

Analysen zur Expression der Deiodinasen und der Hypophysenhormone in der athyroiden Pax8^{-/-} Maus

vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
vom Diplom-Biochemiker Sönke Friedrichsen
geboren am 28.03. 1974 in Hamburg

-2002-

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Oktober 2002 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. K. Bauer angefertigt.

Referent: Prof. Dr. K. Bauer

Korreferent: Prof. Dr. W. H. Müller

Tag der Promotion: 12. Dezember 2002

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Karl Bauer für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine stete Anteilnahme am Fortgang dieser Arbeit.

Prof. W. H. Müller danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Dr. Ahmed Mansouri danke ich für die Bereitstellung der Pax8+/- Mäuse.

Dr. Theo Visser möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Messung der Deiodinaseaktivitäten und Schilddrüsenhormonkonzentrationen, sowie für den stets netten Empfang in Rotterdam danken.

Dr. Martin Schäfer danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Immunhistochemie, seine Diskussionsbereitschaft und für die stets angenehmen Aufenthalte in Marburg.

Dr. Parlow danke ich für Messung der Hypophysenhormonkonzentrationen.

Bei Hans Otto Bader, Nadine Naujokat und Anja Schönfeld möchte ich mich für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Versuchen und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Uwe Herzig und Sigmar Falkenhagen danke ich für die Herstellung exzellenter Laborgeräte. Auch außerhalb ihrer offiziellen Aufgaben waren sie immer ansprechbar und hilfsbereit.

Allen anderen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts, die noch nicht erwähnt wurden, möchte ich für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Mein spezieller Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bauer, vor allem: Daniel Brauer, Lutz Schomburg, Ralf (Pipetten-) Sigmund, Roland Rabeler, Theo Papadopoulos, Heike Heuer, Anastasia Barkardjiev, Jan Ehrchen, Stefan und Anke Turwitt, Anne Pötter, Melanie Kraus, Lars Geffers, Katja Hübbel, Olaf Timme und Silke Polsfuß. Sie alle haben durch die Unterstützung bei Problemen des Laboralltag, ihre stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Valerie Ashe möchte ich darüber hinaus für die effektive Erweiterung meiner Sprachkenntnisse und die hervorragende Organisation der Dienstreisen danken, Krzysztof Paliga für sein engagiertes Korrekturlesen und den Versuch das Donnerstagsseminar am Leben zu erhalten, und Stephanie Christ für ihre stets aufbauenden Worte und das Teilen der „Wochenenddienste“.

Was wäre diese Arbeit ohne den Dienstag gewesen? Ein ganz herzliche Dank geht auch an die internen und externen Mitglieder der Institutsfußballgruppe: Carsten Möller, Henrik Oster, Akki Visel, Alexander Prokscha, Tarik Hesabi, Frank Sacher, Marcus Hückel, Jens Mittag und Henning Weigt. Der Kopf denkt, der Fuß versenkt. Ich hoffe, Ihr führt diese Tradition weiter.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihre Anteilnahme am Verlauf meines Studienlebens und für vieles vieles mehr ...

Inhaltsverzeichnis

<u>EINLEITUNG</u>	1
HYPOTHALAMUS	1
HYPOPHYSE	2
HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSEN-SCHILDDRÜSEN-ACHSE	4
SCHILDDRÜSENHORMONE	5
DEIODINASEN	6
PAX8^{-/-} MAUS ALS MODELL FÜR KONGENITALEN HYPOTHYREODISMUS	7
ZIELSETZUNG	9
<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	10
TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	10
ISOLIERUNG UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN	10
ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS SCHWANZ-BIOPSIEN	10
ISOLIERUNG VON POLY(A) ⁺ -ANGEREICHERTER-RNA	11
SOUTHERN-BLOT ANALYSE	12
NORTHERN-BLOT ANALYSE	13
HISTOLOGISCHE ANALYSE	15
<i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	15
IMMUNHISTOCHEMIE	19
RADIOIMMUNOASSAY	20
DEIODASE AKTIVITÄTSMESSUNGEN	20
VERWENDETE PLASMIDE	21
<u>ERGEBNISSE</u>	22
VERMINDERTE GEWICHTSZUNAHME	22
POSTNATALES PROFIL DER SCHILDDRÜSENHORMON-KONZENTRATION	23
SCHILDDRÜSENHORMON-SUBSTITUTION	25
DEIODINASE EXPRESSION	27
POSTNATALE EXPRESSION DER DEIODINASE TYP 1 IN LEBER UND NIERE	27
POSTNATALE EXPRESSION DER DEIODINASEN IM GEHIRN	30
DEIODINASE EXPRESSION IN DER HYPOPHYSE	32

Inhaltsverzeichnis

ANALYSE DER HYPOPHYSE	34
MAKROSKOPISCHE ANALYSE	34
NORTHERN-BLOT ANALYSE	35
ANALYSE ZUR VERTEILUNG DER HORMONPRODUZIERENDEN ZELLEN DER ADENOHYPOPHYSE	36
IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG	39
SERUMWERTE DER HYPOPHYSENHORMONE	41
<i>IN SITU</i> ANALYSE DER HYPOPHYSENHORMONEXPRESSION IN T4 SUBSTITUIERTEN PAX8-/- MÄUSEN	42
IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE ZUR ENTWICKLUNG DER HYPOPHYSÄREN HORMONEXPRESSION	45
IGF EXPRESSION IN DER LEBER	48
<u>DISKUSSION</u>	<u>50</u>
WACHSTUMVERZÖGERUNG UND SCHILDRÜSENHORMONSTATUS	50
DEIODINASEN	52
DEIODINASE TYP 1	53
DEIODINASE TYP 2	54
DEIODINASE TYP 3	55
HYPOPHYSE	56
THYROTROPE ZELLEN	57
GLYKOPROTEINHORMONE	58
SOMATOTROPE UND LAKTOTROPE ZELLEN	59
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>65</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>67</u>
<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>68</u>
<u>LITERATUR</u>	<u>69</u>

Einleitung

Das endokrine System stellt im Körper neben dem Immunsystem und dem Nervensystem ein drittes wichtiges Kommunikationssystem zwischen verschiedenen Zellen dar. Seine Aufgabe besteht unter anderem in der Steuerung der Reproduktion und des Wachstums sowie im Erhalt der Homöostase, z.B. des Wasser- und Salz- sowie des Energiehaushalts. Die als Hormone (griechisch ὁρμάω = in Bewegung setzen) bezeichneten Botenstoffe gelangen mit dem Blutkreislauf zu den vom Produktionsort entfernten Zielzellen, an denen sie ihre Wirkung durch die Bindung an hochspezialisierte Rezeptoren entfalten. Hormonproduzierende Zellen, die einen gegen die Umgebung abgrenzbaren Gewebeverband bilden, werden als endokrine Drüsen bezeichnet.

Die präzise Kontrolle der Hormonwirkung erfolgt sowohl auf der Ebene der Hormonsynthese und -sekretion, als auch auf Ebene des Transports, des Hormonmetabolismus und der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion. Die Regulation der peripheren Drüsen erfolgt über die funktionelle Verbindung verschiedener endokriner Drüsen zu Achsen. Übergeordnete Bestandteile dieser Achsen sind der Hypothalamus und die Hypophyse.

Hypothalamus

Der Hypothalamus, ein basaler Abschnitt des Zwischenhirns, stellt eine wichtige Schaltstelle zwischen zentralem Nervensystem (ZNS) und endokrinem System dar. Er integriert Informationen sowohl aus dem Hirnstamm als auch aus höheren Cortex-Regionen. Seine neurosekretorischen Zellen befähigen ihn durch die Ausschüttung von peptidergen Botenstoffen in das Blut, Informationen an die Peripherie weiter zu geben.

Die magnozellulären Kerngebiete des paraventriculären (PVN) und des supraoptischen Nucleus enthalten die Zellkörper von Neuronen, deren marklose Axone über den Hypophysenstiel ziehen und in der Neurohypophyse enden. Aus den neurosekretorischen Endigungen dieser Axone werden dort ihre Peptidhormone, Vasopressin und Oxytocin, freigesetzt.

Im Gegensatz dazu projizieren die neurosekretorischen Axone mehrerer Kerngebiete in der medialen ventrikelnahen Region des Hypothalamus zur Eminentia mediana und geben dort ihre Peptidhormone in den hypothalamisch-hypophysären Pfortaderkreislauf ab. Dieses spezielle Blutgefäßsystem ermöglicht einen schnellen und direkten Transport der Hormone zum Hypophysen-Vorderlappen. Die dort freigesetzten *Releasing-* bzw. *Release-inhibiting-*Hormone regulieren die Hormonausschüttung der Adenohypophyse.

Das erste in seiner Struktur aufgeklärte hypothalamisch-hypophysäre Signalpeptid war das Thyreotropin-*Releasing*-Hormon (TRH), ein modifiziertes Tripeptidamid mit der Struktur pyroGlu-His-Pro-NH₂ (Guillemin 1978, Schally 1978). Mittlerweile wurde für jedes der hypophysären Hormone, mit Ausnahme des Prolaktins, dessen Freisetzung hauptsächlich inhibitorisch durch Dopamin reguliert wird und stimulatorisch durch verschiedene peptidgerge Signalstoffe beeinflusst wird, ein spezifischer *Releasing*-Faktor beschrieben. Die inhibitorisch wirkenden hypothalamischen Faktoren Somatostatin und Dopamin beeinflussen dagegen die Sekretion mehrerer hypophysärer Hormone.

Hypophyse

Die Hypophyse liegt in einer knöchernen Vertiefung des Keilbeins, dem Türkensattel, an der Unterseite des Gehirns. Sie setzt sich aus zwei Geweben unterschiedlichen Ursprungs zusammen: der Neurohypophyse (pars posterior), die über das Infundibulum (Hypophysenstiel) mit dem Hypothalamus verbunden ist und eine Ausstülpung des Zwischenhirns darstellt, sowie der Adenohypophyse (pars anterior), die sich aus einer Einstülpung des Rachenbodens, der Rathke'schen Tasche, entwickelt und damit ektodermalen Ursprungs ist (Schwind 1928).

In der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) werden die beiden Peptidhormone Vasopressin und Oxytocin freigesetzt. Vasopressin ist an der Kontrolle des Wasserhaushalts beteiligt. Oxytocin ist zum einen wichtig für die Milchejektion und wirkt zum anderen stimulierend auf die Uteruskontraktion während der Geburt.

Die Adenohypophyse beeinflusst nahezu das gesamte periphere endokrine System. Sie ist der Syntheseort für das Adrenokortikotrope Hormon (ACTH), Wachstumshormon (GH), Prolaktin, Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH), Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und das Luteinisierende Hormon (LH) (Thorner et al. 1992).

Die glandotropen Hormone ACTH, TSH, LH und FSH wirken auf die peripheren endokrinen Organe, die Nebenniere, die Schilddrüse und die Gonaden. Sie regulieren die Entwicklung, das Wachstum und die Funktion der entsprechenden Drüsen. Die nicht glandotropen Hormone GH und Prolaktin wirken direkt auf ihre peripheren Zielzellen (Thorner et al. 1992). GH beeinflusst die Entwicklung und das Wachstum des ganzen Organismus. Die anabolen und wachstumsfördernden Effekte von GH werden hauptsächlich durch die Stimulation der IGF-1-Expression in der Leber (Somatomedin-Hypothese) vermittelt, obwohl neuere Studien auch eine direkte Wirkung von GH gezeigt haben (LeRoith et al. 2001). Prolaktin werden neben seiner stimulierenden Wirkung auf die Milchproduktion der Brustdrüse unter anderem auch immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben (Ben-Jonathan et al. 1996).

Synthetisiert werden die adenohipophysären Hormone von spezialisierten endokrinen Zellen. Die kortikotropen Zellen produzieren ACTH, die gonadotropen FSH und LH, die thyrotropen TSH, die somatotropen GH und die laktotropen Prolaktin. Die von den Zellen synthetisierten Hormone lassen sich nach chemischen Gesichtspunkten in drei Gruppen einteilen. Die Glykoproteinhormone TSH, FSH und LH bestehen aus einer indentischen α -Untereinheit (α GSU) und einer die Spezifität bestimmenden β -Untereinheit. Die aus einer Proteinkette bestehenden Hormone GH und Prolaktin weisen eine hohe Homologie auf und werden in der Wachstumshormonsuperfamilie zusammengefaßt. ACTH entsteht durch posttranslationale Prozessierung des Proopiomelanocortins (POMC). Aus dem gleichen Vorläuferprotein werden in den melanotropen Zellen des Zwischenlappens das Melanozyten-stimulierende Hormon (MSH) und β -Endorphin gebildet (Thorner et al. 1992).

Ob die chemische Einteilung der Hormone auch eine entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft der sie produzierenden Zellen widerspiegelt, ist nicht endgültig geklärt. Die Differenzierung der Zellen in der Embryogenese folgt einer definierten Abfolge. In der Ratte lassen sich nacheinander kortikotrope, thyrotrope, gonadotrope, somatotrope und laktotrope Zellen identifizieren (Setalo und Nakane 1976). Sowohl die Expression der Hormone während der Entwicklung als auch die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen wird durch eine sequentielle Abfolge von exogenen und endogenen Signalen kontrolliert.

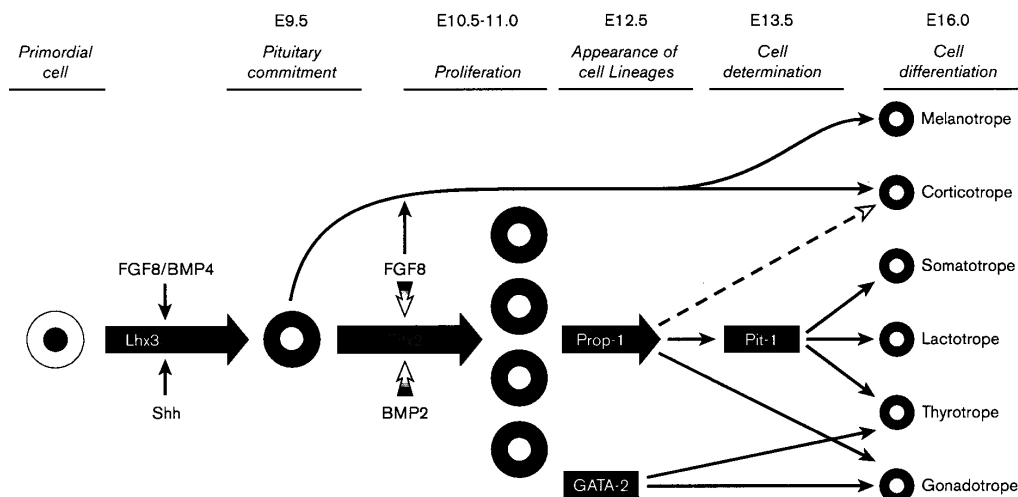


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entwicklung der hormonproduzierenden Zellen und daran beteiligter Transkriptionsfaktoren. Durch die Induktion der Lhx3-Expression kommt es zur Determinierung von Hypophysen-Vorläuferzellen. Unterstützt wird dieser Prozeß durch das Zusammenspiel von FGF8, BMP4 und Shh. *Prophet of Pit-1* (Prop-1) ist entscheidend für die Entstehung von mindestens vier dieser Zell-Linien. Pit-1 (*pituitary specific transcription factor 1*) ist essentiell für die Entwicklung der somatotropen, laktotropen und thyrotropen Zellen, während für GATA-2 angenommen wird, daß es für die Differenzierung der gonadotropen und thyrotropen Zellen von Bedeutung ist. (modifiziert nach Dasen und Rosenfeld 1999)

Die initiale Positionierung der in Proliferationszonen entstehenden Hypophysenzelltypen bedarf der Signale sowohl vom Rachenbodenektoderm (z.B. *sonic hedgehog (Shh)*) als auch vom ventralen Diencephalon (verschiedene Mitglieder der BMP- (*bone morphogenic protein*) und FGF- (*fibroblast growth factor*) Familie). Die Differenzierung der einzelnen hormonproduzierenden Zelltypen ist aber von der Induktion zusätzlicher spezifischer Transkriptionsfaktoren abhängig (Fig. 1, Scully und Rosenfeld 2002).

Für die laktotropen und somatotropen Zellen wurde aber ein gemeinsamer Ursprung postuliert (Frawley 1991), der durch Studien an transgenen Tieren bestätigt wird (Nelson et al. 1988). In den beiden zwergwüchsigen Mausmutanten *Snell dwarf* und *Jackson dwarf* konnte gezeigt werden, daß die Entwicklung der thyrotropen, somatotropen und laktotropen Zellen von dem POU-Domänen Protein Pit-1 (Sheng et al. 1997, Li et al. 1990) abhängig ist.

Die Sekretion der hypophysären Hormone wird, wie bereits beschrieben, durch den Hypothalamus reguliert. Darüber hinaus werden die glandotropen Hormone über Rückkopplungsmechanismen durch die Hormone der peripheren Drüsen kontrolliert. Zusätzlich wird die Sekretion durch parakrine Signale innerhalb der Adenohypophyse moduliert (Schwartz 2000)

Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse

Die hierarchische Tirade Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse stellt das Kontrollsystem zur Konstanthaltung der Schilddrüsenhormonkonzentration dar (Abb. 2).

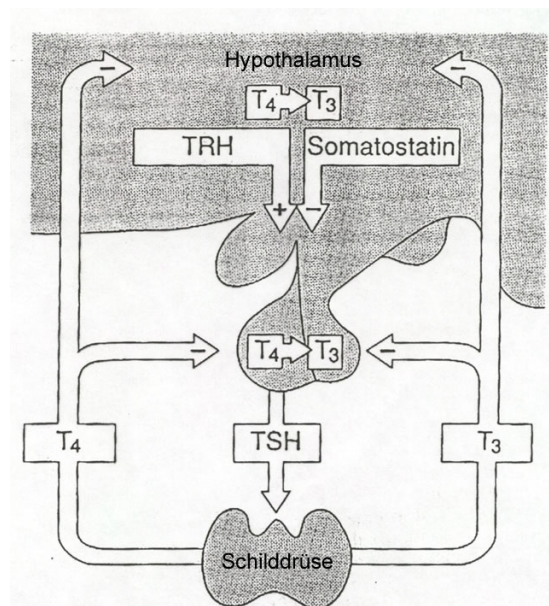


Abb. 2: Schema der HPT-Achse zur Kontrolle der Schilddrüsenfunktion.

