional study in children, *J Clin Endocrinol Metab* (Band 89), Nr. 8, Seite 3851-3857.

Santini, F.; Vitti, P.; Ceccarini, G.; Mammoli, C.; Rosellini, V.; Pelosini, C.; Marsili, A.; Tonacchera, M.; Agretti, P.; Santoni, T.; Chiovato, L. und Pinchera, A. (2003): In vitro assay of thyroid disruptors affecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity, *J Endocrinol Invest* (Band 26), Nr. 10, Seite 950-955.

Sarkar, D. K.; Miki, N.; Xie, Q. W. und Meites, J. (1984): Inhibition by estrogen of autofeedback regulation of prolactin secretion, *Life Sciences* (Band 34), Nr. 19, Seite 1819-1823.

Sato, K.; Yamazaki, K.; Shizume, K.; Kanaji, Y.; Obara, T.; Ohsumi, K.; Demura, H.; Yamaguchi, S. und Shibuya, M. (1995): Stimulation by thyroid-stimulating hormone and Grave's immunoglobulin G of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human thyroid follicles in vitro and flt mRNA expression in the rat thyroid in vivo, *J Clin Invest* (Band 96), Nr. 3, Seite 1295-1302.

Schauer, U. M.; Volkel, W.; Heusener, A.; Colnot, T.; Broschard, T. H.; von Landenberg F. und Dekant, W. (2006): Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats and humans after dermal application, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 216), Nr. 2, Seite 339-346.

Schlumpf, M.; Cotton, B.; Conscience, M.; Haller, V.; Steinmann, B. und Lichtensteiger, W. (2001): In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens, *Environ.Health Perspect.* (Band 109), Nr. 3, Seite 239-244.

Schlumpf, M.; Durrer, S.; Faass, O.; Ehnes, C.; Fuetsch, M.; Gaille, C.; Henseler, M.; Hofkamp, L.; Maerkel, K.; Reolon, S.; Timms, B.; Tresguerres, J. A. und Lichtensteiger, W. (2008): Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review, *Int.J.Androl* (Band 31), Nr. 2, Seite 144-151.

Schlumpf, M.; Jarry, H.; Wuttke, W.; Ma, R. und Lichtensteiger, W. (2004a): Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor, *Toxicology* (Band 199), Nr. 2-3, Seite 109-120.

Schlumpf, M.; Schmid, P.; Durrer, S.; Conscience, M.; Maerkel, K.; Henseler, M.; Gruetter, M.; Herzog, I.; Reolon, S.; Ceccatelli, R.; Faass, O.; Stutz, E.; Jarry, H.; Wuttke, W. und Lichtensteiger, W. (2004b): Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update, *Toxicology* (Band 205), Nr. 1-2, Seite 113-122.

Schmutzler, C.; Bacinski, A.; Gotthardt, I.; Huhne, K.; Ambrugger, P.; Klammer, H.; Schlecht, C.; Hoang-Vu, C.; Grüters, A.; Wuttke, W.; Jarry, H. und Köhrle, J. (2007): The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase, *Endocrinology* (Band 148), Nr. 6, Seite 2835-2844.

Schmutzler, C.; Hamann, I.; Hofmann, P. J.; Kovacs, G.; Stemmler, L.; Mentrup, B.; Schomburg, L.; Ambrugger, P.; Grüters, A.; Seidlova-Wuttke, D.; Jarry, H.; Wuttke, W. und Köhrle, J. (2004): Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney, *Toxicology* (Band 205), Nr. 1-2, Seite 95-102.

Schmutzler, C.; Winzer, R.; Meissner-Weigl, J. und Köhrle, J. (1997): Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 240), Nr. 3, Seite 832-838.

Schneider, M. J.; Fiering, S. N.; Pallud, S. E.; Parlow, A. F.; St Germain, D. L. und Galton, V. A. (2001): Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4, *Molecular Endocrinology* (Baltimore, Md.) (Band 15), Nr. 12, Seite 2137-2148.

Schneider, M. J.; Fiering, S. N.; Thai, B.; Wu, S. Y.; St Germain, E.; Parlow, A. F.; St Germain, D. L. und Galton, V. A. (2005): Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice., *Endocrinology*.

Schomburg, L. und Bauer, K. (1995): Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme, *Endocrinology* (Band 136), Nr. 8, Seite 3480-3485.

Schomburg, L. und Bauer, K. (1997): Regulation of the adenohipophyseal thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by estradiol, *Endocrinology* (Band 138), Nr. 9, Seite 3587-3593.

Schonfelder, G.; Wittfoht, W.; Hopp, H.; Talsness, C. E.; Paul, M. und Chahoud, I. (2002): Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit, *Environ.Health Perspect.* (Band 110), Nr. 11, Seite A703-A707.

Schröder-van der Elst, J. P.; van der Heide, D. und Köhrle, J. (1991): In vivo effects of flavonoid EMD 21388 on thyroid hormone secretion and metabolism in rats, *Am.J.Physiol* (Band 261), Nr. 2 Pt 1, Seite E227-E232.

Schröder-van der Elst, J. P.; van der Heide, D.; Rokos, H.; Köhrle, J. und Morreale de Escobar, G. (1997): Different tissue distribution, elimination, and kinetics of thyroxine and its conformational analog, the synthetic flavonoid EMD 49209 in the rat, *Endocrinology* (Band 138), Nr. 1, Seite 79-84.

Schröder-van der Elst, J. P.; van der Heide, D.; Rokos, H.; Morreale de Escobar, G. und Köhrle, J. (1998): Synthetic flavonoids cross the placenta in the rat and are found in fetal brain, *The American Journal of Physiology* (Band 274), Nr. 2 Pt 1, Seite E253-E256.

Schröder-van der Elst, J. P.; van der Heide, D.; Romijn, J. A. und Smit, J. W. (2004): Differential effects of natural flavonoids on growth and iodide content in a human Na⁺/I⁻-symporter-transfected follicular thyroid carcinoma cell line, *Eur.J.Endocrinol.* (Band 150), Nr. 4, Seite 557-564.

Schuur, A. G.; Leeuwen-Bol, I.; Jong, W. M.; Bergman, A.; Coughtrie, M. W.; Brouwer, A. und Visser, T. J. (1998): In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by polychlorobiphenyls: isozyme specificity and inhibition kinetics, *Toxicol.Sci.* (Band 45), Nr. 2, Seite 188-194.

Schwartz, H. L.; Strait, K. A.; Ling, N. C. und Oppenheimer, J. H. (1992): Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity, *J.Biol.Chem.* (Band 267), Nr. 17, Seite 11794-11799.

Schweizer, U.; Weitzel, J. M. und Schomburg, L. (2008): Think globally: act locally. New insights into the local regulation of thyroid hormone availability challenge long accepted dogmas, *Mol Cell Endocrinol* (Band 289), Nr. 1-2, Seite 1-9.

Segerson, T. P.; Kauer, J.; Wolfe, H. C.; Mobtaker, H.; Wu, P.; Jackson, I. M. und Lechan, R. M. (1987): Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus, *Science* (Band 238), Nr. 4823, Seite 78-80.

- Seidlova-Wuttke, D.; Christoffel, J.; Rimoldi, G.; Jarry, H. und Wuttke, W. (2006): Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 214), Nr. 1, Seite 1-7.
- Seidlova-Wuttke, D.; Jarry, H.; Christoffel, J.; Rimoldi, G. und Wuttke, W. (2005): Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: a 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats, *Toxicology* (Band 213), Nr. 1-2, Seite 13-24.
- Setchell, K. D.; Zimmer-Nechemias, L.; Cai, J. und Heubi, J. E. (1997): Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula, *Lancet* (Band 350), Nr. 9070, Seite 23-27.
- Setchell, K. D.; Zimmer-Nechemias, L.; Cai, J. und Heubi, J. E. (1998): Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life, *Am.J.Clin.Nutr.* (Band 68), Nr. 6 Suppl, Seite 1453S-1461S.
- Shao, Y. Y.; Wang, L. und Ballock, R. T. (2006): Thyroid hormone and the growth plate, *Rev Endocr.Metab Disord* (Band 7), Nr. 4, Seite 265-271.
- Shen, X.; Li, Q. L.; Brent, G. A. und Friedman, T. C. (2004): Thyroid hormone regulation of prohormone convertase 1 (PC1): regional expression in rat brain and in vitro characterization of negative thyroid hormone response elements, *J.Mol.Endocrinol.* (Band 33), Nr. 1, Seite 21-33.
- Shen, X.; Li, Q. L.; Brent, G. A. und Friedman, T. C. (2005): Regulation of regional expression in rat brain PC2 by thyroid hormone/characterization of novel negative thyroid hormone response elements in the PC2 promoter, *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* (Band 288), Nr. 1, Seite E236-E245.
- Shiraishi, F.; Okumura, T.; Nomachi, M.; Serizawa, S.; Nishikawa, J.; Edmonds, J. S.; Shiraishi, H. und Morita, M. (2003): Estrogenic and thyroid hormone activity of a series of hydroxy-polychlorinated biphenyls, *Chemosphere* (Band 52), Nr. 1, Seite 33-42.
- Shupnik, M. A. (2000): Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression, *Rev Endocr.Metab Disord* (Band 1), Nr. 1-2, Seite 35-42.
- Shupnik, M. A.; Gharib, S. D. und Chin, W. W. (1988): Estrogen suppresses rat gonadotropin gene transcription in vivo, *Endocrinology* (Band 122), Nr. 5, Seite 1842-1846.
- Siddiqi, M. A.; Laessig, R. H. und Reed, K. D. (2003): Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants-old diseases, *Clin.Med.Res.* (Band 1), Nr. 4, Seite 281-290.
- Silva, J. E. (2003): The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications, *Ann.Intern.Med* (Band 139), Nr. 3, Seite 205-213.
- Silva, J. E. und Larsen, P. R. (1977): Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine, *Science* (Band 198), Nr. 4317, Seite 617-620.

Singh, S. P.; McDonald, D.; Hope, T. J. und Prabhakar, B. S. (2004): Upon thyrotropin binding the thyrotropin receptor is internalized and localized to endosome, *Endocrinology* (Band 145), Nr. 2, Seite 1003-1010.

Sissan, M. A. und Leelamma, S. (1996): Influence of components of oral contraceptive on lipid metabolism, *Indian J Exp Biol* (Band 34), Nr. 2, Seite 131-134.

Smeds, S. und Wollman, S. H. (1983): 3H-thymidine labeling of endothelial cells in thyroid arteries, veins, and lymphatics during thyroid stimulation, *Lab Invest* (Band 48), Nr. 3, Seite 285-291.

Smith, E. R. und Davidson, J. M. (1974): Location of feedback receptors: effects of intracranially implanted steroids on plasma LH and LRF response, *Endocrinology* (Band 95), Nr. 6, Seite 1566-1573.

Song, M. K.; Dozin, B.; Grieco, D.; Rall, J. E. und Nikodem, V. M. (1988): Transcriptional activation and stabilization of malic enzyme mRNA precursor by thyroid hormone, *J Biol Chem* (Band 263), Nr. 34, Seite 17970-17974.

Spitzweg, C.; Joba, W.; Morris, J. C. und Heufelder, A. E. (1999): Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells, *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* (Band 9), Nr. 8, Seite 821-830.

St Germain, D. L. (1988): Dual mechanisms of regulation of type I iodothyronine 5'-deiodinase in the rat kidney, liver, and thyroid gland. Implications for the treatment of hyperthyroidism with radiographic contrast agents, *J.Clin.Invest* (Band 81), Nr. 5, Seite 1476-1484.