In den thyrotropen Zellen der Adenohypophyse wird durch TRH die Synthese und Ausschüttung von TSH stimuliert. Dieses Signal wird über den TRH-Rezeptor 1 (TRH-R1)

vermittelt. Schilddrüsenhormone sowie Somatostatin, Glucokortikoide und Dopamin hemmen hingegen die thyrotropen Zellen. Die Rückkopplungsregulation durch Schilddrüsenhormone erfolgt durch die Inhibition der Synthese sowohl der beiden Untereinheiten des TSH als auch des TRH-R1 in der Hypophyse und die Hemmung der TRH-Synthese im Hypothalamus.

TSH bindet an hochaffine TSH-Rezeptoren der Schilddrüse und führt zu einer Aktivierung des cAMP-Signalsystems. Neben der Steigerung des Volumens und der Durchblutung der Schilddrüse steigert TSH den Iodidtransport, die Thyreoglobulin-Synthese, die Iodtyrosinbildung und die Proteolyse der iodierten Thyreoglobulinmoleküle, führt also zu einer vermehrten Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen.

Schilddrüsenhormone

Schilddrüsenhormone sind essentiell für das Leben. Sie beeinflussen die Synthese- und Abbauraten einer Vielzahl von Enzymen, den Stoffwechsel fast aller Grundsubstanzen und die Sekretion- und Abbauraten anderer Hormone. Die vorrangigen Wirkungen betreffen die Temperaturkontrolle und den Sauerstoffverbrauch, den Kohlehydrat-, Lipid- und Vitaminstoffwechsel, Wachstum, Differenzierung und Entwicklung (Yen 2001, Visser 2002 und Bernal 2002).

Ein Mangel an Schilddrüsenhormon (Hypothyreodismus) bei Neugeborenen und ganz besonders in der fötalen Phase führt zu einer Retardierung aller Entwicklungsvorgänge und zu schweren und irreversiblen Störungen der ZNS-Funktionen (Kretinismus) (Porterfield und Hendrich 1993). Tritt der Hypothyreodismus erst beim Erwachsenen auf, sind die Folgen vollständig reversibel. Eine Unterfunktion der Schilddrüse führt unter anderem zu einer Verlangsamung vieler Stoffwechselprozesse, welche sich in einer Senkung des Grundumsatzes und der Körpertemperatur widerspiegelt.

Schilddrüsenhormone üben ihre Wirkung hauptsächlich im Zellkern durch die Regulation der Transkription aus. Die Wirkung der Schilddrüsenhormone wird durch nukleäre Rezeptoren aus der Steroidhormonrezeptorsuperfamilie vermittelt (Evans 1988). Es konnten zwei Gene, TR α und TR β , identifiziert werden. Die Rezeptoren binden an spezifische DNA-Sequenzen, die als Schilddrüsenhormon-responsive Elemente (TRE) bezeichnet werden. Es wird angenommen, daß die Schilddrüsenhormonrezeptoren als Heterodimer, vorzugsweise mit dem nukleären Retinsäurerezeptor (RXR), an das TRE binden. Schilddrüsenhormon-responsive Elemente findet man im proximalen Promotorbereich von T3-responsiven Genen.

Von den beiden Schilddrüsenhormonen 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin, T4) und 3,3',5-Triiodthyronin (T3), bindet T3 mit sehr viel höherer Affinität an die Rezeptoren. Daher werden

die rezeptorvermittelten Wirkungen der Schilddrüsenhormone vor allem T3 zugeschrieben. Obwohl für T4 auch eine rezeptorunabhängige Aktivität postuliert wird, kann die Umwandlung von T4 in T3 also als Aktivierung eines Prohormons verstanden werden.

Deiodinasen

Die Zielzell-spezifische Aktivierung von Prohormonen, die von endokrinen Drüsen synthetisiert und sekretiert werden, und die zellspezifische Inaktivierung aktiver Hormone stellen ein allgemeines Prinzip für die lokale Feinregulation der Wirkung von Hormonen dar. Es erlaubt eine präzise Kontrolle der Produktion von sehr potenten Liganden in Abhängigkeit von Ort und Zeit, nicht nur während der Entwicklung, sondern auch im adulten Organismus. Dieses Prinzip ist auch auf die Regulation der Schilddrüsenhormonwirkung übertragbar. Von der Schilddrüse wird hauptsächlich das Prohormon T4 synthetisiert und sekretiert, daher beinhaltet der Mechanismus, der die intrazelluläre Konzentration des biologisch aktiven Hormons T3 reguliert, nicht nur die Verfügbarkeit von Schilddrüsenhormonen über das Blut (Hennemann 2001), sondern auch die intrazelluläre Umwandlung von T4 in T3 durch 5'-Deiodierung des äußeren Rings (ORD) und die Degradierung von T4 und T3 durch 5-Deiodierung des inneren Rings (IRD) zu rT3 und 3,3'-T2 (Abb. 3). Die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren gehören zu der Familie der Deiodinasen.

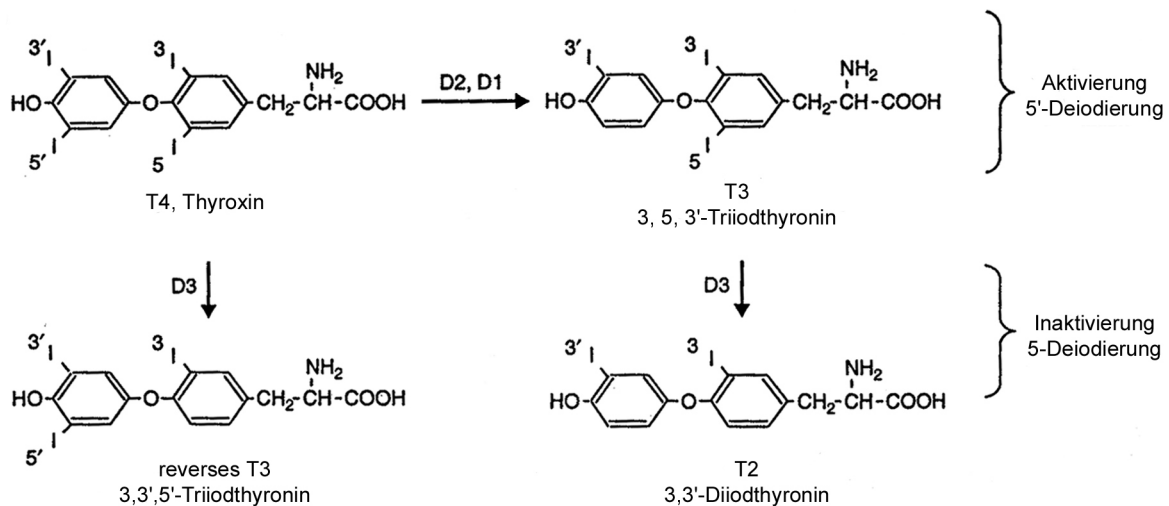


Abb. 3: Metabolische Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen. Durch 5'-Deiodierung wird Thyroxin (T4) von Deiodinase Typ 1 (D1) oder Typ 2 (D2) in T3 umgewandelt. Die Deiodinase vom Typ 3 (D3) wandelt T4 und T3 durch 5-Deiodierung in die minimal aktiven Produkte reverses T3 (rT3) und Diiodthyronin (T2) um.

Drei Deiodinasen sind bisher identifiziert worden, Deiodinase Typ 1 (D1), Typ 2 (D2) und Typ 3 (D3). Die Deiodinase Typ 1 ist vor allem in der Leber, der Niere und der Schilddrüse

selbst lokalisiert und kann sowohl eine Deiodierung des inneren als auch des äußeren Rings katalysieren. Das bevorzugte Substrat der D1 ist rT3 (Köhrle 1999 und Bianco et al. 2002). Es wird angenommen, daß die 5'-Deiodierung von T4 durch D1 in der Leber und der Niere die Hauptquelle von T3 im Blut ist. D2 wird im Gehirn, der Hypophyse, braunem Fettgewebe und beim Menschen in der Schilddrüse und in Skelettmuskeln exprimiert (Salvatore et al. 1996a und 1996b, Bianco 2002). D2 katalysiert ausschließlich eine Deiodierung des äußeren Rings, mit T4 als bevorzugtem Substrat. D2 wird daher in einigen dieser Gewebe (Gehirn und Hypophyse) für die lokale Produktion von T3 aus T4 verantwortlich gemacht, während sie in anderen Geweben (Schilddrüse und Muskel) an der Produktion von Serum-T3 beteiligt sein könnte. Deiodinase Typ 3 wird vor allem im Gehirn, der Haut, im Fötus, der Placenta und dem Uterus Schwangerer exprimiert (Bates et al. 1999, Galton et al. 1999 und Bianco 2002). D3 katalysiert eine 5-Deiodierung des inneren Rings, was zu einer Inaktivierung von T4 und T3 führt. Im Fötus scheint der Schutz des sich entwickelnden Organismus vor zu hohen T3-Konzentrationen die Hauptaufgabe von Deiodinase 3 zu sein (Esferandi et al. 1992). Alle drei Deiodinasen wurden als ~30 kD Selenoproteine charakterisiert (Köhrle 1999). Neben der Aufnahme von Selen (Bates et al. 2000), reguliert auch der Schilddrüsenhormonstatus die Expression und Aktivität dieser Enzyme, was in verschiedenen Studien mit Tieren, die operativ oder chemisch hypothyroid gemacht wurden, gezeigt werden konnte (O'Mara et al. 1993, Burmeister et al. 1997, Escobar-Morreale et al. 1997, Tu et al. 1997 und 1999).

Pax8^{-/-} Maus als Modell für kongenitalen Hypothyreodismus

Als alternativen Ansatz zu Tieren, bei denen der Hypothyreodismus chemisch induziert wurde, wurden in dieser Arbeit Pax8^{-/-} Mäuse als Modell für kongenitalen Hypothyreodismus verwendet. Diesen Mäuse, die von Mansouri et al. (Mansouri et al. 1998) generiert wurden, fehlt der *paired-box* Transkriptionsfaktor Pax8, der für die Entwicklung der folliculären Strukturen in der Schilddrüse essentiell ist (Plachow et al. 1990 und Magliano et al. 2000). Dies hat zur Folge, daß Pax8^{-/-} Mäuse nicht in der Lage sind, Schilddrüsenhormone zu produzieren. Es gibt zwar bereits verschiedene etablierte Tiermodelle, bei denen die Tiere durch die Behandlung mit Thyrostatika wie PTU (Propylthiouracil) oder MMI (1-Methyl-2-mercapto-Imidazol) oder das operative Entfernen der Schilddrüse oder Radioiodtherapie hypothyroid gemacht werden. Verglichen mit diesen experimentell induzierten Modellen bietet die Pax8^{-/-} Maus aber den Vorteil, daß der fötale und neonatale Hypothyreodismus der Nachkommen einer euthyroiden Mutter untersucht werden kann.

Pax8^{-/-} Mäuse haben bei der Geburt einen unauffälligen Phänotyp, zeigen aber ein deutlich beeinträchtigtes Wachstum und sterben nach spätestens drei Wochen. Obwohl Pax8 während der Entwicklung neben der Schilddrüse auch in der Niere und im Rückenmark exprimiert wird, konnten in den Pax8^{-/-} Mäusen in diesen Geweben keine Defekte beobachtet werden (Mansouri et al. 1998). Dies erklärt sich wahrscheinlich durch die redundante Funktion anderer Pax-Gene, die in diesen Geweben ebenfalls exprimiert werden (Tremblay et al. 1994).

Zielsetzung

Schilddrüsenhormone sind sowohl im adulten Organismus als auch während der Entwicklung essentiell. Im Adulten sind sie für eine Vielzahl von biologischen Prozessen so z.B. für den Kohlehydrat-Metabolismus und den Energieumsatz von Bedeutung. Während der Entwicklung haben die Schilddrüsenhormone einen starken Einfluß auf das Wachstum und die Differenzierung. Bei 1 von 3600 Neugeborenen in Europa wird ein kongenitaler Hypothyreodismus diagnostiziert. Wenn dieser nicht direkt nach der Geburt durch Gabe von Schilddrüsenhormonen behandelt wird, führt er zu Kretinismus, einem Syndrom, das unter anderem durch ein Zurückbleiben der körperlichen und geistigen Entwicklung gekennzeichnet ist.

Von der Schilddrüse wird hauptsächlich das Prohormon T4 sekretiert. Der Mechanismus, der die intrazelluläre Konzentration des biologisch aktiven Hormons T3 reguliert, beinhaltet unter anderem die enzymatische Umwandlung von T4 in T3 durch 5'-Deiodierung und den Abbau von T4 und T3 zu rT3 und 3,3'-T2. Um einen besseren Einblick in die Schilddrüsenhormon-abhängige Regulation der an diesem Prozeß beteiligten Enzyme (Deiodinase Typ 1, 2 und 3; D1, D2 und D3) zu erlangen, sollte mit Hilfe des Tiermodells der athyroiden Pax8^{-/-} Maus der Einfluß des kongenitalen Hypothyreodismus auf die Expression der Deiodinasen untersucht werden. Hierfür könnten auf der einen Seite die mRNA-Transkriptspiegel mittels Northern-Blot analysiert werden und auf der anderen die Enzymaktivitäten der drei Deiodinasen gemessen werden. Zusätzlich zu einem Vergleich sowohl der peripheren als auch der cerebralen Expression der Deiodinasen zwischen Pax8^{-/-} Mäusen und Wildtyp-Tieren, könnten Pax8^{-/-} Mäusen mit T3 und T4 behandelt werden, um die Wirkung der Hormone auf die Expression der Deiodinasen im hypothyroiden Organismus zu untersuchen.

Neben der Regulation durch die metabolische Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone wird der Schilddrüsenhormonstatus durch die Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen-Achse reguliert. Um den Einfluß des kongenitalen Hypothyreodismus in den Pax8^{-/-} Mäusen auf diesen Regelkreis genauer zu untersuchen sollen auf der Ebene der Hypophyse die thyotropen Zellen untersucht werden. Auf Grund der bekannten Regulation von GH durch Schilddrüsenhormone und der Bedeutung der Schilddrüsenhormone für eine Vielzahl biologischer Prozesse soll darüber hinaus die Expression der anderen hypophysären Hormone analysiert werden. Hierzu könnte die mRNA-Expression mit Hilfe von Northern-Blots und *in situ*-Hybridisierung sowie die Proteinexpression durch immunhistochemische Methoden analysiert werden. Darüber hinaus wäre es sinnvoll die Sekretion der Hormone mit Hilfe von Radioimmunoassays zu analysieren.

Material und Methoden

Tierexperimentelle Methoden

Die Tiere wurden den Richtlinien des Animal Welfare Committee der Medizinischen Hochschule Hannover entsprechend behandelt. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C, einem 12-h-Hell-Dunkel-Rhythmus und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % gehalten. Futter (Altromin 1324, Fa. Altromin) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Pax8 heterozygote Mäuse wurden dankenswerter Weise von A. Mansouri zur Verfügung gestellt. Die Genotypisierung der verwendeten Tiere erfolgte durch Southern-Blot Analyse von aus Schwanz-Biopsien isolierter genomischer DNA. Alle Experimente wurden mit jungen Tieren, die mit ihren Müttern gehalten wurden, durchgeführt. Als Kontrollen wurden Wildtyp-Tiere aus dem gleichen Wurf verwendet. Um die Tiere an späteren Zeitpunkten zu untersuchen, wurden die Würfe auf eine Größe von 4 Tieren reduziert, um die Zahl der überlebenden Pax8 ^{-/-} Tiere zu erhöhen.

Für die Hormonstimulationsexperimente wurden den Mäusen die in Sesamöl (Estradiol) oder Wasser (T4 und T3) gelösten Substanzen im Bereich des Nackens subcutan injiziert. Bei den Langzeitexperimenten wurden die Substanzen täglich gegen 16:00 Uhr appliziert.

Zur Gewinnung von Serum wurden die Tiere dekapitiert und das Blut aus der Halsschlagader aufgefangen. Durch Zentrifugation wurde aus dem Blut das Serum gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

Isolierung genomischer DNA aus Schwanz-Biopsien

DNA-Extraktionspuffer	1 % SDS
	50 mM EDTA, pH 8,0
	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1 mg/ml Proteinase K

Zu einem ca. 0,5 cm langen Schwanzstück in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 750 µl DNA-Extraktionspuffer zugefügt. Nach Inkubation über Nacht bei 55 °C wurde für 5 min bei RT geschüttelt und anschließend wurden 250 µl gesättigte NaCl-Lösung zugegeben. Nach erneutem 5 minütigem Schütteln wurde für 10 min bei 14.000 rpm

zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem 600 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Die durch 10 minütige Zentrifugation bei 7.000 rpm präzipitierte DNA wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Präzipitat im Lyophilisator getrocknet. Die genomische DNA wurde in 100-200 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) bei 55 °C über Nacht resuspendiert.

Für der Genotypisierung der Pax8 Mutanten wurden 15 µl (ca. 10 µg) der so gewonnenen DNA-Lösung einem Restriktionsverdau mit 100 U Pst I (NEB) in einem Gesamtvolumen von 20 µl unterzogen.

Isolierung von Poly(A)⁺-angereicherter-RNA

Verwendete Lösungen:

Lysis-Puffer	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 0,5 M LiCl 10 mM EDTA 2 mM DTT 1 % SDS
Waschpuffer 1	20 mM Tris, pH 7,5 0,25 M LiCl 2 mM EDTA 1 % SDS
Waschpuffer 2	20 mM Tris, pH 7,5 0,25 M LiCl 2 mM EDTA
Waschpuffer 3	10 mM Tris, pH 7,5 150 mM LiCl 1 mM EDTA

Nach Dekapitation wurde das Gewebe sofort präpariert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Mit Hilfe eines Teflon-Glashomogenisators (Wheaton) wurden 100 mg Gewebe in 4 ml Lysis-Puffer homogenisiert. Freigesetzte chromosomale DNA wurde durch mehrmaliges

Aufziehen mit einer Kanüle (Durchmesser: 0,9 mm) geschert, das Homogenat bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann mit 5 mg Dynabeads[®] (Oligo-dT-Affinitätsmatrix, Deutsche Dynal) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dynabeads[®] wurden zweimal mit Waschpuffer 1 und je einmal mit Waschpuffer 2 und 3 gewaschen. Anschließend wurde die mRNA mit 1 mM EDTA, pH 8,0 bei 65°C für 3 min eluiert. Nach phenolischer Extraktion wurde die mRNA als Natriumsalz ethanolisch ausgefällt und bei -80 °C gelagert.