Steinfeld, H. J.; Hauser, P.; Nakayama, Y.; Radovick, S.; McClaskey, J. H.; Taylor, T.; Weintraub, B. D. und Wondisford, F. E. (1991): Thyrotropin-releasing hormone regulation of human TSHB expression: role of a pituitary-specific transcription factor (Pit-1/GHF-1) and potential interaction with a thyroid hormone-inhibitory element, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 88), Nr. 8, Seite 3130-3134.

Stevens, D. A.; Harvey, C. B.; Scott, A. J.; O'Shea, P. J.; Barnard, J. C.; Williams, A. J.; Brady, G.; Samarut, J.; Chassande, O. und Williams, G. R. (2003): Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone, *Mol.Endocrinol.* (Band 17), Nr. 9, Seite 1751-1766.

Stockigt, J. (2003): Assessment of thyroid function: towards an integrated laboratory - clinical approach, *Clin Biochem Rev* (Band 24), Nr. 4, Seite 109-122.

Storey, N. M.; Gentile, S.; Ullah, H.; Russo, A.; Muessel, M.; Erxleben, C. und Armstrong, D. L. (2006): Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S A* (Band 103), Nr. 13, Seite 5197-5201.

Strauss, L.; Makela, S.; Joshi, S.; Huhtaniemi, I. und Santti, R. (1998): Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract, *Mol Cell Endocrinol* (Band 144), Nr. 1-2, Seite 83-93.

Streckfuss, F.; Hamann, I.; Schomburg, L.; Michaelis, M.; Sapin, R.; Klein, M. O.; Köhrle, J. und Schweizer, U. (2005): Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 337), Nr. 2, Seite 739-745.

Su, T. und Ding, X. (2004): Regulation of the cytochrome P450 2A genes, *Toxicol Appl.Pharmacol* (Band 199), Nr. 3, Seite 285-294.

Sugawara, M.; Sugawara, Y. und Wen, K. (1999): Methimazole and propylthiouracil increase cellular thyroid peroxidase activity and thyroid peroxidase mRNA in cultured porcine thyroid follicles, *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* (Band 9), Nr. 5, Seite 513-518.

Suggs, S. V.; Wallace, R. B.; Hirose, T.; Kawashima, E. H. und Itakura, K. (1992): Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. 1981, *Biotechnology* (Band 24), Seite 140-144.

Sun, Y.; Lu, X. und Gershengorn, M. C. (2003): Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences, *J Mol Endocrinol* (Band 30), Nr. 2, Seite 87-97.

Suzuki, K. und Kohn, L. D. (2006): Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin, *J Endocrinol* (Band 189), Nr. 2, Seite 247-255.

Suzuki, K.; Mori, A.; Lavaroni, S.; Ulianich, L.; Miyagi, E.; Saito, J.; Nakazato, M.; Pietrarelli, M.; Shafran, N.; Grassadonia, A.; Kim, W. B.; Consiglio, E.; Formisano, S. und Kohn, L. D. (1999): Thyroglobulin regulates follicular function and heterogeneity by suppressing thyroid-specific gene expression, *Biochimie* (Band 81), Nr. 4, Seite 329-340.

Takeuchi, Y.; Murata, Y.; Sadow, P.; Hayashi, Y.; Seo, H.; Xu, J.; O'Malley, B. W.; Weiss, R. E. und Refetoff, S. (2002): Steroid receptor coactivator-1 deficiency causes variable alterations in the modulation of T(3)-regulated transcription of genes in vivo, *Endocrinology* (Band 143), Nr. 4, Seite 1346-1352.

Talsness, C. E.; Shakibaei, M.; Kuriyama, S. N.; Grande, S. W.; Sterner-Kock, A.; Schnitker, P.; de Souza C.; Grote, K. und Chahoud, I. (2005): Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant, *Toxicol.Lett.* (Band 157), Nr. 3, Seite 189-202.

Tan, S. W. und Zoeller, R. T. (2007): Integrating basic research on thyroid hormone action into screening and testing programs for thyroid disruptors, *Crit Rev Toxicol* (Band 37), Nr. 1-2, Seite 5-10.

Tannahill, L. A.; Visser, T. J.; McCabe, C. J.; Kachilele, S.; Boelaert, K.; Sheppard, M. C.; Franklyn, J. A. und Gittoes, N. J. (2002): Dysregulation of iodothyronine deiodinase enzyme expression and function in human pituitary tumours, *Clin.Endocrinol.(Oxf)* (Band 56), Nr. 6, Seite 735-743.

Tata, J. R. (1999): Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone, *Biochimie* (Band 81), Nr. 4, Seite 359-366.

- Thompson, C. C. (1996): Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog, *J.Neurosci.* (Band 16), Nr. 24, Seite 7832-7840.
- Timmer, D. C.; Bakker, O. und Wiersinga, W. M. (2003): Triiodothyronine affects the alternative splicing of thyroid hormone receptor alpha mRNA, *The Journal of Endocrinology* (Band 179), Nr. 2, Seite 217-225.
- Tinwell, H.; Lefevre, P. A.; Moffat, G. J.; Burns, A.; Odum, J.; Spurway, T. D.; Orphanides, G. und Ashby, J. (2002): Confirmation of uterotrophic activity of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in the immature rat, *Environ.Health Perspect.* (Band 110), Nr. 5, Seite 533-536.
- Toppari, J. (2002): Environmental endocrine disrupters and disorders of sexual differentiation, *Semin.Reprod.Med.* (Band 20), Nr. 3, Seite 305-312.
- Tuohy, P. G. (2003a): Soy infant formula and phytoestrogens, *Journal of Paediatrics and Child Health* (Band 39), Nr. 6, Seite 401-405.
- Tuohy, P. G. (2003b): Soy infant formula and phytoestrogens, *J.Paediatr.Child Health* (Band 39), Nr. 6, Seite 401-405.
- van den Berg, K. J. (1990): Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin, *Chem Biol Interact.* (Band 76), Nr. 1, Seite 63-75.
- van der Heide, D.; Kastelijn, J. und Schröder-van der Elst, J. P. (2003): Flavonoids and thyroid disease, *Biofactors* (Band 19), Nr. 3-4, Seite 113-119.
- van Middlesworth, L. (1957): Thyroxine excretion, a possible cause of goiter, *Endocrinology* (Band 61), Nr. 5, Seite 570-573.
- van Wyk, J. J.; Arnold, M. B.; Wynn, J. und Pepper, F. (1959): The effects of a soybean product on thyroid function in humans, *Pediatrics* (Band 24), Seite 752-760.
- Visser, T. J.; Kaplan, M. M.; Leonard, J. L. und Larsen, P. R. (1983): Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism, *J Clin Invest* (Band 71), Nr. 4, Seite 992-1002.
- Visser, T. J.; Leonard, J. L.; Kaplan, M. M. und Larsen, P. R. (1982): Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S A* (Band 79), Nr. 16, Seite 5080-5084.
- Visser, T. J. und van Overmeeren-Kapteijn, E. (1981): Substrate requirement for inactivation of iodothyronine-5'-deiodinase activity by thiouracil, *Biochimica Et Biophysica Acta* (Band 658), Nr. 2, Seite 202-208.
- Visser, W. E.; Friesema, E. C.; Jansen, J. und Visser, T. J. (2007): Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters, *Best Pract.Res Clin Endocrinol Metab* (Band 21), Nr. 2, Seite 223-236.

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 76), Nr. 2, Seite 615-619.

Völkel, W.; Colnot, T.; Schauer, U. M.; Broschard, T. H. und Dekant, W. (2006): Toxicokinetics and biotransformation of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats after oral administration, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 216), Nr. 2, Seite 331-338.

Watanabe, M. und Iizuka, H. (1986): Dimethyl sulfoxide-induced augmentation of adenosine-adenylate cyclase response of pig skin epidermis, *Archives of Dermatological Research* (Band 278), Nr. 6, Seite 470-473.

Wei, P.; Zhang, J.; Egan-Hafley, M.; Liang, S. und Moore, D. D. (2000): The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism, *Nature* (Band 407), Nr. 6806, Seite 920-923.

Weiss, S. J.; Philp, N. J. und Grollman, E. F. (1984): Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid, *Endocrinology* (Band 114), Nr. 4, Seite 1090-1098.

Weitzel, J. M.; Radtke, C. und Seitz, H. J. (2001): Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat, *Nucleic Acids Res.* (Band 29), Nr. 24, Seite 5148-5155.

White, H. L.; Freeman, L. M.; Mahony, O.; Graham, P. A.; Hao, Q. und Court, M. (2004): Effect of dietary soy on serum thyroid hormone concentrations in healthy adult cats, *American Journal of Veterinary Research* (Band 65), Nr. 5, Seite 586-591.

Williams, L. T.; Lefkowitz, R. J.; Watanabe, A. M.; Hathaway, D. R. und Besch, H. R. Jr. (1977): Thyroid hormone regulation of beta-adrenergic receptor number, *J Biol Chem* (Band 252), Nr. 8, Seite 2787-2789.

Wollman, S. H.; Herveg, J. P.; Zeligs, J. D. und Ericson, L. E. (1978): Blood capillary enlargement during the development of thyroid hyperplasia in the rat, *Endocrinology* (Band 103), Nr. 6, Seite 2306-2314.

Wuttke, W.; Jarry, H.; Westphalen, S.; Christoffel, V. und Seidlova-Wuttke, D. (2002): Phytoestrogens for hormone replacement therapy?, *J Steroid Biochem Mol Biol* (Band 83), Nr. 1-5, Seite 133-147.

Wuttke, W.; Rimoldi, G.; Christoffel, J. und Seidlova-Wuttke, D. (2006): Plant extracts for the treatment of menopausal women: Safe?, *Maturitas*.

Xiao, C. W.; L'Abbé, M. R.; Gilani, G. S.; Cooke, G. M.; Curran, I. H. und Papademetriou, S. A. (2004): Dietary soy protein isolate and isoflavones modulate hepatic thyroid hormone receptors in rats, *The Journal of Nutrition* (Band 134), Nr. 4, Seite 743-749.

Yalcin, Y.; Carman, D.; Shao, Y.; Ismail-Beigi, F.; Klein, I. und Ojamaa, K. (1999): Regulation of Na/K-ATPase gene expression by thyroid hormone and hyperkalemia in the heart, *Thyroid* (Band 9), Nr. 1, Seite 53-59.