Southern-Blot Analyse

Gelaufftrennung und Blotting

Verwendete Lösungen:

1x TBE	90 mM Tris/Borsäure, pH 8,0 2 mM EDTA, pH 8,0
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Renaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris/HCl, pH 7,0

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in einem 0,9 %igen Agarose-Gel bei 80 V in 1x TBE. Anschließend wurde das Gel für 35 min in Denaturierungslösung auf dem Schüttler inkubiert, dann kurz in Leitungswasser gespült und für zweimal 20 min in Renaturierungslösung geschwenkt. Nach dem Kapillartransfer (über Nacht) auf Nylon-Membranen (Hybond N, Amersham) wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, 1.200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden (Southern 1975).

Hybridisierung

Verwendete Lösungen:

Church-Hybridisierungspuffer	160 mM NaPhosphat pH 7,2 7 % SDS 1 mM EDTA
------------------------------	--

Church-Waschpuffer	20 mM NaPhosphat pH 7,2 1 % SDS
--------------------	------------------------------------

Die Markierung von cDNA-Fragmenten mit α -³²P-dCTP erfolgte unter Verwendung des *ladderman™ labeling kits* (TaKaRa) nach den Angaben des Herstellers. Zur Genotypisierung der Pax8 Mutanten werden cDNA-Fragmente, die spezifisch für die Neomycin-Kassette bzw. für das im Pax8 Knock-out deletierte Exon 4 sind, verwendet. Die Blots wurden für mindestens 30 min in Church-Hybridisierungspuffer in rotierenden Glasflaschen (Hybridisierungsöfen GFL 7601, Burgwedel) bei 60 °C prähybridisiert. Vor Zugabe der Sonde zur Hybridisierungslösung wurde diese für 3 min bei 94 °C im Heizblock denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte bei 60 °C über Nacht.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Nukleinsäuren wurden die Blots für zweimal 20 min bei 60 °C und anschließend einmal 20 min bei 65°C in Church-Waschpuffer gewaschen. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Auflegen einer Phosphoimager-Platte (Fujix, Imaging Plate BAS-II S) und ein entsprechendes Phosphoimager-Detektionssystem (Fujix, Phosphoimager BAS 1000).

Northern-Blot Analyse

Gelaufftrennung und Blotting

Verwendete Lösungen:

10x MOPS	0,2 M MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 7.0
Probenpuffer	1x MOPS 45 % Formamid 6,5 % Formaldehyd
Blue-Juice	50 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,2

Etwa 2 bis 15 µg ethanolisch ausgefällter mRNA wurden in denaturierendem Probenpuffer aufgenommen und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von Blue-Juice auf einem denaturierenden Agarosegel (1,25 % Agarose, 1x MOPS, 2,2 M Formaldehyd, pH 7,0) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt (Thomas 1980, Wicks 1986). Nach dem Kapillartransfer (über Nacht in 10x SSC) auf Nylon-Membranen (Hybond XL, Amersham) wurde die mRNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, 1.200 µJ/cm², Stratagene) kovalent fixiert.

Hybridisierung

Verwendete Lösungen:

Hybridisierungslösung	ULTRAhyb (Ambion)
20x SSPE	1,5 M NaCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM EDTA, pH 7,4

Die zur Detektion verwendeten α -³²P-dCTP markierten cDNA Sonden wurden unter Verwendung des *ladderman™ labeling kits* (TaKaRa) nach den Angaben des Herstellers erzeugt. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte über Microspin-Säulchen (DyeEx Spin Kit, Qiagen). Die gereinigte, markierte cDNA wurde für 3 min bei 94°C inkubiert, dann kurz auf Eis abgekühlt und anschließend der Hybridisierungslösung zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über 16 Stunden. Die verwendete Membran wurde vorher für mindestens zwei Stunden bei 42 °C im Rotationsinkubationsofen (GFL 7601, GFL, Burgwedel) prähybridisiert.

Unspezifisch gebundene Nukleinsäuren wurden durch Waschen in Lösungen mit sukzessiv geringer werdender Ionenstärke (bis 0,2x SSPE/0,3% SDS) und steigender Temperatur (bis 59°C) entfernt. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Auflegen einer Phosphoimagerplatte (Imaging Plate BAS-II S, Fuji) und ein entsprechendes Detektionssystem (Phosphoimager Fujix BAS 1000, Fuji) bzw. durch Autoradiographie (Biomax-MS, Kodak). Nach erfolgter Autoradiographie wurden die Blots durch Waschen mit 0,05x SSPE, 0,3 % SDS bei 95 °C (2x 15 min) für nachfolgende Hybridisierungen vorbereitet.

Histologische Analyse

***In situ*-Hybridisierung**

Zum Nachweis von Transkript-Molekülen auf Gewebeschnitten (Schäfer 1995) wurden radioaktiv markierte RNA-Sonden synthetisiert, die entweder als komplementäre Gegenstränge zur nachzuweisenden mRNA mit dieser hybridisieren konnten (so genannte *antisense*-Sonden), oder aber identisch zur mRNA waren und entsprechend keine Hybridisierung zeigen sollten (so genannte *sense*-Sonden). Die RNA-Sonden wurden auf vorbehandelte Gewebeschnitte aufgegeben. Nach Hybridisierung wurden nicht korrekt gepaarte RNA-Doppelstränge durch Steigerung der Stringenz der Waschbedingungen (Abnahme der Ionenstärke der Waschlösungen und Erhöhung der Waschtemperatur) voneinander getrennt und einzelsträngige RNA-Moleküle durch Behandlung mit RNasen entfernt. Die Detektion des Hybridisierungssignals erfolgte über eine Röntgenfilmexposition und über eine Fotoemulsionsexposition.

Gewinnung und Verarbeitung der untersuchten Gewebe

Die Tiere wurden dekapitiert und die Hypophyse präpariert. Für die *in situ*-Hybridisierung wurde das Gewebe in OCT-Medium (*optimal cutting temperature*, TissueTec, Plano) überführt und auf Trockeneis tiefgefroren. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von Kryo-Schnitten wurden das eingebettete Gewebe in einem Kryostaten (Leica) mit einer Schnittdicke von 16 µm geschnitten. Die Schnitte wurden mit vorbeschichteten Objektträgern (Menzel-Gläser, SuperFrost®Plus) aufgenommen und bei RT für 15 bis 60 min getrocknet und anschließend bis zur Fixierung bei -80 °C gelagert.

Fixierung und Prähybridisierung

Verwendete Lösungen:

PBS	150 mM NaCl
	10 mM Natriumphosphat, pH 7.4

Die tiefgefrorenen Gewebeschnitte wurden ca. 30 min bei RT aufgetaut bzw. getrocknet und anschließend für 60 min bei RT in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS fixiert. Zur Verbesserung der Gewebspenetration und der Zugänglichkeit der mRNA wurden die Hypophysenschnitte einer zehnminütigen Behandlung mit 0,4 % Triton X-100 in PBS

unterzogen. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Objektträger für 10 min mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin, pH 8,0 inkubiert. Durch diese Behandlung wurden positive Aminogruppen acetyliert und somit unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den RNA-Sonden und dem Gewebe verhindert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 % und 70 %) entwässert, für mindestens 30 min an der Luft getrocknet und anschließend bei -80 °C gelagert.

***In vitro*-Transkription**

Transkriptionslösung	0,5 mM ATP
	0,5 mM GTP
	10 mM DTT
	8 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	2 mM Spermidin
	2,5 U/μl RNAsin (Promega)
	40 mM Tris/HCl, pH 8,0

Für die Darstellung radioaktiv markierter cRNA-Moleküle wurden 15 μl α-[³⁵S]-UTP und 15 μl α-[³⁵S]-CTP (>1.000 Ci/mmol; 10 μCi/μl; Amersham) zur Trockene eingengt und anschließend in 8 μl Transkriptionslösung aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde 1 μl linearisierte Matrizen-cDNA (1 μg/μl) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl Polymerase (T7- bzw. T3- oder SP6-RNA-Polymerase, 50 U/μl; Stratagene) gestartet (90 min, 37 °C) und durch Zugabe von 1 μl DNase (10 U/μl, Boehringer Mannheim) beendet (15 min, 37 °C). Die Synthese der Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte im 20 μl Ansatz mit einem kommerziell erhältlichen Nucleotid-Mix (Boehringer Mannheim), der DIG-markiertes UTP enthält. Ansonsten wurde die Reaktion bei den gleichen Bedingungen durchgeführt.

Bei einer Transkriptgröße von über 250 nt wurde im Anschluß an die *in vitro*-Transkription eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurde der Transkriptionsansatz mit Wasser auf 20 μl aufgefüllt, mit 20 μl 0,2 M Na₂CO₃ (pH 10.2) versetzt und bei 60 °C für eine nach folgender Formel berechnete Hydrolysezeit inkubiert:

$$t \text{ (min)} = \left[\frac{L_o - 0,25}{0,0275 \times L_o} \right]$$

L_o : Ausgangslänge des Fragmentes in kb

Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 2 µl 10 %iger Essigsäure beendet. Die Abtrennung nicht inkorporierter Nucleotide erfolgte mit Microspin-Säulchen (Pharmacia, G25) durch Größenausschluss-Chromatographie. Die [³⁵S]-markierten RNA-Sonden wurden bis zu einer finalen Konzentration von 5x 10⁴ cpm/µl in Hybridisierungspuffer verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Bei DIG-markierten Sonden wurde ein Aliquot der aufgereinigten Sondenlösung einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Je nach Bandenintensität wurde die Verdünnung festgelegt.

Hybridisierung und Posthybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Verwendete Lösungen:

Hybridisierungspuffer	10 % (w/v) Dextransulfat (Sigma) 50 % (v/v) Formamid (Roth) 600 mM NaCl 1 mM EDTA 0,05 % (w/v) <i>E. coli</i> tRNA (B. Mannheim) 100 µg/ml gescherte Heringssperma-DNA 20 mM DTT (Sigma) 1x Denhardt's Reagenz 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1x SSC	150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat, pH 7
Denhardt's Reagenz	0,02 % BSA 0,02 % Ficoll 0,02 % Polyvinylpyrrolidon
RNase-Lösung	20 µg/ml RNase A (Sigma) 1 U/ml RNase T ₁ (Boehringer Mannheim) 0,5 M NaCl 1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Zur Hybridisierung wurden die Gewebsschnitte vorsichtig mit Hybridisierungspuffer überschichtet. Dieser enthielt 5×10^4 cpm/ μ l der radioaktiv-markierten, durch *in vitro*-Transkription hergestellten cRNA-Sonde. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas versehen (eingedeckelt) und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 58 °C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in 2x und 1x SSC gewaschen und für 30 min bei 37 °C einem RNase-Verdau unterzogen. Es folgten Waschschrte in Lösungen abnehmender Ionenstärke: (1x, 0,5x, 0,2x SSC; jeweils 20 min, RT). Abschließend wurden die Objektträger bei 65 °C für 60 min in 0,2x SSC inkubiert.

Zur Detektion der Hybridisierungssignale wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 % und 70 %) entwässert und nach dem Trocknen ein Röntgenfilm aufgelegt (Hyperfilm β -Max, Amersham). Zur Feinanalyse der *in situ*-Signale wurden die Objektträger in eine Fotoemulsionslösung getaucht (Kodak NTB2, 1:1 mit Wasser verdünnt und auf 42 °C erwärmt), über Nacht getrocknet und in Abhängigkeit von der zu erwarteten Signalstärke für fünf Tage bis vier Wochen bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Objektträger in Kodak D19 (4 min) entwickelt, mit Rapid Fix (Kodak) fixiert (15 min) und über Nacht gewässert. Die Schnitte wurden im Hell- bzw. Dunkelfeld (Olympus BH2 bzw. Olympus AX70) analysiert und mit einer Digitalkamera (Intas 302, Polaroid) photographiert.

Hybridisierung und Posthybridisierung mit DIG markierten Sonden

Verwendete Lösungen:

P1	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl
P2	1 % Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) in P1
Substratpuffer	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5 0,15 M NaCl 0,05 M MgCl ₂

Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C, die Posthybridisierung war analog der Vorgehensweise bei den radioaktiv markierten Sonden bis zu dem Waschen bei hoher Temperatur. Danach wurden die Objektträger einmal in 0,2x SSC und anschließend in P1 gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsplätze schloß sich eine Inkubation in P2 an. Die

Schnitte wurden vorsichtig mit 40 µl Anti-DIG-Antikörperlösung (Anti-DIG FAB-Fragment mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, 1:500 in P2, Boehringer Mannheim) überschichtet und bei 4 °C in einer feuchten Kammer ca. 16 Stunden inkubiert. Darauf folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und anschließendes zweimaliges Waschen in P1. Nach Aktivierung der alkalischen Phosphatase durch eine 15 minütige Inkubation in Substratpuffer wurden die Objektträger für einen Zeitraum von 90 min bis zu 24 Stunden in Substratpuffer mit 338 µg/ml Nitroblautetrazolium (NBT) (Biomol) und 175 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Dinatriumsalz (X-Phosphat) (Biomol) inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Waschen in TE-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Objektträger gewässert und mit wässrigem Einbettungsmedium (Kaisers Glyceringelantine, Merck) eingedeckelt. Die Schnitte wurden im Hellfeld betrachtet (AX 70, Olympus) und gegebenenfalls photographiert (DP-50, Olympus).

Immunhistochemie

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet, die Hypophysen entnommen und über Nacht in Hollande-Bouin-Lösung (0,11 M Kupfer(II)Acetat / 0,24 M Pikrinsäure / 3,4% Formaldehyd) fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gewebe so lange in 70 % Isopropanol gewaschen bis die Waschlösung farblos blieb und dann in Paraffin eingebettet. Mit einem Microtom (Leica) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach dem Entparaffinisieren wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation in 0,5% H₂O₂ in Methanol geblockt. Die Schnitte wurden 30 min in 50 mM PBS mit 5 % BSA inkubiert und unspezifische Avidin-Biotin Bindungen mit dem Biotin/Avidin Blocking Kit (Vector Laboratories) inaktiviert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 18 °C über Nacht, gefolgt von einer Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C. Nach dem Waschen der Schnitte mit Wasser und 50 mM PBS wurden die Schnitte mit spezies-spezifischen biotinylierten sekundären Antikörpern (Dianova) für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte eine Inkubation mit ABC-Komplex (Vectastain ABC-Kit; Vector Laboratories) für 30 min bei 37 °C und die Färbung der Schnitte durch eine Nickel-verstärkte Diaminobenzidin-Reaktion (0,125 µg/ml Diaminobenzidin und 0,75 µg/ml Ammonium-Nickel-Sulfat) für 10 min bei RT.

Die Antikörper für die Immunhistochemie wurden freundlicherweise von Dr. A.F. Parlow zur Verfügung gestellt. Polyklonale Antisera gegen GH (NIDDK-anti-rGH-IC-1), βTSH (NIDDK-anti-rBetaTSH-IC-1) and Prolaktin (NIDDK-anti-rPRL-IC-5) wurden in einer Verdünnung von 1:30.000 eingesetzt. Die Antisera gegen βFSH (NIDDK-anti-rBetaFSH-IC-1) und ACTH (Dianova) wurden als 1:10.000-Verdünnung, die Antisera gegen βLH

(NIDDK-anti-rBetaLH-IC-2) und α GSU (NIDDK-anti-rAlpha Subunit-IC) als 1:20.000-Verdünnung eingesetzt.

Radioimmunoassay

Die Ermittlung der Schilddrüsen - und der Hypophysenhormonkonzentrationen erfolgte mit Hilfe von Radioimmunoassays in Zusammenarbeit mit Dr. Theo Visser (Rotterdam) und Dr. A.F. Parlow (USA).

¹²⁵I-markierte Iodthyronine wurden von Amersham, T4 Antiserum von Sigma bezogen. T3 and rT3 Antisera wurden in Rotterdam hergestellt (Visser 1977). Die finale Antikörperkonzentration betrug 1:20,000 für T4, 1:250,000 für T3 und 1:150,000 für rT3. Das Probenvolumen war 10 μ l für T4, 20 μ l für T3, und 25 μ l für rT3, die Inkubationsansätze wurden in 0.5 ml RIA-Puffer (0.06 M Barbitol, 0.15 M HCl, 0.1% BSA, 0.6 g/l 8-Anilino-1-Naphthalin-sulfonsäure [Sigma]) angesetzt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und die Antikörper-gebundene Radioaktivität mit Sac-Cel Cellulose gekoppeltem sekundärem Antikörper (IDS, Boldon, UK) präzipitiert.

Deiodase Aktivitätsmessungen

Die Deiodinase Aktivitäten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Theo Visser in Rotterdam durchgeführt. Das Gewebe wurde in 10 Volumen oder 1 ml (Hypophysen) 0,1 M Natriumphosphat (pH 7,2), 2 mM EDTA und 1 mM DTT homogenisiert. Aliquots der Homogenate wurden eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Deiodase Aktivitäten wurden bestimmt durch Messung der bevorzugt katalysierten Reaktion der Isoenzyme; ORD (outer ring deiodination) von rT3 durch D1, ORD von T4 durch D2, und IRD (inner ring deiodination) von T3 durch D3. D1 und D2 Aktivitäten wurden über die Freisetzung von ¹²⁵Iod von am äußeren Ring radioaktiv markiertem Substrat gemessen. Die D3 Aktivität wurde durch HPLC-Analyse der Bildung von radioaktivem 3,3'-Diiodthyronin (3,3'-T2) und 3'-Iodthyronin (3'-T1) aus am äußeren Ring markiertem T3 (Köhrle 2002 und Richard 1998) bestimmt.