- Yamada, H.; Distefano, J. J., III; Yen, Y. M. und Nguyen, T. T. (1996): Steady-state regulation of whole-body thyroid hormone pool sizes and interconversion rates in hypothyroid and moderately T3-stimulated rats, *Endocrinology* (Band 137), Nr. 12, Seite 5624-5633.
- Yamasaki, K.; Tago, Y.; Nagai, K.; Sawaki, M.; Noda, S. und Takatsuki, M. (2002): Comparison of toxicity studies based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline no. 407' and the research protocol of 'Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats' with 6-n-propyl-2-thiouracil, *Arch.Toxicol.* (Band 76), Nr. 9, Seite 495-501.
- Yang, Z. und Privalsky, M. L. (2001): Isoform-specific transcriptional regulation by thyroid hormone receptors: hormone-independent activation operates through a steroid receptor mode of co-activator interaction, *Mol.Endocrinol.* (Band 15), Nr. 7, Seite 1170-1185.
- Yap, A. S.; Keast, J. R. und Manley, S. W. (1994): Thyroid cell spreading and focal adhesion formation depend upon protein tyrosine phosphorylation and actin microfilaments, *Experimental Cell Research* (Band 210), Nr. 2, Seite 306-314.
- Yen, P. M. (2001): Physiological and molecular basis of thyroid hormone action, *Physiol Rev.* (Band 81), Nr. 3, Seite 1097-1142.
- Yen, P. M.; Ando, S.; Feng, X.; Liu, Y.; Maruvada, P. und Xia, X. (2006): Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 246), Nr. 1-2, Seite 121-127.
- Yokochi, T. und Robertson, K. D. (2004): Dimethyl sulfoxide stimulates the catalytic activity of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) in vitro, *Bioorganic Chemistry* (Band 32), Nr. 4, Seite 234-243.
- Yoshida, A.; Hisatome, I.; Taniguchi, S.; Sasaki, N.; Yamamoto, Y.; Miake, J.; Fukui, H.; Shimizu, H.; Okamura, T.; Okura, T.; Igawa, O.; Shigemasa, C.; Green, E. D.; Kohn, L. D. und Suzuki, K. (2004): Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin, *Endocrinology* (Band 145), Nr. 9, Seite 4301-4308.
- Younes, M. (1999): Specific issues in health risk assessment of endocrine disrupting chemicals and international activities, *Chemosphere* (Band 39), Nr. 8, Seite 1253-1257.
- Young, R. A.; Braverman, L. E. und Rajatanavin, R. (1982): Low protein-high carbohydrate diet induces alterations in the serum thyronine-binding proteins in the rat, *Endocrinology* (Band 110), Nr. 5, Seite 1607-1612.
- Zandieh-Doulabi, B.; Platvoet-ter Schiphorst, M.; Kalsbeek, A.; Wiersinga, W. M. und Bakker, O. (2004): Hyper and hypothyroidism change the expression and diurnal variation of thyroid hormone receptor isoforms in rat liver without major changes in their zonal distribution, *Molecular and Cellular Endocrinology* (Band 219), Nr. 1-2, Seite 69-75.
- Zavacki, A. M.; Ying, H.; Christoffolete, M. A.; Aerts, G.; So, E.; Harney, J. W.; Cheng, S. Y.; Larsen, P. R. und Bianco, A. C. (2004): Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse, *Endocrinology*.

Zoeller, R. T. (2005): Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals?, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 242), Nr. 1-2, Seite 10-15.

Zoeller, R. T. (2007): Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences, *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* (Band 17), Nr. 9, Seite 811-817.

Zoeller, R. T. und Rovet, J. (2004): Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings, *Journal of Neuroendocrinology* (Band 16), Nr. 10, Seite 809-818.

Zoeller, R. T.; Tyl, R. W. und Tan, S. W. (2007): Current and potential rodent screens and tests for thyroid toxicants, *Crit Rev Toxicol* (Band 37), Nr. 1-2, Seite 55-95.

Zoeller, R. T.; Wolff, R. S. und Koller, K. J. (1988): Thyroid hormone regulation of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin (TSH)-releasing hormone is independent of the pituitary gland and TSH, *Mol Endocrinol* (Band 2), Nr. 3, Seite 248-252.

Zoeller, T. R.; Dowling, A. L.; Herzig, C. T.; Iannacone, E. A.; Gauger, K. J. und Bansal, R. (2002): Thyroid hormone, brain development, and the environment, *Environmental Health Perspectives* (Band 110 Suppl 3), Seite 355-361.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Gotthardt I., Schmutzler C., Wuttke W., Jarry H., Köhrle J. (in Vorbereitung): The UV filter 4-Methylbenzylidene-camphor (4-MBC) leads to hypothyroidism after acute and chronic treatment by interference with the sodium iodide symporter (NIS).

Schmutzler C., Gotthardt I., Hofmann P.J., Radovic B., Kovacs G., Stemmler L., Nobis I., Bacinski A., Mentrup B., Ambrugger P., Grüters A., Malendowicz L.K., Christoffel J., Jarry H., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W., Köhrle J. (2007): Endocrine disruptors and the thyroid gland - a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect.* 115 Suppl 1:77-83.

Klammer H., Schlecht C., Wuttke W., Schmutzler C., Gotthardt I., Köhrle J., Jarry H. (2007): Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology.* 238 (2-3):192-199.

Schmutzler C., Bacinski A., Gotthardt I., Huhne K., Ambrugger P., Klammer H., Schlecht C., Hoang-Vu C., Grüters A., Wuttke W., Jarry H., Köhrle J. (2007): The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology.* 148(6):2835-2844.

Hamann I., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W., Köhrle J. (2006): Effects of isoflavonoids and other plant-derived compounds on the hypothalamus-pituitary-thyroid hormone axis. *Maturitas.* 55,S14-S25.

Streckfuss F.*, Hamann I.*, Schomburg L., Michaelis M., Sapin R., Klein M.O., Köhrle J., Schweizer U. (2005): Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 337(2):739-745. *equal contribution

Schmutzler C., Hamann I., Hofmann P.J., Kovacs G., Stemmler L., Mentrup B., Schomburg L., Ambrugger P., Grüters A., Seidlova-Wuttke D., Jarry H., Wuttke W., Köhrle J. (2004): Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology.* 205(1-2):95-102.

Richter H., De Graaf A.A., Hamann I., Uden G. (2003): Significance of phosphoglucose isomerase for the shift between heterolactic and mannitol fermentation of fructose by *Oenococcus oeni*. *Arch Microbiol.* 180(6):465-470.

Richter H., Hamann I., Uden G. (2003): Use of the mannitol pathway in fructose fermentation of *Oenococcus oeni* due to limiting redox regeneration capacity of the ethanol pathway. *Arch Microbiol.* 179(4):227-233.

Weitere Publikationen

Schmutzler C., Hamann I., Köhrle J. (2006): Thyroid hormone biosynthesis - A target for endocrine disruption by UV filters. *CREDO Newsletter. Issue 7/8:6-7.*

Abstracts

Gotthardt I., Schmutzler C., Kirschmeyer P., Wuttke W., Jarry H., Köhrle J.: The UV absorber 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC) causes effects comparable to primary hypothyroidism. *10th European Congress of Endocrinology (ECE)*, Berlin, 03.05. - 07.05.2008

Hamann I., Schmutzler C., Kirschmeyer P., Jarry H., Köhrle J.: 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC) causes pituitary effects comparable to hypothyroidism. *8th European Congress of Endocrinology (ECE)*, Glasgow/UK, 01.04. - 05.04.2006

Vorträge

Gotthardt I.: 4-Methylbenzylidene-camphor (4-MBC) causes pituitary effects comparable to primary hypothyroidism. *22. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF)*, Berlin, 07.12. - 09.12.2006

Hamann I., Schmutzler C., Kirschmeyer P., Jarry H., Köhrle J.: 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC) causes pituitary effects comparable to hypothyroidism. *8th European Congress of Endocrinology (ECE)*, Glasgow/UK, 01.04. - 05.04.2006

Hamann I.: Effects of (Iso)Flavonoids and other plant derived compounds on the thyroid hormone axis. *BIONORICA - International Symposium on Phytomedicines in Gynaecological Disorders*, Illetas/Spanien 13.10. - 15.10.2005

Hamann I.: Influence of endocrine disrupters to the thyroid axis: Analysis of the T₃-regulated endpoints in the kidney and the thyroid gland. *20. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF)*, Berlin, 09.12. - 11.12.2004

Hamann I.: Der Einfluss endokriner Disruptoren auf die Schilddrüsenachse: Analyse am Beispiel der T₃-regulierten Typ I 5'-Deiodase durch Enzymaktivitätsassays und Real Time PCR. *19. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF)*, Halle, 11.12. -13.12.2003

Poster

Gotthardt I., Schmutzler C., Kirschmeyer P., Wuttke W., Jarry H., Köhrle J.: The UV absorber 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC) causes effects comparable to primary hypothyroidism. *10th European Congress of Endocrinology (ECE)*, Berlin, 03.05. - 07.05.2008

Gotthardt I., Schmutzler C., Kirschmeyer P., Wuttke W., Jarry H., Köhrle J.: 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC) causes effects comparable to primary hypothyroidism. *51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE)*, Salzburg, 07.03. - 10.03.2007

Gotthardt I., Schmutzler C., Kirschmeyer P., Wuttke W., Jarry H., Köhrle J.: 4-methylbenzylidene camphor causes pituitary effects comparable to hypothyroidism. *Summer School on Endocrinology*, Bregenz/Österreich, 30.07. - 03.08.2006

Köhrle J., Hamann I., Hofmann P.J., Radovic B., Schmutzler C.: Assessment of the effects of endocrine disrupting chemicals on the thyroid axis: a combined in vitro and in vivo approach. *88th Annual Meeting of the Endocrine Society*, Boston/USA, 24.06. - 28.06.2006

Streckfuß F., Hamann I., Schomburg L., Michaelis M., Sapin R., Klein M.O., Köhrle J., Schweizer U.: Inactivation of hepatic deiodinase expression does not alter circulating thyroid hormone levels in mice. *50. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE)*, Essen 01.03. - 04.03.2006

Streckfuß F., Hamann I., Schomburg L., Michaelis M., Sapin R., Klein M., Köhrle J., Schweizer U.: Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels, but not for thyroid hormone-dependent gene expression. *Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM)*, Berlin, 18.09. - 21.09.2005

Hamann I., Schmutzler C., Mentrup B., Huhne K., Jarry H., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W., Köhrle J.: The pituitary-thyroid-axis - a target for components of UV sunscreens?

4-MBC and OMC influence thyroid hormone biosynthesis and metabolism in female rats. *7th European Congress of Endocrinology (ECE)*, Göteborg/Schweden, 03.09. - 07.09.2005

Hamann I., Schmutzler C., Mentrup B., Huhne K., Jarry H., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W., Köhrle J.: 4-MBC and OMC, components of UV-sunscreens, influence thyroid hormone axis in female rats. *CREDO Cluster Workshop on Endocrine Disrupters: Exposure Assessment, Epidemiology, Low-dose and Mixture Effects*, Prag/Tschechien, 10.05. - 13.05.2005

Hamann I., Hofmann P.J., Schmutzler C., Mentrup B., Huhne K., Jarry H., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W. and Köhrle J.: 4-MBC and OMC, components of UV-sunscreens, exert organ specific alterations of type I 5'-deiodinase activity and expression in female rats. *49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE)*, Münster, 09.03. - 12.03.2005

Hamann I., Schmutzler C., Jarry H., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W., Köhrle J.: Endocrine disrupters affect renal malic enzyme and type I 5'-deiodinase expression in female rats. *Summer School on Endocrinology*, Bregenz/Österreich, 25.07. - 29.07.2004

Hamann I., Hofmann P.J., Kovacs G., Stemmler L., Schmutzler C., Jarry H., Seidlova-Wuttke D., Wuttke W., Köhrle J.: The effect of endocrine disrupters on T₃-regulated endpoints in liver, kidney and heart in female rats. *CREDO Cluster Workshop on Multi-organic Risk Assessment of Endocrine Disrupters*, Illetas/Spanien 30.03. - 02.04.2004

Kovacs G., Hofmann P.J., Hamann I., Schmutzler C., Wuttke W., Jarry H., Seidlova-Wuttke D., Köhrle J.: Endocrine disrupters alter expression of the thyroid hormone-responsive gene malic enzyme (ME) in female rats. *49. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE)*, Dresden, 03.03. - 06.03.2004

Berlin, den

.....

Inka Gotthardt, geb. Hamann

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Interferenzen endokrin aktiver Substanzen mit der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisname der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den

.....