Verwendete Plasmide

CDNA	Vektor	Größe	Fragment	Zugriffsnummer in der Genbank	Linearisiert mit	Polymerase / Orientierung
GH	pLS	198 bp	nt 248-445	U62779	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
β -TSH	pLS	254 bp	nt 190-445	M10902 (Chin 1985)	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
β -FSH	pLS	880 bp	nt 1-879	M36804 (Maurer 1987)	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
Prolactin	pLS	184 bp	nt 1566-1749	J00769 (Gubbins 1980)	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
POMC	pGEM4	471 bp	nt 56-526	J00759	Xba I Hind III	T7/antisense Sp6/sense
LH	pLS	457 bp		NM_012858 (Chin 1983)	Xba I BamHI	T3/antisense T7/sense
α GSU	pGEM _T easy	344 bp	nt 11-355	AH003532	Sac II Sac I	SP6/antisense T7/sense
RTRH-R1	pLs	548 bp	nt 249-797	De La Pena , (Delgado 1992)	Hind III Eco RI	T7/antisense T3/sense
Cyclophilin	pLS	743 bp	nt 1-743	M19533 (Danielson 1988)	Hind III Eco RI	T7/antisense T3/sense
Deiodinase type 1	PCRII TOPO	349 bp	nt 40-389	NM_007860 (Maia 1995)	Hind III Eco RI	T7/antisense SP6/sense
Deiodinase type 2	pGEM _T easy	914 bp	nt 131-1045	AF096875 (Davey 1999)	Sac II Sac I	SP6/antisense T7/sense
Deiodinase type 3	pGEM _T easy	306 bp	nt 43-348	AA389415 (Hernandez 1999)	Sac II Pst I	SP6/antisense T7/sense
IGF-1	pLs	492 bp	nt 137-629	NM_010512 (Bell 1986)	EcoR I Hind III	T3/sense T7/antisense
ALS	pLs	837 bp	nt 87-924	NM_008340 (Boisclair 1996)	Hind III EcoR I	T7/antisense T3/sense
IGFBP-3	pLs	547 bp	nt 347-894	X81581 (Schuller 1994)	Hind III EcoR I	T7/antisense T3/sense

Tab. 1: Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Plasmide. Angegeben ist jeweils der Vektor, die Größe und Orientierung der Fragmente, die enthaltenen Nukleotide und die Zugriffsnummer in der Genbank sowie die entsprechende Literaturangabe. Die verwendeten Plasmide wurden entweder im Rahmen dieser Arbeit kloniert oder freundlicher Weise von Dr. Heuer und Dr. Schäfer zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse

Weibliche und männliche Pax8^{+/-} Mäuse waren fertil und zeigten ein normales Reproduktionsverhalten. Die Schwangerschaft verlief unauffällig und die Größe der Würfe (n = 6-14) entsprach der von C57black-6 Wildtyptieren. Die Würfe setzten sich aus Pax8^{+/+}, Pax8^{+/-} und Pax8^{-/-} Nachkommen zusammen. Die Verteilung entsprach den Mendelschen Gesetzen.

Verminderte Gewichtszunahme

Um den Effekt des kongenitalen Hypothyreoidismus in den Pax8^{-/-} Mäusen auf die Gewichtszunahme zu quantifizieren, wurde deren Verlauf in den ersten drei Wochen nach der Geburt bestimmt. Unter den Neugeborenen mit sehr niedrigem Körpergewicht waren die Pax8^{-/-} Tiere eindeutig überrepräsentiert. 58 von 77 untersuchten Tieren, deren Geburtsgewicht im unteren Drittel lag, waren Pax8^{-/-} Mäuse, während nur 8 von 156 Tieren, deren Geburtsgewicht im oberen Drittel lag, als Pax8^{-/-} Tiere identifiziert wurden. Viele der Pax8^{-/-} Tiere (~ 40-50%) mit sehr niedrigem Geburtsgewicht starben innerhalb der ersten drei Tage nach der Geburt. Um die Zahl der überlebenden Knockout-Tiere zu erhöhen, wurde die Größe der Würfe auf 4 Tiere reduziert.

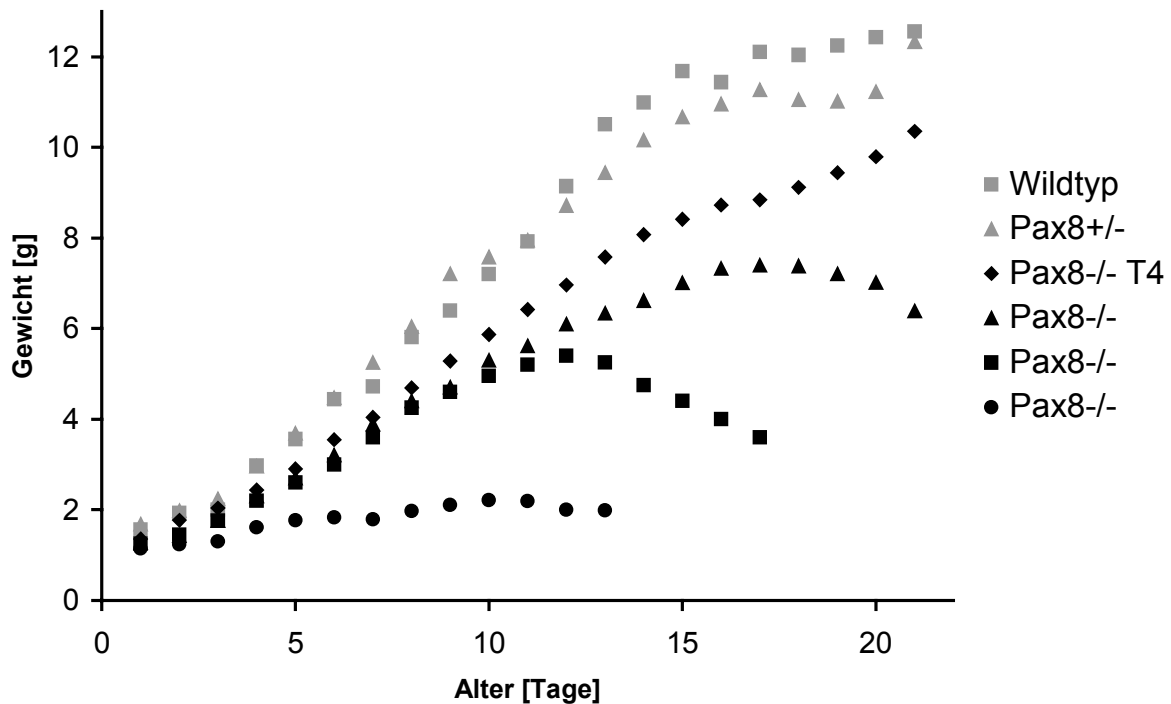


Abb. 4: Gewichtsentwicklung von Wildtyp, Pax8^{+/-} und Pax8^{-/-} Tieren, sowie Pax8^{-/-} Mäusen, die ab Tag 3 täglich mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) behandelt wurden. Gezeigt sind die Wachstumskurven von repräsentativen Individuen. Für Wildtyp, Pax8^{+/-}, und substituierte Pax8^{-/-} Tiere ist jeweils eine, für Pax8^{-/-} Mäuse sind drei typische Kurven gezeigt.

Im Verlauf der ersten (~ 25%) und zweiten Woche (~ 10%) starb ein weiterer Teil der Pax8^{-/-}-Mäuse und nur etwa 20% erreichen ein Alter von 3 Wochen (Abb. 4). Aus diesem Grund konzentrieren sich die Untersuchungen in dieser Arbeit auf die ersten drei Wochen nach der Geburt.

Das postnatale Wachstum der Pax8^{-/-}-Mäuse war variabel aber deutlich verzögert im Vergleich zu ihren Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-}-Geschwistern (Abb. 4 und Abb. 5). Die heterozygoten Mäuse waren von ihren Wildtyp-Geschwistern nicht zu unterscheiden.

Pax8^{-/-}-Tiere, die täglich mit T4 behandelt wurden, zeigten ähnliche Wachstumskurven wie ihre Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-}-Geschwister (Abb. 4) und erreichten als adulte Tiere ein den Wildtyptieren entsprechendes Körpergewicht.



Abb. 5: Gezeigt ist eine 15 Tage alte Pax8^{-/-}-Maus (links) mit einer Wildtypmaus aus dem gleichen Wurf.

Postnatales Profil der Schilddrüsenhormon-Konzentration

Die Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone T₄, T₃ und rT₃ wurden während der drei ersten Wochen nach der Geburt untersucht (Abb. 6). Da zwischen den heterozygoten Tieren und den Wildtyptieren kein Unterschied zu beobachten war (Tab. 2), wurden diese in einer Gruppe zusammengefaßt.

	T4 [nmol/l]	T3 [nmol/l]
Pax8 +/+	60,4 ± 10,5	1,22 ± 0,27
Pax8 +/-	65,8 ± 16,1	1,08 ± 0,22

Tab. 2: Schilddrüsenhormonwerte in adulten Pax8+/- und Wildtyptieren. Die Werte repräsentieren den Mittelwert ± die Standardabweichung von 10 unabhängigen Messungen.

Am Tag der Geburt waren die T4- und T3-Konzentrationen sowohl in den Kontrolltieren als auch in den Pax8-/- Tieren unter der Detektionsgrenze. In den Kontrolltieren stiegen die T3- und T4-Serumkonzentration bis Tag 15 an, um dann abzufallen (Abb. 6A) und an Tag 21 etwa die Konzentration adulter Tiere (T4 60,4 ± 10,5 nmol/l, T3 1,22 ± 0,27 nmol/l) zu erreichen.

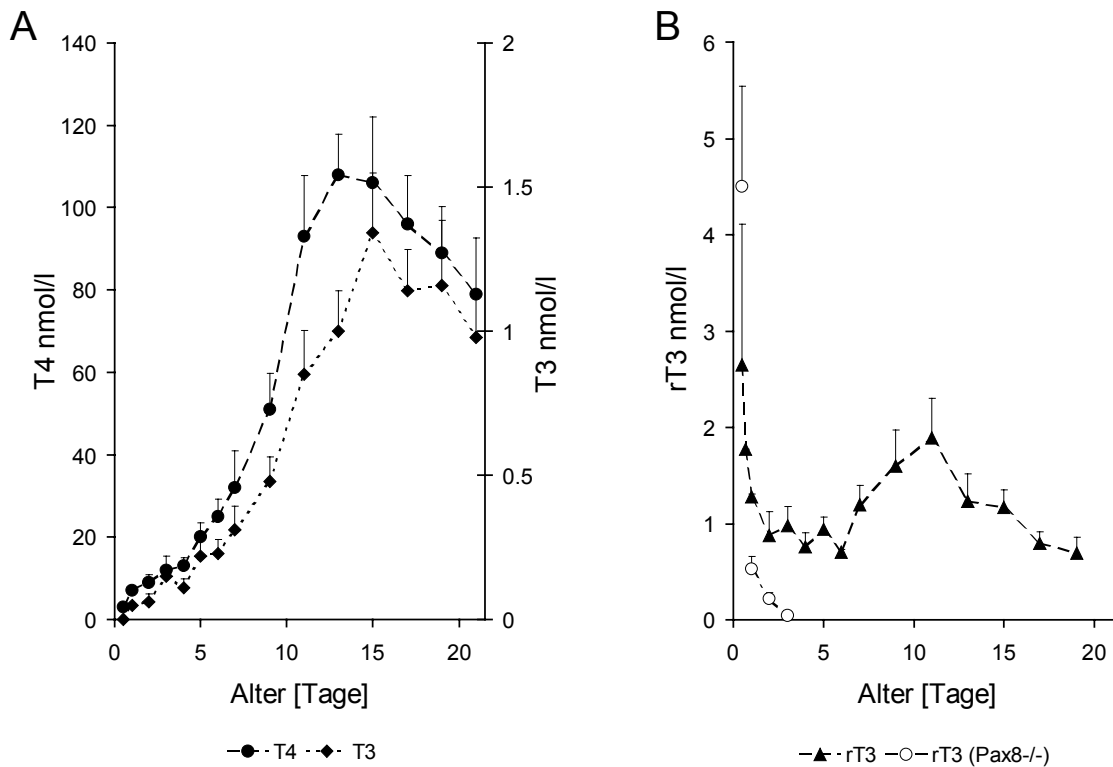


Abb. 6: Schilddrüsenhormonkonzentrationen während der Entwicklung in Kontrollmäusen und Pax8-/- Tieren. Gezeigt sind die Serumwerte für T4 und T3 (A) sowie für rT3 (B) in den ersten drei Lebenswochen. In den Pax8-/- Mäusen waren die T4 und T3 Werte unter der Detektionsgrenze. Die Werte repräsentieren Mittelwerte von mindestens 5 unabhängigen Messungen. Zugunsten einer besseren Übersicht wurde auf Fehlerbalken verzichtet.

In den Pax8 -/- Mäusen hingegen konnte an keinem der untersuchten Zeitpunkte T4 oder T3 im Serum nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu T4 und T3 war die rT3 Konzentration sowohl in den Pax8 -/- Tieren als auch in den Kontrolltieren am Tag der Geburt hoch. In den

Kontrolltieren fiel die Konzentration in der ersten Woche um ca. 70 % ab, um dann parallel zu T4 wieder anzusteigen. In den Pax8 ^{-/-} Mäusen fiel die rT3-Serumkonzentration sehr schnell ab, so daß ab Tag 3 kein rT3 mehr nachzuweisen war (Abb. 6B).

Schilddrüsenhormon-Substitution

T4 substituierte (tägliche Injektion von 20 ng T4/g Körpergewicht ab Tag 3) Pax8^{-/-} Mäuse entwickelten sich normal und zeigen keine offensichtlichen Unterschiede zu Kontrolltieren. Die substituierten Tiere haben eine normale Lebenserwartung. Zur Kontrolle des Schilddrüsenhormon-Status der langfristig substituierten Tiere sowie der während dieser Arbeit mit einer einmaligen pharmakologischen Dosis T4 oder T3 behandelten Tiere wurden die Serumkonzentrationen 24 Stunden nach der Hormoninjektion gemessen.

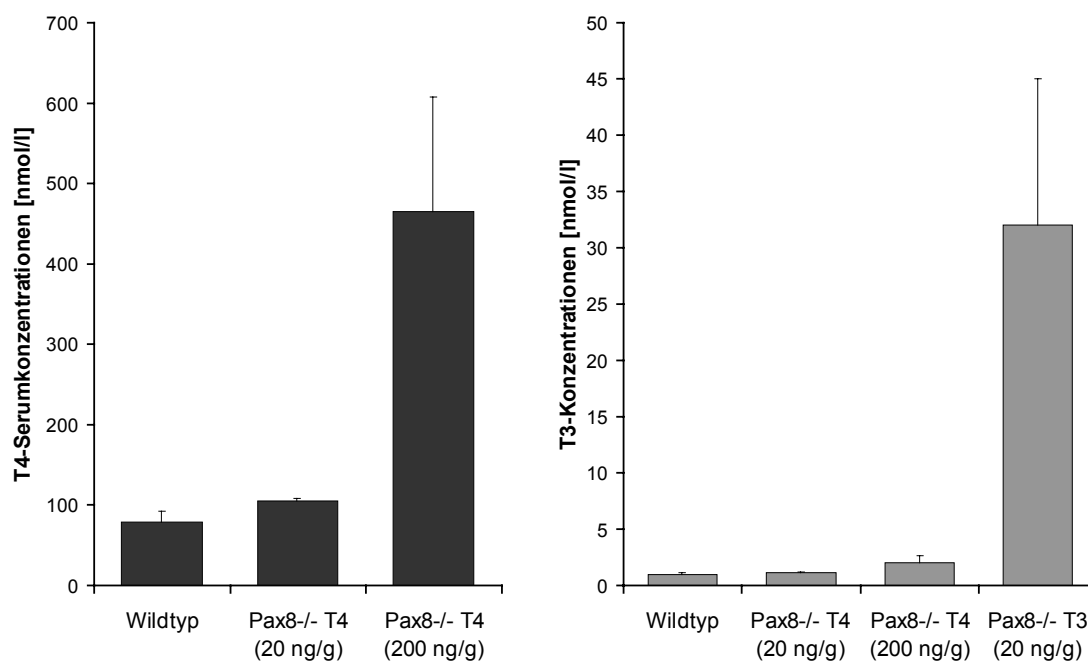


Abb. 7: Schilddrüsenhormonkonzentrationen in 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen, die entweder von Tag 3 bis Tag 20 mit 20 ng T4 (Pax8^{-/-} T4 (20 ng/g)), oder an Tag 20 mit 200 ng T4 (Pax8^{-/-} T4 (200 ng/g)) bzw. 20 ng T3 (Pax8^{-/-} T3 (20 ng/g)) pro g Körpergewicht behandelt wurden. Gezeigt sind die T4- und T3-Serumwerte 24 Stunden nach der Injektion der Hormone. Zum Vergleich sind jeweils die Werte von 21 Tage alten Wildtypmäusen gezeigt. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm die Standardabweichung von 3 unabhängigen Messungen.

Verglichen mit 21 Tage alten Wildtyptieren (T4: $79,3 \pm 13$ nmol/l; T3: $0,98 \pm 0,16$ nmol/l) zeigen die täglich mit 20 ng T4/g Körpergewicht substituierten Pax8^{-/-}-Tieren 24 Stunden nach der Injektion (T4: 105 ± 3 nmol/l; T3: $1,12 \pm 0,05$ nmol/l) einen milden Hyperthyreodismus. Die Pax8^{-/-} Mäuse, die an Tag 20 mit einer einmaligen, zehnfach höheren

Menge T4 (200 ng/g Körpergewicht) behandelt wurden, hatten 24 Stunden nach der Injektion eine etwa fünffach höhere T4-Konzentration als die Kontrolltiere. Die T3-Serumkonzentration dieser Tiere war etwa doppelt so hoch. In den T3 (20 ng/g Körpergewicht) behandelten Pax8^{-/-} Mäuse war die T3-Konzentration 24 Stunden nach der Injektion etwa 30 mal höher als in den Wildtypmäusen (Abb. 7).

Deiodinase Expression

Der Mechanismus zur Regulation des intrazellulären T3-Gehalts beinhaltet sowohl die Versorgung mit T4 durch das Blut als auch die Umwandlung von T4 in T3 und der Abbau von T4 und T3 zu rT3 oder T2 durch Deiodierung. Daher wurde der Effekt des kongenitalen Hypothyreodismus in den Pax8^{-/-} Mäusen auf die Expression der Deiodinasen in der Peripherie und im Gehirn untersucht.

Postnatale Expression der Deiodinase Typ 1 in Leber und Niere

Der postnatale Verlauf der D1 mRNA-Expression (Abb. 8) und Aktivität (Abb. 9) in Leber und Niere wurden untersucht.

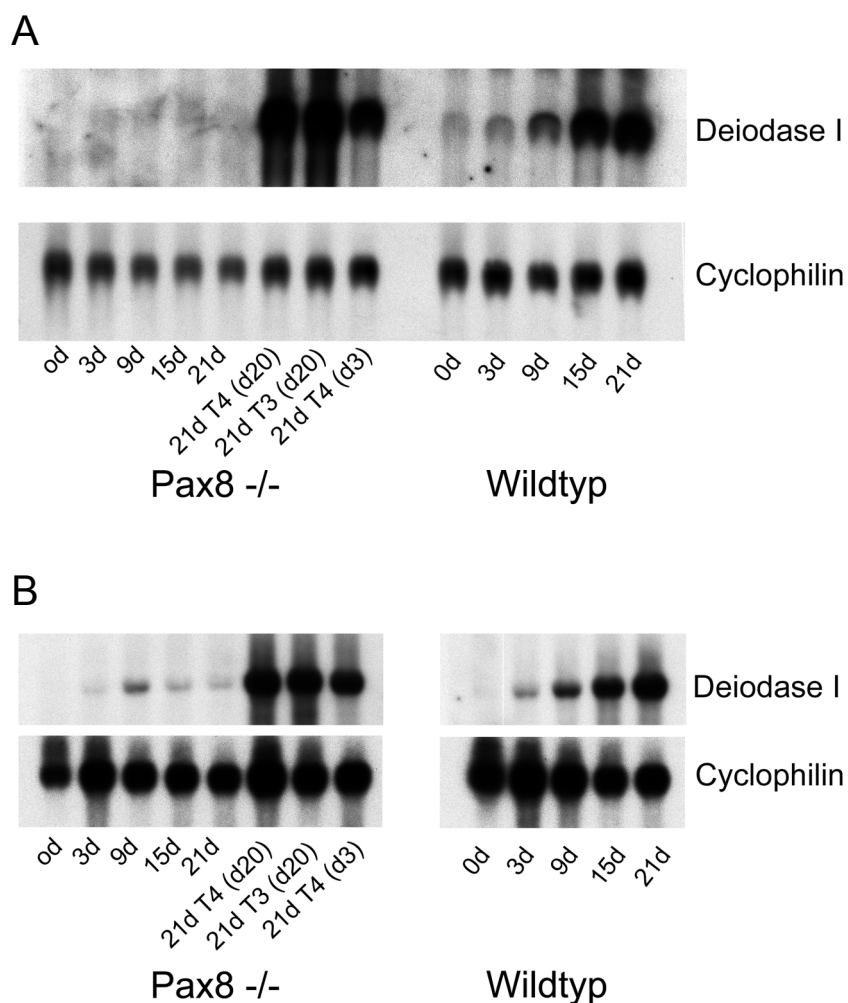


Abb. 8: D1 mRNA-Expression in der Leber (A) und Niere (B) von Wildtyp-Tieren und Pax8^{-/-} Mäusen während der postnatalen Entwicklung und nach Behandlung von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 und T3. Die RNA wurde präpariert aus den Geweben von Wildtyp und Pax8^{-/-} Mäusen sowie von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren, die von Tag 3 bis 20 täglich mit T4 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d3)) oder an Tag 20 mit T4 (200 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d20)) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T3 (d20)) behandelt wurden. Pro Gruppe wurde das Gewebe von 3-5 Tieren gepoolt. Die Northern-Blot Analyse erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit RNA und des Transfers auf die Membran erfolgte eine Hybridisierung mit Cyclophilin.

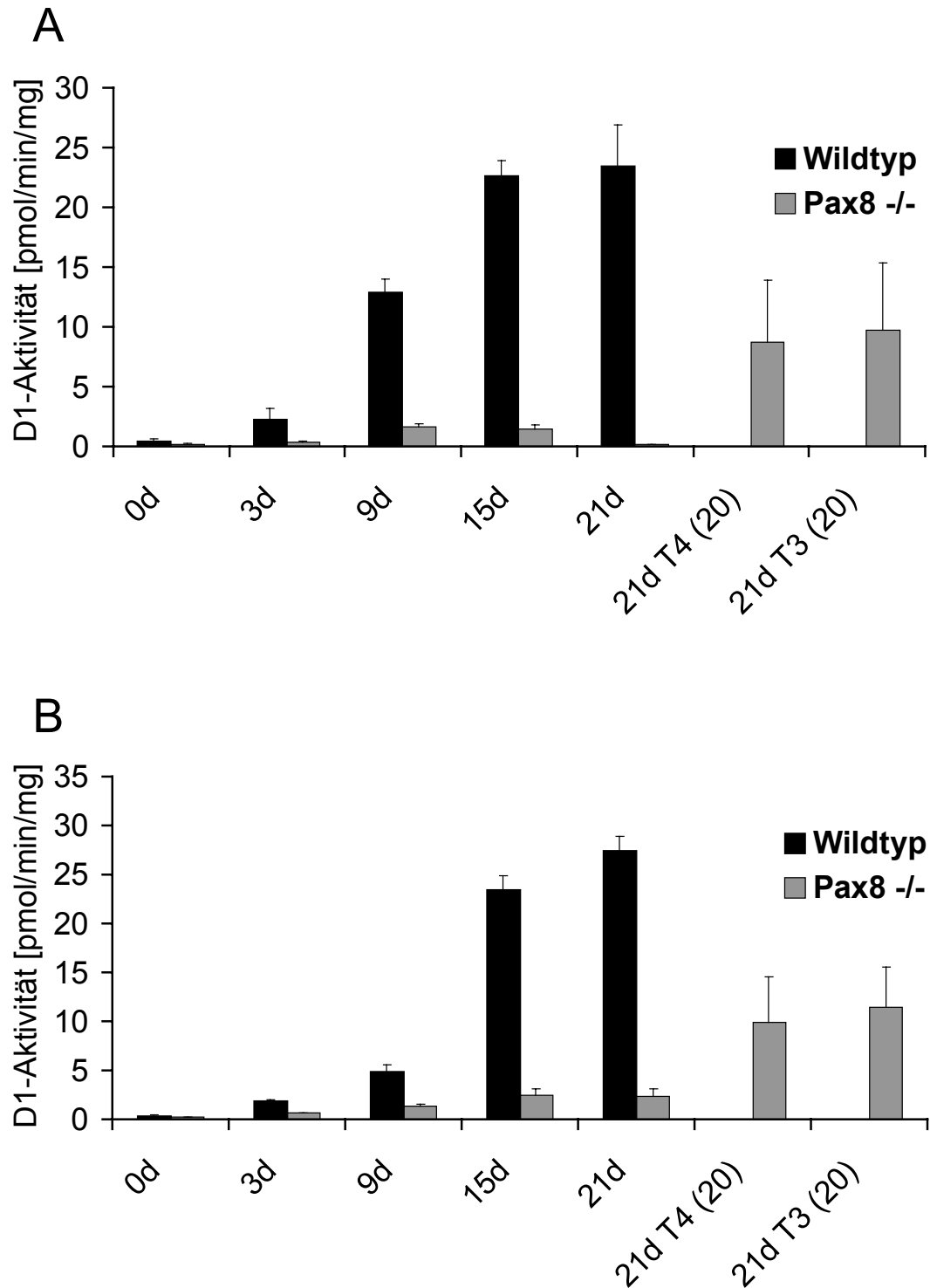


Abb. 9: D1 Enzymaktivitäten in Leber (A) und Niere (B) von Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen während der postnatalen Entwicklung und nach Behandlung von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 und T3 für 24h. Die Gewebe wurden präpariert von Wildtyp und Pax8^{-/-} Mäusen sowie von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren, die an Tag 20 mit T4 (200 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d20)) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T3 (d20)) behandelt wurden. Die Enzymaktivitäten wurden in Gewebehomogenaten wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Gewebepreparationen.

In den Kontrolltieren waren am Tag der Geburt sowohl die mRNA-Mengen als auch die Enzymaktivitäten in Leber und Niere sehr niedrig, stiegen dann aber stark an und erreichten ihren Maximalwert nach zwei Wochen. In den Pax8^{-/-} Mäusen waren D1 mRNA-Gehalt und Aktivität in Leber und Niere direkt nach der Geburt ebenfalls sehr niedrig, im Gegensatz zu den Kontrolltieren blieben die Werte aber während des untersuchten Zeitraums von drei Wochen niedrig.

Nach einer einmaligen Injektion von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 (200 ng/g Körpergewicht) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht) waren die D1 mRNA-Mengen in Leber und Niere nach 24 Stunden höher als die in 21 Tage alten Kontrolltieren. Die D1 Enzymaktivitäten stiegen ebenfalls stark an, erreichten innerhalb von 24 Stunden jedoch nur etwa die Hälfte der in den Kontrolltieren gemessenen Werte. Eine tägliche Behandlung der Pax8^{-/-} Tiere mit einer physiologischen Dosis T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 führte zu einer Normalisierung der D1 mRNA-Expression in Leber und Niere.

Postnatale Expression der Deiodinasen im Gehirn

Im Gehirn wurde sowohl die mRNA-Expression und Aktivität der Deiodinase 2 (D2) als auch der Deiodinase 3 (D3) in den ersten drei Wochen nach der Geburt untersucht.

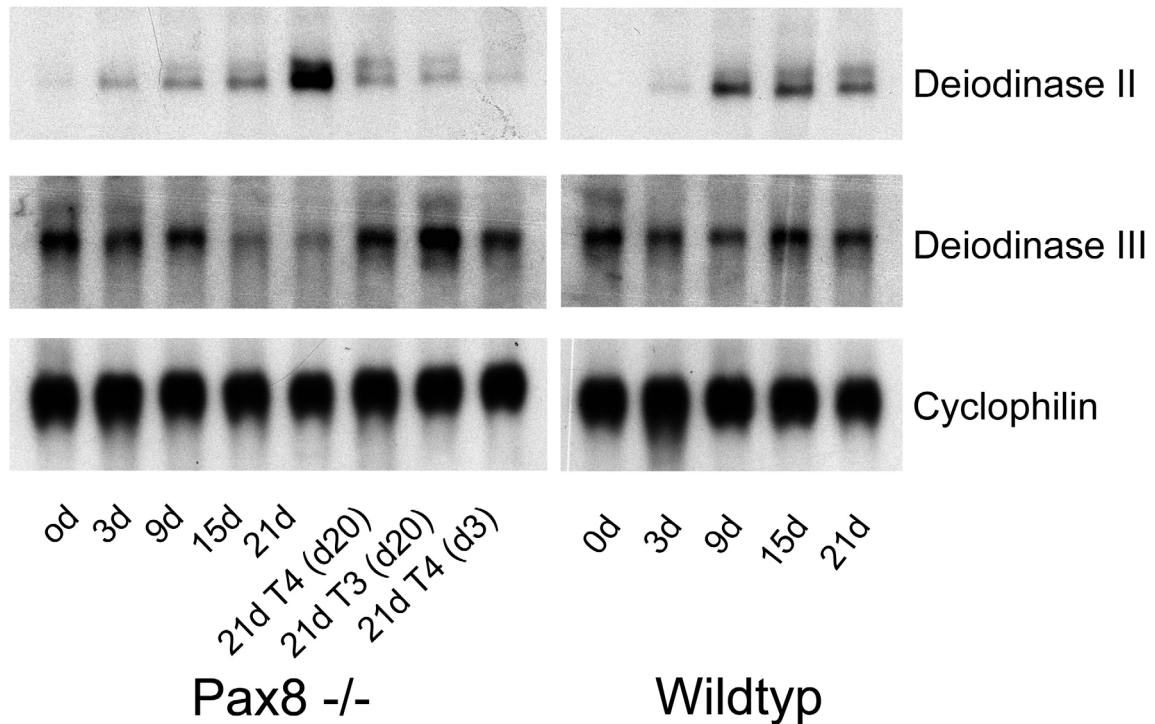


Abb. 10: D2 and D3 mRNA-Expression im Gehirn von Wildtyp-tieren und Pax8^{-/-} Mäusen während der postnatalen Entwicklung und nach Behandlung von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 und T3 für 24h sowie Pax8^{-/-} Tieren, die von Tag 3 bis Tag 20 mit T4 behandelt wurden. Die mRNA wurde präpariert aus Gehirnen von Wildtyp und Pax8^{-/-} Mäusen sowie von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren, die von Tag 3 bis Tag 20 täglich mit T4 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d3)) oder an Tag 20 mit T4 (200 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d20)) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T3 (d20)) behandelt wurden. Das Gewebe von jeweils 3-5 Tieren wurde gepoolt. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit mRNA und des Transfers auf die Membran erfolgte eine Hybridisierung mit Cyclophilin.

In allen Tieren waren sowohl die D2-Transkriptspiegel als auch die D2 Aktivitäten am Tag der Geburt sehr niedrig. In den Kontrolltieren und in den Pax8^{-/-} Mäusen stiegen die D2 mRNA-Mengen mit dem Alter an (Abb. 10). Die mRNA-Expression erreichte in den Kontrolltieren ihr Maximum am Tag 9, während in den Pax8^{-/-} Tieren die stärkste mRNA-Expression erst am Tag 21 beobachtet wurde. Eine im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöhte D2 mRNA-Menge konnte in den Pax8^{-/-} Mäusen nur am Tag 21 beobachtet werden. Sowohl eine einmalige Injektion von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 (200 ng/g Körpergewicht) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht) als auch eine tägliche Behandlung mit T4

(20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 führte zu einer Abnahme der D2 mRNA-Expression in den 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren auf Werte, die niedriger waren als in unbehandelten Kontrolltieren.

Die D3 mRNA-Mengen im Gehirn sind in beiden Versuchsgruppen von der Geburt bis Tag 3 gleich hoch. Die D3 mRNA-Expression verändert sich in den Wildtyp-tieren von der Geburt bis zum Tag 21 kaum. Im Gegensatz dazu ist in den Pax8^{-/-} Mäusen an Tag 15 und 21 eine deutliche Abnahme der D3 Transkriptspiegel zu beobachten (Abb. 10). Eine einmalige Behandlung von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 (200 ng/g Körpergewicht) sowie eine tägliche Substitution der Tiere mit einer physiologischen Dosis T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 führten zu einer Zunahme der D3 mRNA-Expression in den 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen auf ähnliche Werte, wie sie in unbehandelten Kontrolltieren beobachtet wurden. Nach der Behandlung mit T3 (20 ng/g Körpergewicht) stiegen die D3-mRNA-Mengen sogar auf Werte, die höher waren als in den Wildtyp-tieren (Abb. 10).

Die cerebrale D2 Aktivität (Abb. 11) direkt nach der Geburt war in beiden Tiergruppen sehr niedrig, scheint in den Pax8^{-/-} Tieren aber ein wenig höher zu sein. In den Pax8^{-/-} Mäusen wurde im Verlauf der Entwicklung ein dramatischer Anstieg der D2 Aktivität im Gehirn beobachtet. Die D2 Enzymaktivität in den Kontrolltieren zeigte ebenfalls einen postnatalen Anstieg, aber die gemessenen Werte waren um eine Größenordnung niedriger als in den Pax8^{-/-} Tieren. Bei beiden Gruppen wurden die höchsten D2 Aktivitäten an Tag 15 gemessen. Eine einmalige Injektion von T3 (20 ng/g Körpergewicht) an Tag 20 führte nur zu einer moderaten Abnahme der D2 Aktivität in den 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen, während die D2 Aktivität durch die einmalige Gabe von T4 (200 ng/g Körpergewicht) nahezu vollständig inhibiert wurde.

Die D3 Enzymaktivitäten (Abb. 11) im Gehirn sind in beiden Versuchsgruppen von der Geburt bis Tag 3 gleich hoch. Von Tag 9 bis Tag 21 fällt die Enzymaktivität leicht ab. Die Abnahme ist in den Pax8^{-/-} Mäusen etwas stärker als in den Kontrolltieren. Dies führt an Tag 15 und 21 dazu, daß die D3 Aktivität in den Pax8^{-/-} Mäusen signifikant niedriger ist als in den Kontrollen. Die D3 Enzymaktivität im Gehirn von Pax8^{-/-} Mäusen wurden innerhalb von 24 Stunden weder durch eine Gabe von T4 (200 ng/g Körpergewicht) noch durch eine Gabe von T3 (20 ng/g Körpergewicht) beeinflusst.

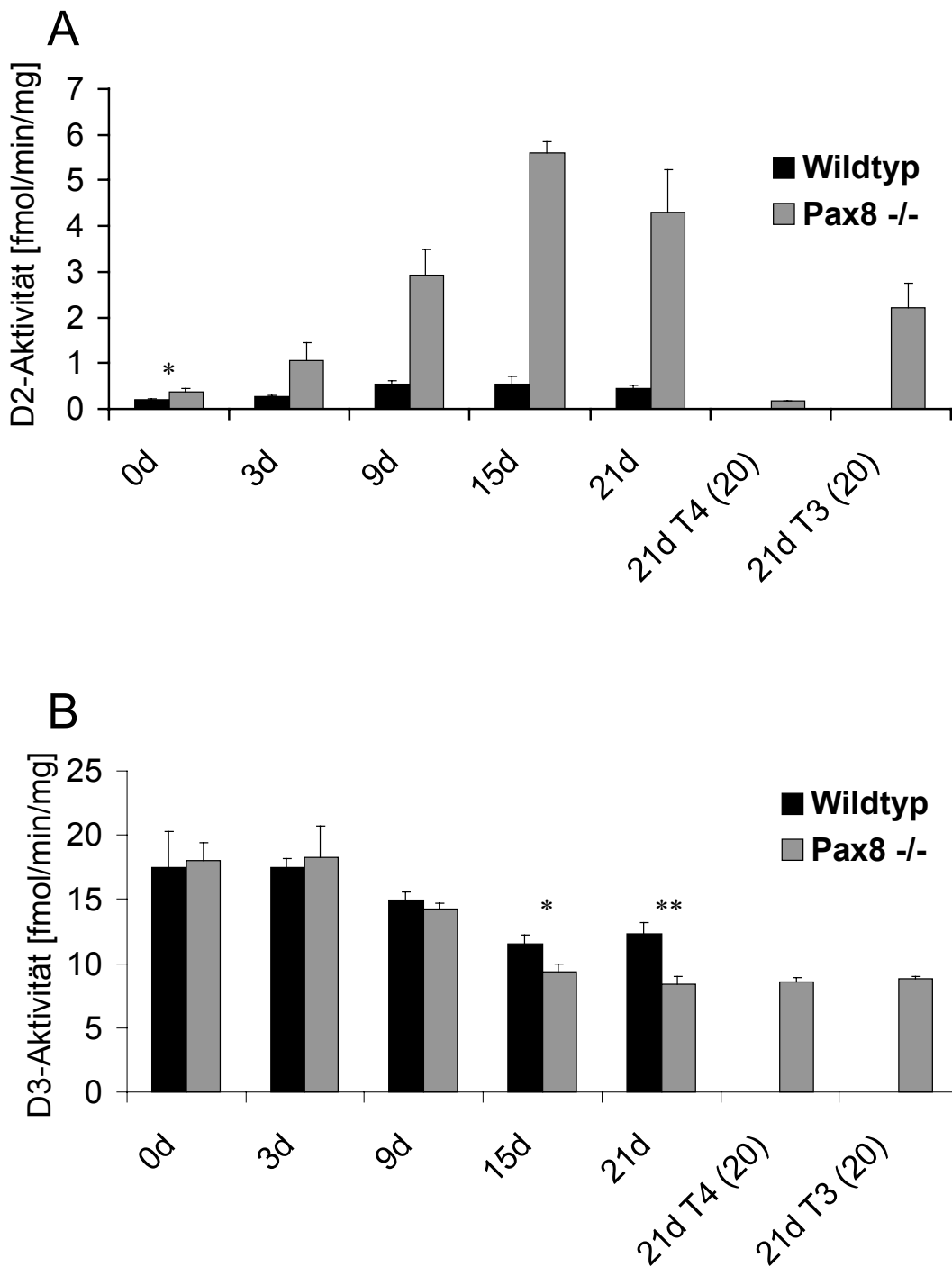


Abb. 11: D2 (A) und D3 (B) Enzymaktivitäten im Gehirn von Wildtyp-Tieren und Pax8^{-/-} Mäusen während der postnatalen Entwicklung und nach Behandlung von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 und T3 für 24h. Präpariert wurden die Gehirne von Wildtyp und Pax8^{-/-} Mäusen sowie von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren, die an Tag 20 mit T4 (200 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d20)) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T3 (d20)) behandelt wurden. Die D2 und D3 Enzymaktivitäten wurden in Gewebekomplexen wie unter Material und Methoden beschrieben gemessen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Gewebepreparationen; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,005$.