Inka Gotthardt, geb. Hamann

Anhang

Tab. 20: Primer zur Genotypisierung der TR $\alpha^{0/0}$ -Mäuse.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Allel	Fragment [bp]
FF9828	ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG	TR α - Knockout	660
FF9829	TTCAGGAGGATGATCTGGTCTTCGCAAG		
FF9830	GAGGAGGCCGAAAGGAGGAG	TR α - Wildtyp	115
FF9831	TGCCCTGGGCGTTAGTGCTG		
beta forward	GCCAGAACAATTGCTCTTATTC	TR β - Wildtyp	600
beta reverse	GTTCTTAAGCATGATGTTTTCTGT		

Tab. 21: qPCR-Primer zur Analyse der mRNA-Expression in der Maus.

Gen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	GenBank [®] Accession Nr.	Fragment [bp]
18SrRNA	m18SrRNA_f	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	NR 003278	128
	m18SrRNA_r	GCACCACCACCCACGGAATCG		
aGsu	mCga_f	ACATTGTTCCCCTCAGATCG	NM 009889	127
	mCga_r	ACATGGACAGCATGACCAGA		
Dio1	mDio1_f	CCACCTTCTTCAGCATCC	(Zavacki et al. 2004)	
	mDio1_r	AGTCATCTACGAGTCTCTTTG		
Dio2	mDio2_f	GCTGTGTCTGGAACAGCTTC	NM 010050	83
	mDio2_r	ACGTGCACCACACTGGAAT		
Gapdh	mGapdh_f	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	NM 008084	156
	mGapdh_r	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG		
Nis	mNis_f	TACATGCCATTGCTCGTGTT	NM 053248	124
	mNis_r	CAGCTGCCATAGCGTTGATA		
Nr1i3	mNr1i3_f	ATTTCCACGCCCTGACTTG	NM 009803	107
	mNr1i3_r	CTTGCTGACCTCACACCTTC		
Slc26a4	mSlc26a4_f	TGGCTTACGCTATTGCAGTG	NM 011867	227
	mSlc26a4_r	GGCAACCATCACAATCACAG		
Sult1c1	mSult1c1_f	GAACAGAACATGCAGCCAGA	NM 018751	189
	mSult1c1_r	AACATCCCCATCATTGGA		
Sult1e1	mSult1e1_f	AGAGAAGGAATCTCCCAGAATAGT	NM 023135	134
	mSult1e1_r	AGTAGTAATAAGAAACGGCGACAT		
Tg	mTg_f	TGTCCCACCAAGTGTGAAAA	NM 009375	248
	mTg_r	CCAAGGAAAGCTTGTTTCAGC		
Duox1/2	mDuox1/2_f	CTGGACATCCTGGTGGTCTT	NM 001099297	230
	mDuox1/2_r	CAGGTCAGCTCCTCCTTGTC		
Thrb1	mThrb1_f	CAGCCTGGGACAAGCAGAA	Sadow PM et al. 2003	
	mThrb1_r	TTCAGACATTCTACCAGCTTCC		

Anhang

Fortsetzung Tab. 21: qPCR-Primer zur Analyse der mRNA-Expression in der Maus.

Gen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	GenBank® Accession Nr.	Fragment [bp]
Thrb2	mThrb2_f	CCTGCACATCTCCCTGAAGAA	Sadow PM et al. 2003	
	mThrb2_r	ATACCCTTTTTTTTTGTGAGTGCG		
Tpo	mTpo_f	CAGCTGACCTGTGAGAACCA	NM 009417	143
	mTpo_r	GACAGGTTGCCAAAGAGAGC		
ppTrh	mppTrh_f	GATTCTGGAGCCTTGCAGAC	NM 009426	156
	mppTrh_r	GGGGATACCAGTTAGCACGA		
Trhde	mTrhde_f	ACCTACACATGCCAGGAAGG	NM 146241	207
	mTrhde_r	CAAATCGCCCAGGCTAAATA		
Trhr	mTrhr_f	TGCCAGACAGACTGGACAAG	NM 013696	178
	mTrhr_r	TTCTCTGACACGGGGACTCT		
Tshb	mTshb_f	GTGGGTGGAGAAGAGTGAGC	NM 009432	117
	mTshb_r	AAGAGCAAAAAGCACGGAGA		
Tshr	mTshr_f	TGACTTCGGTCCCTGAAAAC	NM 011648	121
	mTshr_r	GCATCCAGCTTTGTTCCATT		

Tab. 22: qPCR-Primer zur Analyse der mRNA-Expression in der Ratte.

Gen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	GenBank® Accession Nr.	Fragment [bp]
18SrRNA	r18SrRNA_f	CGTTGATTAAGTCCCTGCCCTT	X 01117	137
	r18SrRNA_r	TCAAGTTCGACCGTCTTCTCAG		
aGsu	rCga_f	AGTGTATGGGCTGTTGCTTCTC	NM 053918	170
	rCga_r	GTGGCACTCCGTATGATTCTCC		
Dio1	rDio1_f	TTTAAGAACAACGTGGACATCAGG	NM 021653	197
	rDio1_r	GGTTTACCCTTGTAGCAGATCCT		
Dio2	rDio2_f	GCGACCTGACCACCTTTACTAG	NM 031720	191
	rDio2_r	GCAGCACATCGGTCCTCTTG		
Duox1	rDuox1_f	GCCCTTGAGAGAACCCTACC	NM 153739	158
	rDuox1_r	AGCCTGGTGTTCACACTC		
Duox2	rDuox2_f	CTGGACAGAGCCCTAGCAAC	NM 024141	129
	rDuox2_r	CCAGCTGTCCTCCAGAGAAG		
Flt1	rFlt1_f	TCACCACGGACCTCAATACA	NM 019306	256
	rFlt1_r	CGATGCTTCACGCTGATAAA		
Fshb	rFshb_f	TGGTGTGAGGGCTACTGCTA	NM 001007597	120
	rFshb_r	ACAGCCAGGCAATCTTATGG		
Gapdh	rGapdh_f	GACAACCTTTGGCATCGTGGAAG	NM 017008	182
	rGapdh_r	CCGTTTCAGCTCTGGGATGAC		
mGpd	rGpd2_f	GTCCAGGACTATGGGCTTGA	NM 012736	137
	rGpd2_r	TCTGACACAAGACGCACTCC		

Anhang

Fortsetzung Tab. 22: qPCR-Primer zur Analyse der mRNA-Expression in der Ratte.