Deiodinase Expression in der Hypophyse

Da die Deiodinase 2 auch in der Hypophyse für die lokale Umwandlung von T4 in T3 wichtig ist (Silva 1977) und daher an der Rückkopplungskontrolle der TSH-Sekretion als auch der Regulation der anderen Hypophysenhormone beteiligt sein könnte, wurden die D2 mRNA-Expression und Enzymaktivitäten in Hypophysen-Präparationen von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen und Kontrolltieren verglichen.

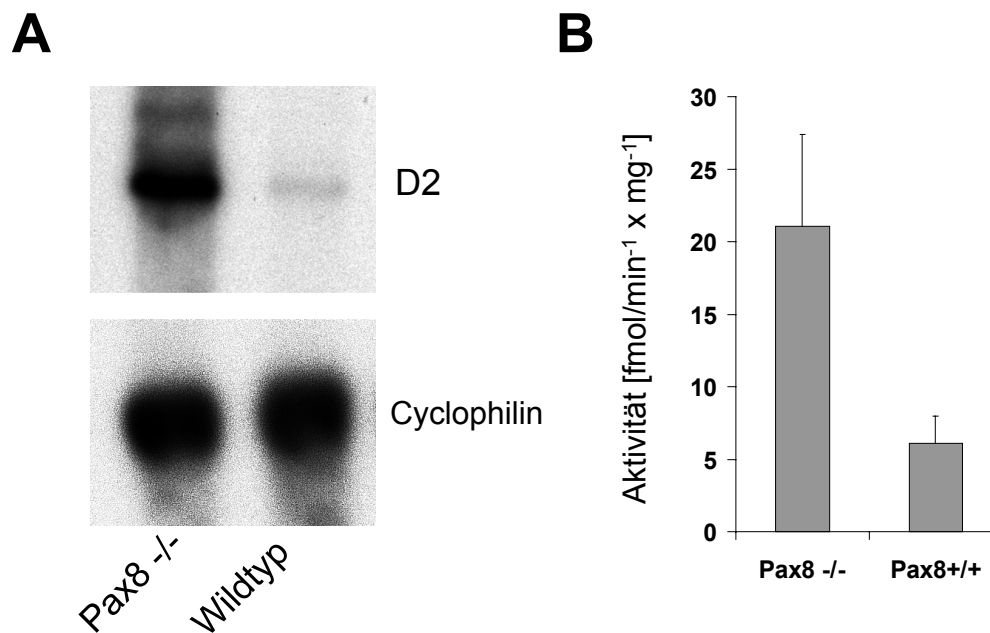


Abb. 12: D2 mRNA-Expression (A) und Enzymaktivität (B) in der Hypophyse von Pax8^{-/-} Mäusen und Wildtyptieren. Wie in Material und Methoden beschrieben wurde aus jeweils 10 Hypophysen von 21 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen mRNA präpariert und die D2 mRNA-Expression mittels Northern-Blot Analyse untersucht. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit mRNA und des Transfers auf die Membran erfolgte eine Hybridisierung mit Cyclophilin. Die D2 Enzymaktivitäten wurden in den Gewebekomogenaten von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen und Wildtyptieren gemessen (siehe Material und Methoden). Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Gewebepreparationen.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde in den Hypophysen von Pax8^{-/-} Tieren ein dramatischer Anstieg sowohl der D2 mRNA-Mengen als auch der D2 Aktivität (Abb. 12) beobachtet. Weder in Wildtyptieren noch in den Pax8^{-/-} Mäusen konnte eine D1 mRNA-Expression nachgewiesen werden.

Analyse der Hypophyse

Makroskopische Analyse

Schon bei der Präparation der Hypophysen war bei der rein makroskopischen Betrachtung ein Unterschied zwischen den Hypophysen der Pax8^{-/-} Tiere und denen von Kontrolltieren zu erkennen. Im Vergleich zu dem weißlich-milchigen Erscheinungsbild der Hypophysen der Kontrolltiere sahen die Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse glasig aus (Abb. 13).

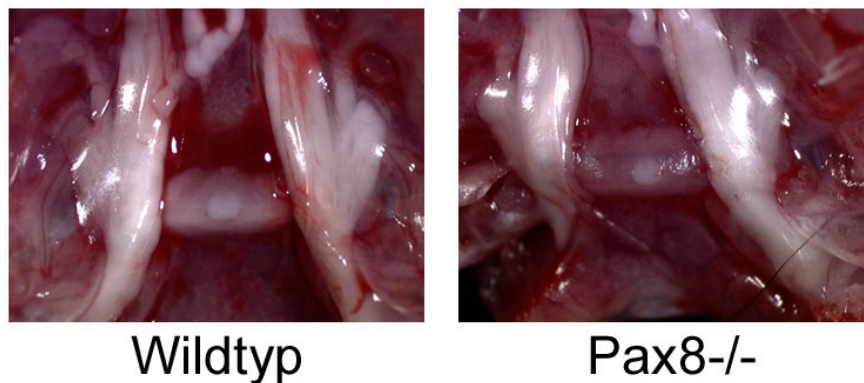


Abb. 13: Makroskopisches Bild der Hypophysen einer 21 Tage alten Wildtypmaus und einer Pax8^{-/-} Maus.

Das Gewicht der Hypophysen in 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen ($0,87 \text{ mg} \pm 0,09 \text{ mg}$) und Kontrolltieren ($0,8 \text{ mg} \pm 0,08 \text{ mg}$) war trotz des Unterschieds im Körpergewicht vergleichbar (Abb. 14).

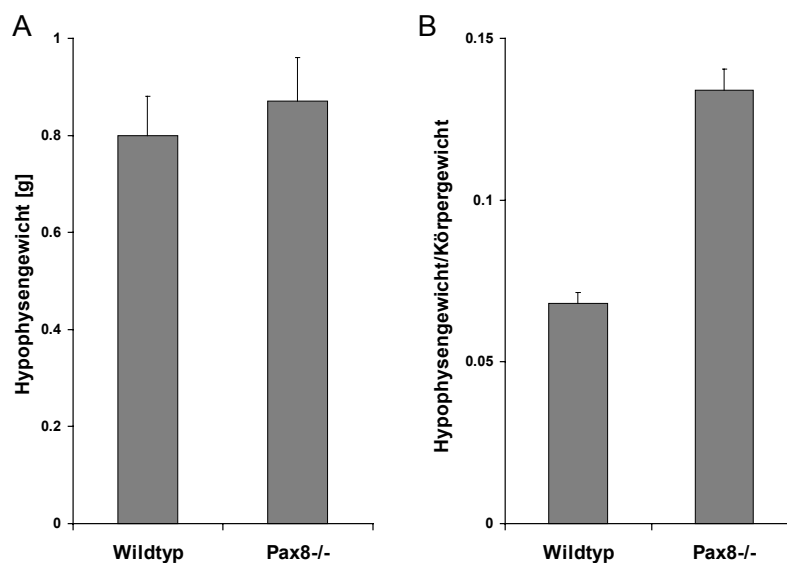


Abb. 14: Gezeigt ist das Hypophysengewicht (A) und das Verhältnis Hypophysengewicht/Körpergewicht (B) von 21 Tage alten Wildtyptieren und pax8^{-/-} Mäusen. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm die Standardabweichung von jeweils fünf Tieren.

Northern-Blot Analyse

Um einen Überblick über den Einfluß des Athyreodismus auf die Expression der Hypophysenhormone zu gewinnen, wurden mit Hilfe einer Northern-Blot Analyse die mRNA-Expression der Hormone in 21 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Tieren untersucht (Abb. 15). Zur Gewinnung der mRNA wurden je Versuchsgruppe 10 Hypophysen verwendet.

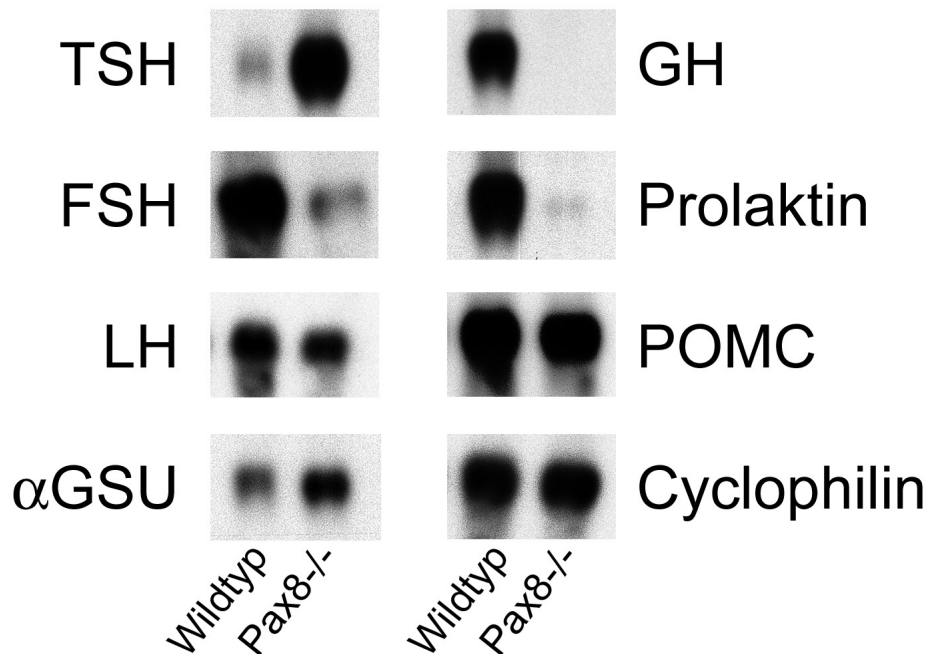


Abb. 15: mRNA-Expression der Hypophysenhormone von Pax8^{-/-} Mäusen und Wildtyptieren. Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde aus jeweils 10 Hypophysen von 21 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen mRNA präpariert und die mRNA-Expression der verschiedenen Hormone mittels Northern-Blot Analyse untersucht. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit mRNA und des Transfers auf die Membran erfolgte eine Hybridisierung mit Cyclophilin.

Einem dramatischen Anstieg der Expression von β TSH in den Pax8^{-/-} Mäusen, stand eine deutliche Verminderung der mRNA-Level von β FSH und β LH gegenüber. Die Expression der α -Untereinheit der Glycoproteinhormone (α GSU) war in den Pax8^{-/-} Tieren ebenfalls deutlich erhöht, während für POMC keine Veränderungen zu beobachten waren. Sowohl die Expression von GH als auch von Prolaktin war in den Pax8^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren drastisch reduziert.

Analyse zur Verteilung der hormonproduzierenden Zellen der Adenohypophyse

Analyse der thyrotropen Zellen

Es wurden die Auswirkungen des Hypothyreoidismus in der Pax8^{-/-} Maus auf den hypothalamisch-hypophysären Regelkreislauf der Schilddrüse untersucht. Im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus der Pax8^{-/-} Tiere kommt es zu einem Anstieg der TRH mRNA-Expression (Stephanie Christ, persönliche Mitteilung).

Auf der Ebene der Hypophyse konnte in 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen eine erhöhte mRNA-Expression des TRH-Rezeptors 1 sowie ein dramatischer Anstieg der Zahl der den Rezeptor exprimierenden Zellen gezeigt werden (Abb. 16).

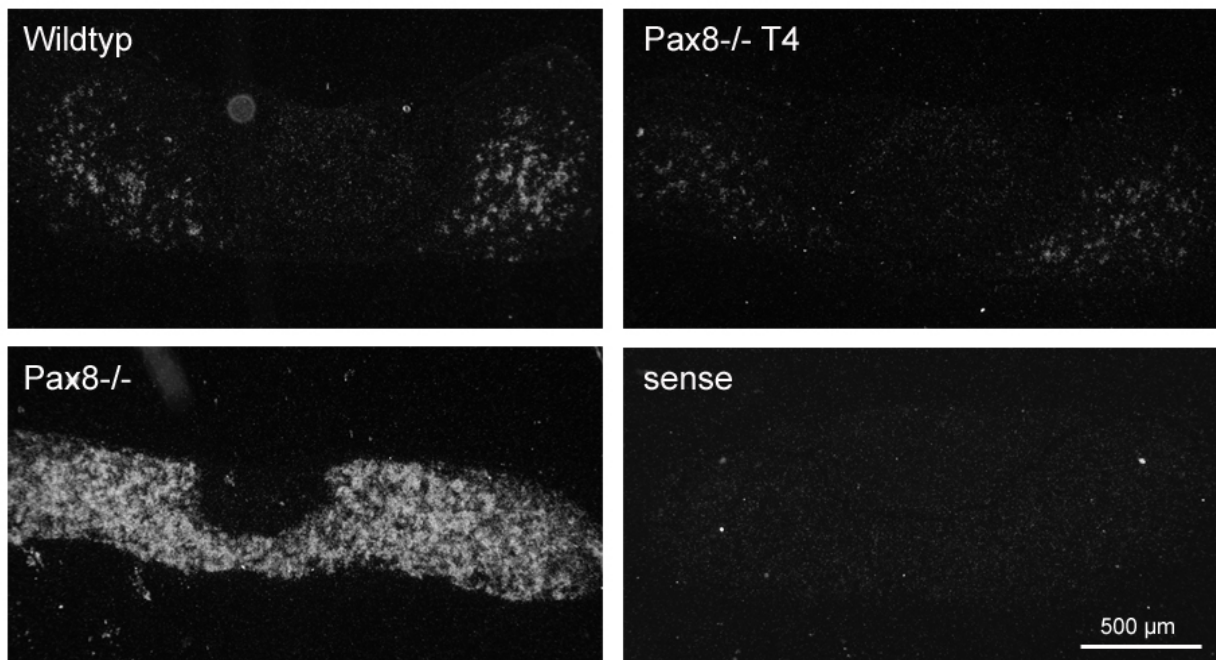


Abb. 16: Histochemische Analyse mittels der *in situ* Hybridisierungstechnik zur mRNA-Verteilung des TRH-R1 in der Hypophyse von 21 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen sowie 21 Tage alter Pax8^{-/-} Tieren, die von Tag 3 bis Tag 20 täglich mit T4 (20 ng/g Körpergewicht; Pax8^{-/-} T4) behandelt wurden. Dargestellt sind Dunkelfeldaufnahmen der Hybridisierung von Hypophysenschnitten (16 µm) mit einer ³⁵S-markierten cRNA-Sonde für den TRH-R1. Zur Kontrolle der Spezifität des Signals wurden parallel *in situ* Hybridisierungen mit einer sense-Sonde durchgeführt.

Durch Substitution der Tiere mit T4 (20ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 konnte die mRNA-Expression des TRH-R1 in 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen wieder normalisiert werden.

Um zu überprüfen, ob der im Northern-Blot beobachtete Anstieg des TSH mRNA-Transkriptspiegel durch eine Erhöhung der Expression oder eine Erhöhung der Anzahl an thyrotropen Zellen hervorgerufen wurde, wurde die TSH mRNA-Expression *in situ* untersucht.

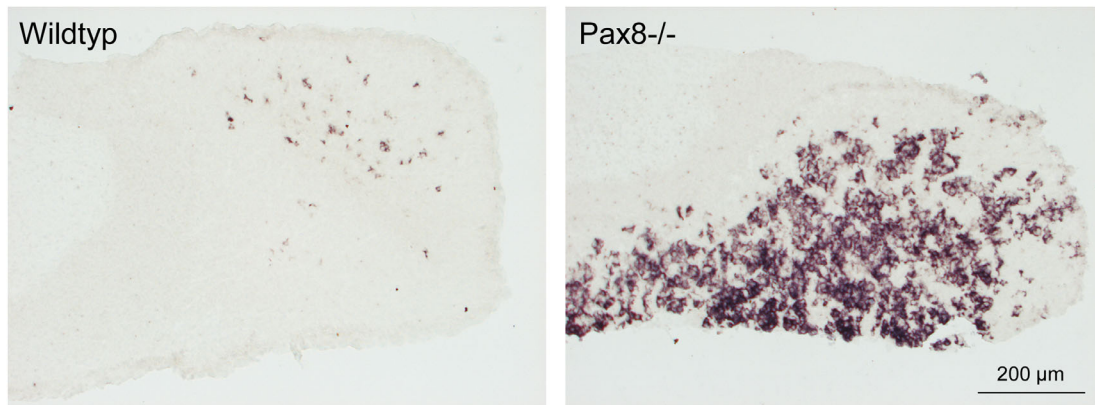


Abb. 17: Bestimmung der mRNA-Verteilung von β TSH in der Hypophyse von 21 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen mittels *in situ* Hybridisierung. Dargestellt sind Hellfeldaufnahmen der Hybridisierung von Hypophysenschnitten (16 μ m) mit einer Digoxegenin-markierten cRNA-Sonde für β TSH. Zur Kontrolle der Spezifität des Signals wurden parallel *in situ* Hybridisierungen mit einer sense-Sonde durchgeführt. Diese zeigte kein Signal.

Wie für TRH-R1 gezeigt, kommt es in den Hypophysen der 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäuse auch beim TSH sowohl zu einem Anstieg der mRNA-Level als auch der Anzahl an TSH exprimierenden Zellen (Abb. 17).

Sowohl die erhöhte Expression von β TSH als auch die der α -Untereinheit (α GSU) konnte durch die Gabe von T4 rückgängig gemacht werden (siehe Abb. 20 und 21). Weder für TRH-R1 noch für TSH konnte ein Unterschied in der Expression zwischen heterozygoten Tieren und Wildtyptieren beobachtet werden.

Analyse der kortikotropen, gonadotropen, laktotropen und somatotropen Zellen

Um die Auswirkungen des Hypothyreodismus auf die Zusammensetzung der anderen hormonproduzierenden Zellen in der Hypophyse zu untersuchen, wurde eine *in situ* Analyse der mRNA-Expression in 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren durchgeführt (Abb. 18). Es wurden jeweils mindestens drei Hypophysen von jedem Genotyp verwendet. Für keines der untersuchten Hormone der Adenohypophyse wurde ein Unterschied zwischen Wildtyptieren und heterozygoten Tieren festgestellt.

Die Zahl der gonadotropen Zellen war in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse deutlich reduziert. Das POMC Expressionsmuster in den Pax8^{-/-} Mäusen war unverändert. Wie in den

Kontrolltieren konnte eine starke Expression von POMC im Zwischenlappen und in wenigen kortikotropen Zellen in der Adenohypophyse detektiert werden. Die Zahl der somatotropen Zellen war in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse deutlich reduziert und auch die GH Transkriptspiegel waren niedriger als in den Kontrollen. Im Vergleich zu Wildtyptieren konnten in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Tiere nur extrem wenige laktotrope Zellen nachgewiesen werden.

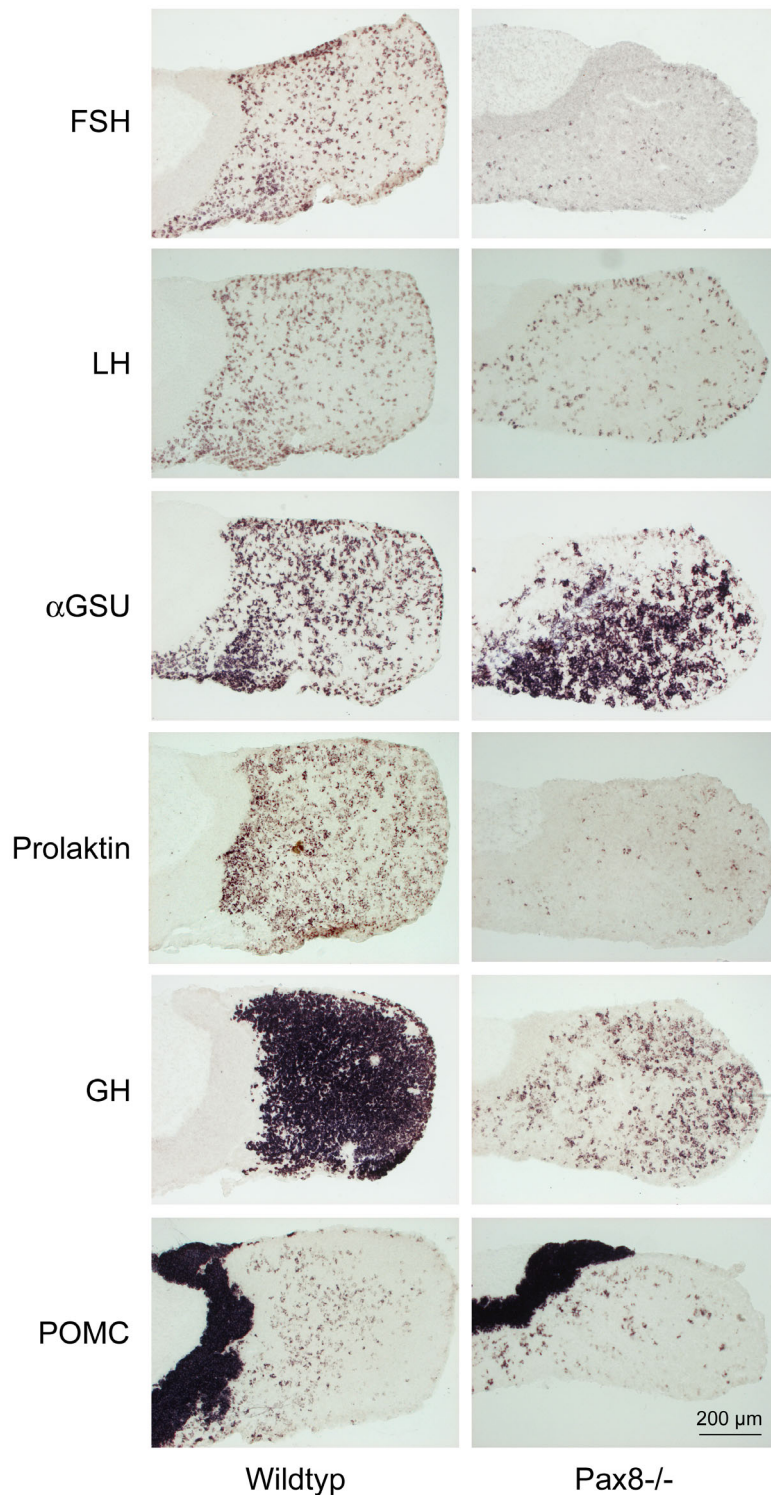


Abb. 18: Bestimmung der mRNA-Verteilung der Hypophysenhormone in 21 Tage alten Wildtypieren und Pax8^{-/-} Mäusen mittels *in situ* Hybridisierung. Dargestellt sind Hellfeldaufnahmen der Hybridisierung von Hypophysenschnitten (16 μm) mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden für die verschiedenen Hypophysenhormone. Zur Kontrolle der Spezifität der Signale wurden parallel *in situ* Hybridisierungen mit sense-Sonden durchgeführt. Diese zeigten kein Signal (nicht gezeigt).

Immunhistochemische Untersuchung

Um zu untersuchen, ob sich die Veränderungen der mRNA-Expression der Hypophysenhormone in den Pax8^{-/-} Mäusen auch auf Proteinebene nachweisen lassen, wurde eine immunhistochemische Analyse durchgeführt (Abb. 19).

Die Zahl der TSH immunpositiven Zellen in der Hypophyse von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren ist stark erhöht. Die Zahl der gonadotropen Zellen, die LH und FSH exprimieren, ist hingegen deutlich niedriger als in den Kontrolltieren. Wie schon auf mRNA-Ebene gezeigt, waren auch in der immunhistochemischen Analyse keine Veränderungen in der Population der kortikotropen Zellen der Adenohypophyse zu erkennen. Die Anzahl an laktotropen und somatotropen Zellen in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse war im Vergleich zu den Kontrolltieren sehr viel niedriger.

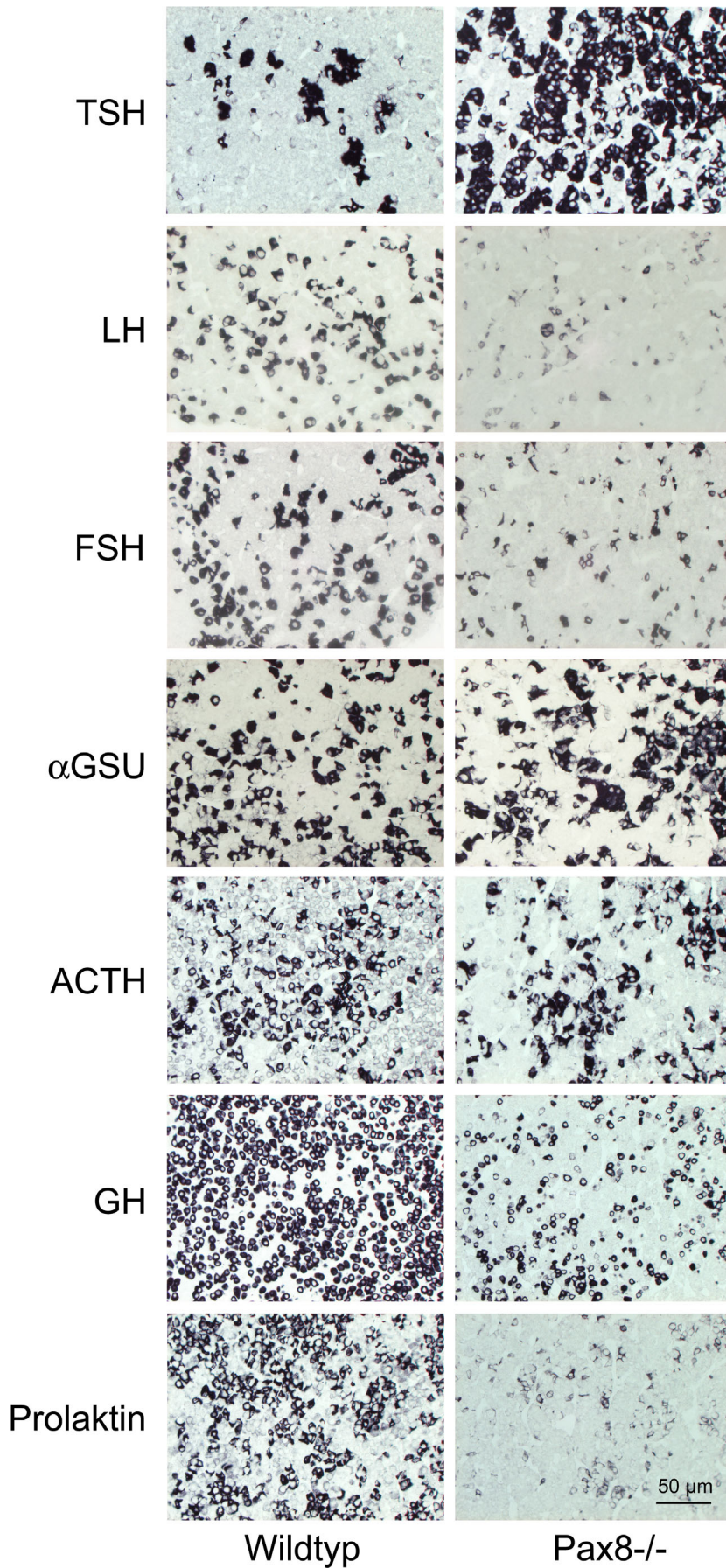


Abb. 19: Immunhistochemische Darstellung der verschiedenen hormonproduzierenden Zellen in der Hypophyse von Pax8^{-/-} und Wildtypieren. Die Hypophysen von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen und Wildtypieren wurden präpariert und in Bouin-Hollande Lösung fixiert. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Serumwerte der Hypophysenhormone

Um den Effekt des Hypothyreodismus auf die Hypophysenhormonkonzentrationen zu bestimmen, wurden Blutseren von 21 Tage alten Pax8^{-/-}, Pax8^{+/-} und Pax8^{+/+} Tieren analysiert (Tab. 3).

	Pax8 Genotyp		
	-/-	+/-	+/+
TSH	19652 ± 3316	141 ± 28	162 ± 27
FSH	n.d.	19,8 ± 7,7	21,2 ± 4,7
LH	n.d.	n.d.	n.d.
αGSU	23,2 ± 5,9	2,3 ± 0,5	1,6 ± 0,5
GH	n.d.	n.d.	n.d.
Prolaktin	n.d.	6,5 ± 3,1	6,8 ± 2,2

Tab. 3: Serumkonzentrationen der Hypophysenhormone in 21 Tage alten Pax8^{-/-}, Pax8^{+/-} und Pax8^{+/+} Mäusen. Die Werte sind angegeben in ng/ml Serum und repräsentieren den Mittelwert ± die Standardabweichung von mindestens 5 unabhängigen Messungen; n.d., nicht detektierbar.

Keine signifikanten Unterschiede wurden zwischen Heterozygoten und Wildtypen beobachtet. In Pax8^{-/-} Mäusen war die TSH-Serumkonzentration (19652 ± 3316 ng/ml) zwei Größenordnungen höher als in den Wildtypen (162 ± 27 ng/ml). In den Wildtypen war die FSH-Konzentration 21,2 ± 4,7 ng/ml, während in den Pax8^{-/-} Tieren kein FSH nachgewiesen werden konnte. Die Werte für LH waren in allen untersuchten Proben unter der Detektionsgrenze. Der Serumgehalt an αGSU war in den Pax8^{-/-} Mäusen (23,2 ± 5,9 ng/ml) im Vergleich zu den Kontrolltieren (1,6 ± 0,5 ng/ml) etwa zehnfach erhöht. Die Prolaktin-Konzentration in den Seren der Wildtypen war 6,8 ± 2,2 ng/ml. Im Serum von Pax8^{-/-} Tieren konnte hingegen kein Prolaktin nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der Literatur (Ramos et al. 1998 und Liu und LeRoith 1999) waren die Werte für GH in 21 Tage alten Tieren extrem niedrig. Auf Grund dieser niedrigen Werte und der pulsilen Ausschüttung konnten keine verlässlichen Angaben zu den GH-Werten gemacht werden.

In situ Analyse der Hypophysenhormonexpression in T4 substituierten Pax8^{-/-} Mäusen

Um einen besseren Einblick in die postnatale Regulation der Expression der Hypophysenhormone und den Einfluß von Schilddrüsenhormon auf die Differenzierung der hormonproduzierenden Zellen der Hypophyse zu erlangen, wurden Pax8^{-/-} Mäuse über verschiedene Zeitperioden mit T4 und/oder Estradiol behandelt und die mRNA-Expression der Hypophysenhormone an Tag 21 analysiert (Abb. 20 und Abb. 21).

Eine tägliche Injektion der Pax8^{-/-} Tiere mit einer physiologischen Dosis T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 bewirkte eine Normalisierung der Expression nicht nur von TSH, GH und Prolaktin (Abb. 21) sondern auch der anderen Hormonen der Adenohypophyse (Abb. 20).

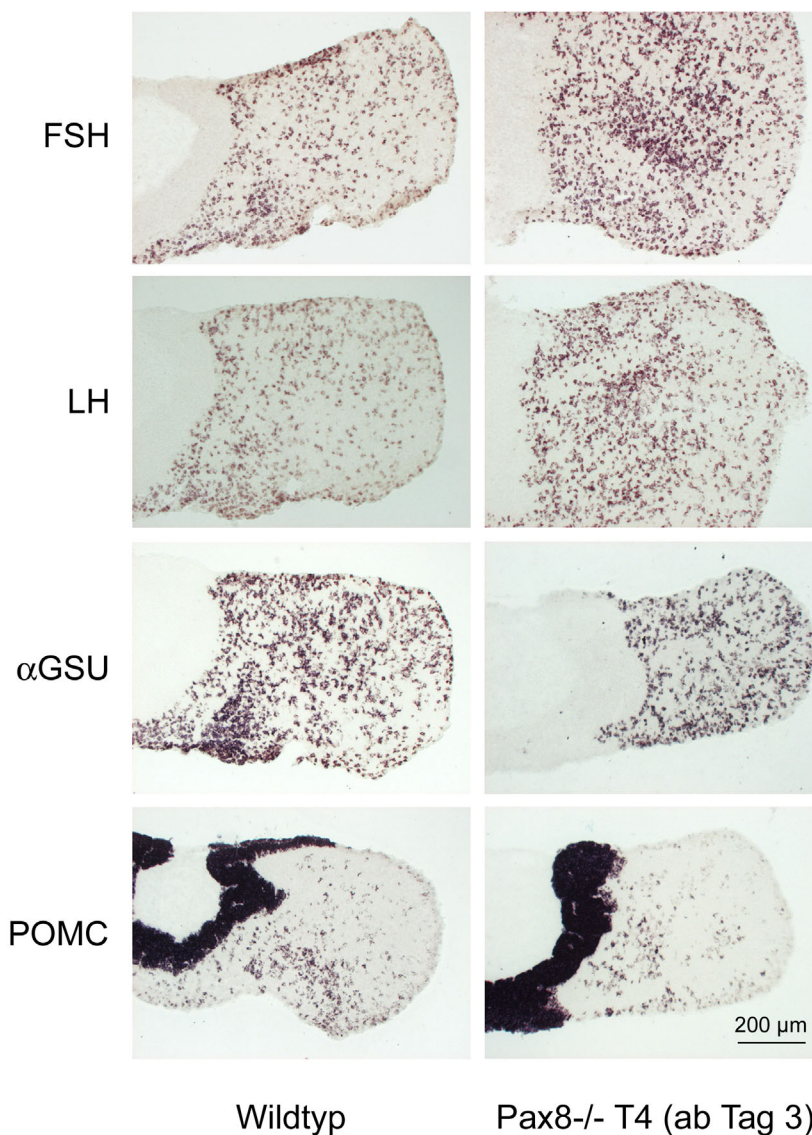


Abb. 20: Histochemische Analyse mittels der *in situ* Hybridisierungstechnik zur mRNA-Verteilung von β-FSH, βLH, αGSU und POMC in 21 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen, die von Tag 3 an täglich mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) behandelt wurden. Dargestellt sind Hellfeldaufnahmen der Hybridisierung von Hypophysenschnitten (16 μm) mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden für die verschiedenen Hypophysenhormone. Zur Kontrolle des Spezifität der Signale wurden parallel *in situ* Hybridisierungen mit sense-Sonden durchgeführt. Diese zeigten kein Signal (nicht gezeigt).

Eine tägliche Substitution der Pax8^{-/-} Mäuse mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 bzw. von Tag 15 bis Tag 20 hatte zur Folge, daß die TSH Expression an Tag 21 etwas niedriger war als in den Kontrolltieren. Eine Substitution mit der selben Dosis für drei Tage (von Tag 18 bis Tag 20) führte hingegen zu einer Normalisierung der TSH Transkriptspiegel (Abb. 20). Eine dem Wildtyp entsprechende Expression von GH konnte in den Pax8^{-/-} Tieren sowohl durch eine Kurzzeit-Gabe von T4 (20 ng/g Körpergewicht) für 3 (Tag 18 bis 20) oder 6 Tage (Tag 15 bis 20) als auch durch eine dauerhafte Gabe von Tag 3 bis 20 wieder hergestellt werden (Abb. 21). Im Gegensatz dazu konnte die Prolaktin Expression in den Pax8^{-/-} Tieren durch eine kurzzeitige Gabe (3 bzw. 6 Tage) von T4 nicht normalisiert werden. Eine Behandlung mit T4 für 6 Tage führte zwar zu einer leichten Erhöhung der Anzahl laktotroper Zellen, aber eine vollständige Wiederherstellung wurde nur durch eine T4 Substitution von Tag 3 an erreicht (Abb. 21).

Eine dreitägige Behandlung von Pax8^{-/-} Mäusen mit Estradiol (5 ng/g Körpergewicht) hatte weder einen Einfluß auf die Prolaktin-Expression selbst noch auf die Zahl der laktotropen Zellen (nicht gezeigt), während die Injektion einer höheren Dosis (100 ng/g Körpergewicht) für den gleichen Zeitraum zu einer Erhöhung der mRNA-Expression nicht aber der Zahl der laktotropen Zellen führte (Abb. 20). Die kombinierte Behandlung von Pax8^{-/-} Tieren mit T4 von Tag 15 an (6 Tage) und Estradiol von Tag 18 (3 Tage) hatte ebenfalls eine leichte Erhöhung der Zahl laktotroper Zellen zur Folge, die schon bei der 6tägigen Behandlung mit T4 allein beobachtet wurde (Abb. 21). Die Gabe von Estradiol hatte keinen Einfluß auf die Expression von TSH oder GH (Abb.21).

Zu Abb. 21: Bestimmung der mRNA-Verteilung der Hypophysenhormone TSH, GH und Prolaktin in 21 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen sowie Pax8^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit T4 und/oder Estradiol für verschiedene Zeiten. Dargestellt sind Hellfeldaufnahmen der Hybridisierung von Hypophysenschnitten (16 µm) mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden für TSH, GH und Prolaktin. Zur Kontrolle der Spezifität der Signale wurden parallel *in situ* Hybridisierungen mit sense-Sonden durchgeführt. Diese zeigten kein Signal (nicht gezeigt). Die Tiere wurden mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis 20 (Pax8^{-/-} T4 (d3-d20)), Tag 15 bis 20 (Pax8^{-/-} T4 (d15-d20)) oder Tag 18 bis 20 (Pax8^{-/-} T4 (d18-d20)) oder mit Estradiol (100 ng/g Körpergewicht) von Tag 18 bis 20 (Pax8^{-/-} E2 (d18-d20)) bzw mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 15 bis 20 und Estradiol (100 ng/g Körpergewicht) von Tag 18 bis 20 (Pax8^{-/-} T4 (d15-d20), E2 (d18-d20)) behandelt und 24 Stunden nach der letzten Injektion getötet. Zum Vergleich sind Hypophysen von Wildtyptieren und unbehandelten Pax8^{-/-} Mäusen gezeigt.

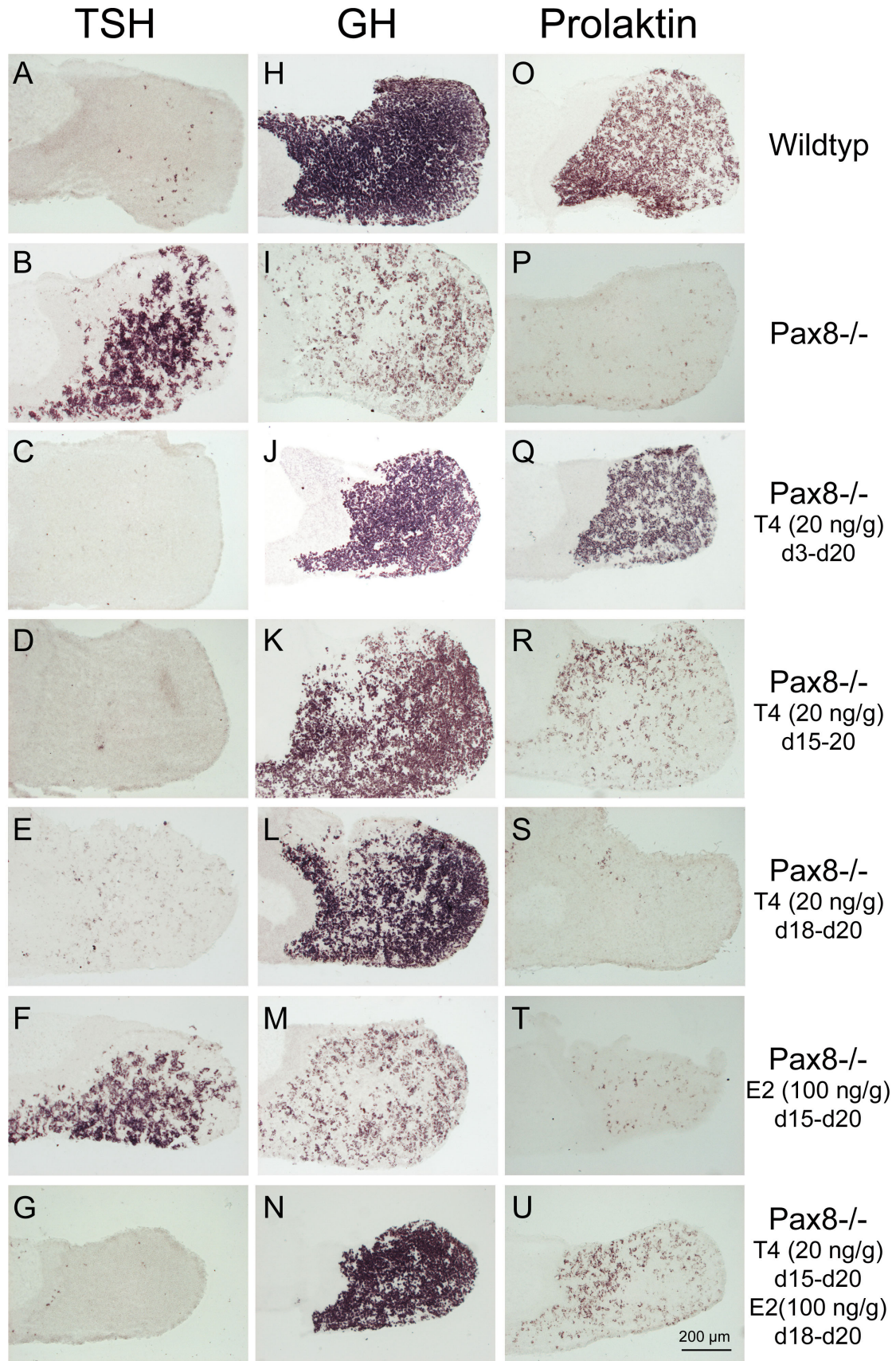


Abb. 21: Bestimmung der mRNA-Verteilung der Hypophysenhormone TSH, GH und Prolaktin in 21 Tage alten Wildtypieren und Pax8^{-/-} Mäusen sowie Pax8^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit T4 und/oder Estradiol für verschiedene Zeiten (siehe Zusatzlegende auf der vorherigen Seite).

Immunhistochemische Analyse zur Entwicklung der hypophysären Hormonexpression

Um zu untersuchen, ob die an Tag 21 beobachteten Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der Adenohypophyse sich erst im Verlauf der postnatalen Entwicklung ausbilden oder schon kurz nach der Geburt zu beobachten sind, wurde eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Zunächst wurde die Expression von TSH, GH und Prolaktin in 3 Tage alten Wildtyp und Pax8^{-/-} Mäusen untersucht (Abb. 22).

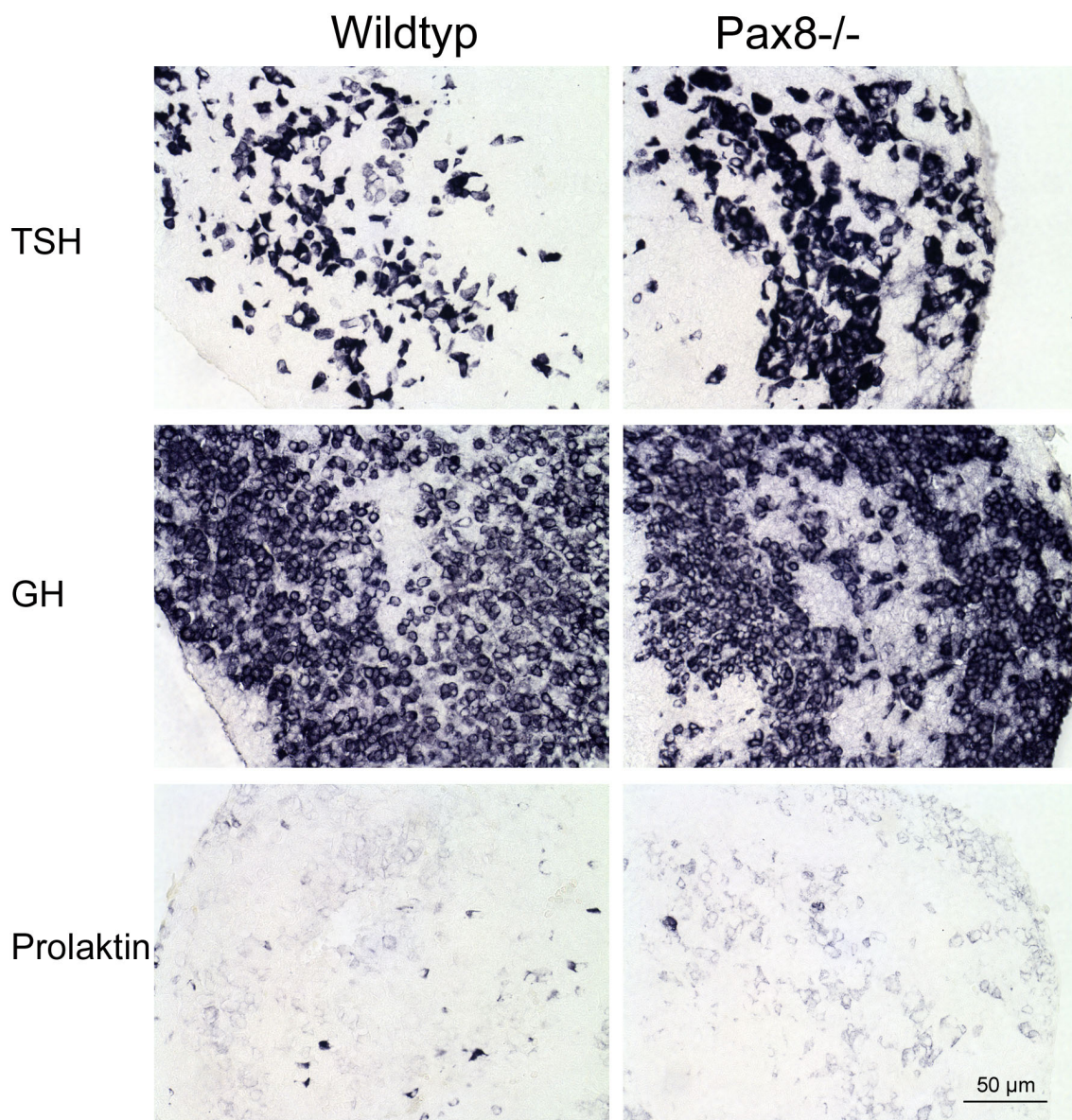


Abb. 22: Immunhistochemische Darstellung der TSH, GH und Prolaktin produzierenden Zellen in der Hypophyse von 3 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen und Wildtyptieren. Die Hypophysen von 3 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen und Wildtyptieren wurden präpariert und in Bouin-Hollande Lösung fixiert. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Für die weiteren Untersuchungen wurden 9 Tage alte Wildtyptiere und Pax8^{-/-} bzw. T4 behandelte (20 ng/g Körpergewicht von Tag 6 bis Tag 8) Pax8^{-/-} Mäuse analysiert (Abb. 23).

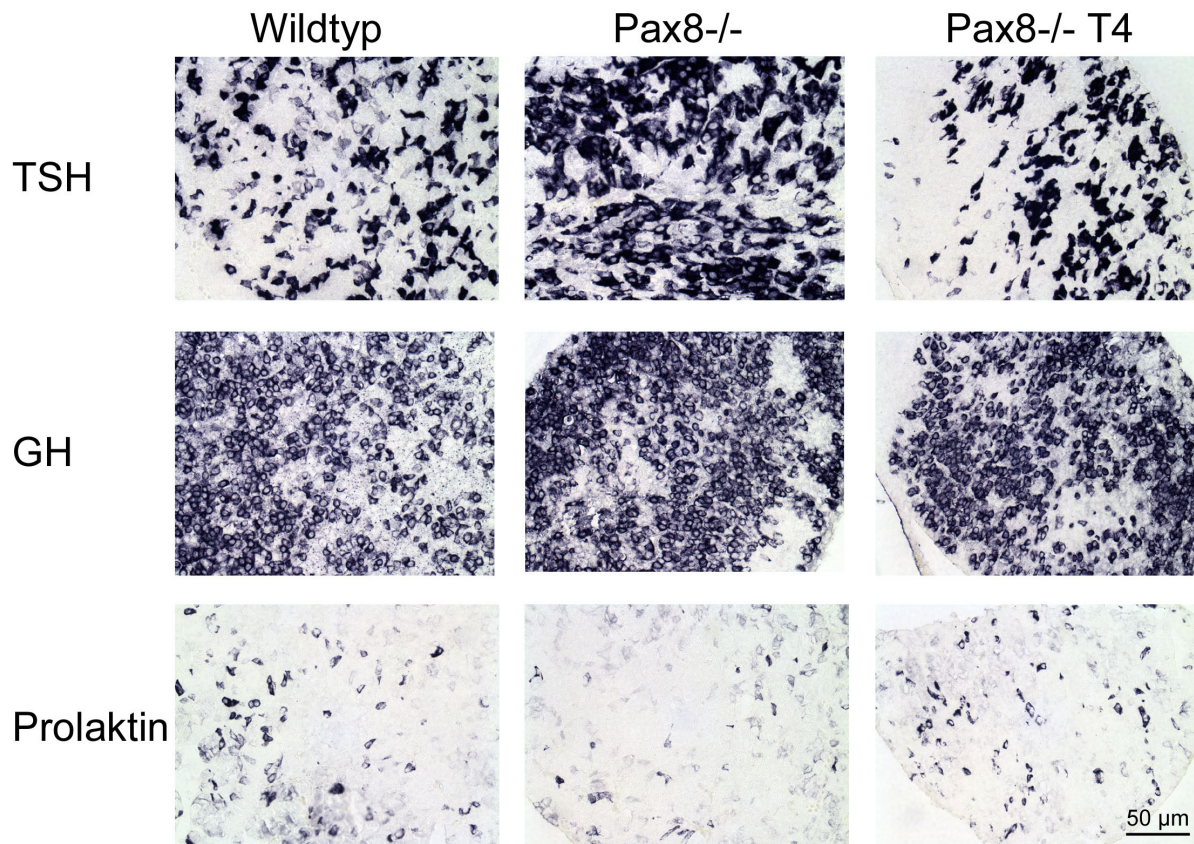


Abb. 23: Bestimmung der Verteilung der TSH, GH und Prolaktin produzierenden Zellen in der Hypophyse von 9 Tage alten Wildtyptieren und Pax8^{-/-} Mäusen, sowie 9 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen die von Tag 6 bis Tag 8 mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) behandelt wurden (Pax8^{-/-} T4). Die Hypophysen der Tiere wurden präpariert und in Bouin-Hollande Lösung fixiert. Der Immunhistochemische Nachweis erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

Im Vergleich zum Wildtyp war in den Hypophysen der 3 Tage alten Pax8^{-/-} Mäuse bereits eine deutliche Hypertrophie der thyrotropen Zellen festzustellen.(Abb. 22).

In den Wildtyptieren veränderte sich die Anzahl der TSH-immunpositiven Zellen von Tag 3 bis Tag 9 kaum. Im Gegensatz dazu kam es an Tag 9 in den Pax8^{-/-} Mäusen zu einem massiven Anstieg der Zahl thyrotroper Zellen. Die schon an Tag 3 beobachtete Hypertrophie der thyrotropen Zellen war in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse noch verstärkt. Eine tägliche Substitution der Pax8^{-/-} Mäuse von Tag 6 bis Tag 8 führte sowohl zu einem Rückgang der Anzahl der TSH exprimierenden Zellen als auch zu einer abgeschwächten Hypertrophie der thyrotropen Zellen (Abb. 23).

Weder an Tag 3 (Abb. 22) noch an Tag 9 (Abb.23) war ein Unterschied in der somatotropen Zellpopulation zwischen dem Wildtyp und den Pax8^{-/-} Mäusen festzustellen. Die tägliche

Substitution der Pax8^{-/-} Tiere mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 6 bis Tag 8 hatte keine Auswirkung auf die Anzahl der GH-immunpositiven Zellen in den Hypophysen der 9 Tage alten Tiere (Abb. 23).

Die Expression von Prolaktin in den Hypophysen der 3 Tage alten Mäuse war sehr niedrig. Es konnte kein Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Pax8^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Abb. 22). Im Wildtyp nahm die Zahl der Prolaktin-immunpositiven Zellen an Tag 9 deutlich zu, während in den Pax8^{-/-} Tieren wie schon an Tag 3 kaum laktotrope Zellen nachgewiesen werden konnten. Die tägliche Behandlung (von Tag 6 bis Tag 8) der Tiere mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) führte in den 9 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen zu einer Normalisierung der Anzahl laktotroper Zellen.

IGF Expression in der Leber

Um zu untersuchen, ob der Hypothyreoidismus und die damit verbundene Abnahme an GH einen Einfluß hat auf die Expression von IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), ALS (*acid labile subunit*) und IGFBP-3 (*IGF-binding protein-3*), die im Blut einen ternären Komplex bilden, wurde die mRNA-Expression dieser drei Gene in der Leber untersucht (Abb. 24).