Gen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	GenBank® Accession Nr.	Fragment [bp]
Hprt	rHprt_f	TTATGGACAGGACTGAAAGACTTG	NM 012583	113
	rHprt_r	CAGCAGGTCAGCAAAGAACTTATA		
Il1b	rIl1b_f	AGGCTTCCTTGTGCAAGTGT	NM 031512	230
	rIl1b_r	TGAGTGACACTGCCTTCCTG		
Il6	rIl6_f	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	NM 012589	134
	rIl6_r	CAGAATTGCCATTGCACAAC		
Kdr	rKdr_f	GTGCTTTGTGTGTTGGGATG	NM 013062	254
	rKdr_r	GTGAGAGCAAGCAACCTTCC		
Lhb	rLhb_f	CCTGGCTGCAGAGAATGAGT	NM 012858	133
	rLhb_r	GTAGGTGCACACTGGCTGAG		
Me1	rMe1_f	ATCCACAACAGTGTCTACCCATC	NM 012600	122
	rMe1_r	AAACGCATCATATTCACGGCCT		
Myh6	rMyh6_f	GAGAATGAGCTGGAGGCTGAG	NM 017239	104
	rMyh6_r	TCTTCCTCTGTCTGGTAGGTGAG		
Myh7	rMyh7_f	CAGACAGAGGAAGACAGGAAGAAC	NM 017240	133
	rMyh7_r	GGAAGCTTGGACAGGTTGGTGT		
Mt2	rMt2_f	GCGATCTCTCGTTGATCTCC	XM 001062488	120
	rMt2_r	AGGTGCATTTGCATTGTTTG		
Nis	rNis_f	GGTGTATCAGTGGCCTCTA	NM 052983	269
	rNis_r	CCCGTGTCCATTCCAGAACTG		
Pcsk1	rPcsk1_f	CCTGTAGGCACCTGGACATT	NM 017091	121
	rPcsk1_r	GCTTCATGTGTTCTGGCTGA		
Pcsk2	rPcsk2_f	ATGGCTGATGGTGTGAACAA	NM 012746	101
	rPcsk2_r	TAGCCGTACAGTTGCAGTC		
Pit1	rPou1f1_f	AAGGAAGAGGAAACGGAGGA	NM 013008	84
	rPou1f1_r	GAAGGTTTGCTGTGCTCTCC		
Pomc2	rPomc2_f	TCCATAGACGTGTGGAGCTG	NM 139326	157
	rPomc2_r	TTTCAGTCAAGGGCTGTTCA		
ppTrh	rppTrh_f	TGCACTCTTCAGCTCAGCAT	NM 013046	107
	rppTrh_r	GGGTGAAGATCAAAGCCAGA		
Prl	rPrl_f	ATCAATGACTGCCCCACTTC	NM 012629	114
	rPrl_r	ATTCCAGGAGTGACCAAAC		
Slc26a4	rSlc26a4_f	GCCCAGTGGTAACGGAAGTA	NM 019214	217
	rSlc26a4_r	CTGTGAGACCAGCACTTGGGA		
Spot14	rThrsp_f	CTTACCCACCTGACCCAGAA	NM 012703	119
	rThrsp_r	CATCGTCTTCCCTCTCGTGT		
Tg	rTg_f	CCGGATATTGCAGAGACGAT	NM 030988	128
	rTg_r	GGCAGCTTGGGATATATGGA		
Tnfa	rTnfa_f	TGCCTCAGCCTCTTCTCATT	NM 012675	108
	rTnfa_r	CCCATTGGGAACCTTCTCCT		

Anhang

Fortsetzung Tab. 22: qPCR-Primer zur Analyse der mRNA-Expression in der Ratte.

Gen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	GenBank [®] Accession Nr.	Fragment [bp]
Tpo	rTpo_f	TTGGATCTGGCATCACTGAACTT	NM 019353	149
	rTpo_r	ATCTTGTTGACCATGCTTCTGTGG		
Thra1	rThra1_f	GACAGGGCGACAAATGAACT	NM 001017960	239
	rThra1_r	GGCCTGAAGGGAAATCTAGG		
Thra2	rThra2_f	ATGCCTGGCAATACCTTGTC	NM 031134	197
	rThra2_r	GCACTGGGCTACAGACATGA		
Thrb	rThrb_f	GCTAGCCAAGAGGAAGCTGA	NM 012672	208
	rThrb_r	GGGTGCTTGTCCAATGTCTT		
Trhde	rTrhde_f	TATTTAGCCTGGGCGATTTG	NM 001108991	112
	rTrhde_r	TAGTCCCCGGATCCTCTTCT		
Trhr	rTrhr_f	ATCTTCCTGCCAGAGGGACT	NM 013047	155
	rTrhr_r	CCTCCACCTTTTGTGCTGTT		
Tshb	rTshb_f	TACAGAGACTTCACCTACAGAACG	NM 013116	81
	rTshb_r	GGCAACGGGGTAGGAGAAATAAA		
Tshr	rTshr_f	CTGCAAGGAACTCCACCAAATC	NM 012888	246
	rTshr_r	AAGGCATCAGGGTCTATGTAAGTC		
Vegfa	rVegfa_f	CAATGATGAAGCCCTGGAGT	NM 031836	211
	rVegfa_r	TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT		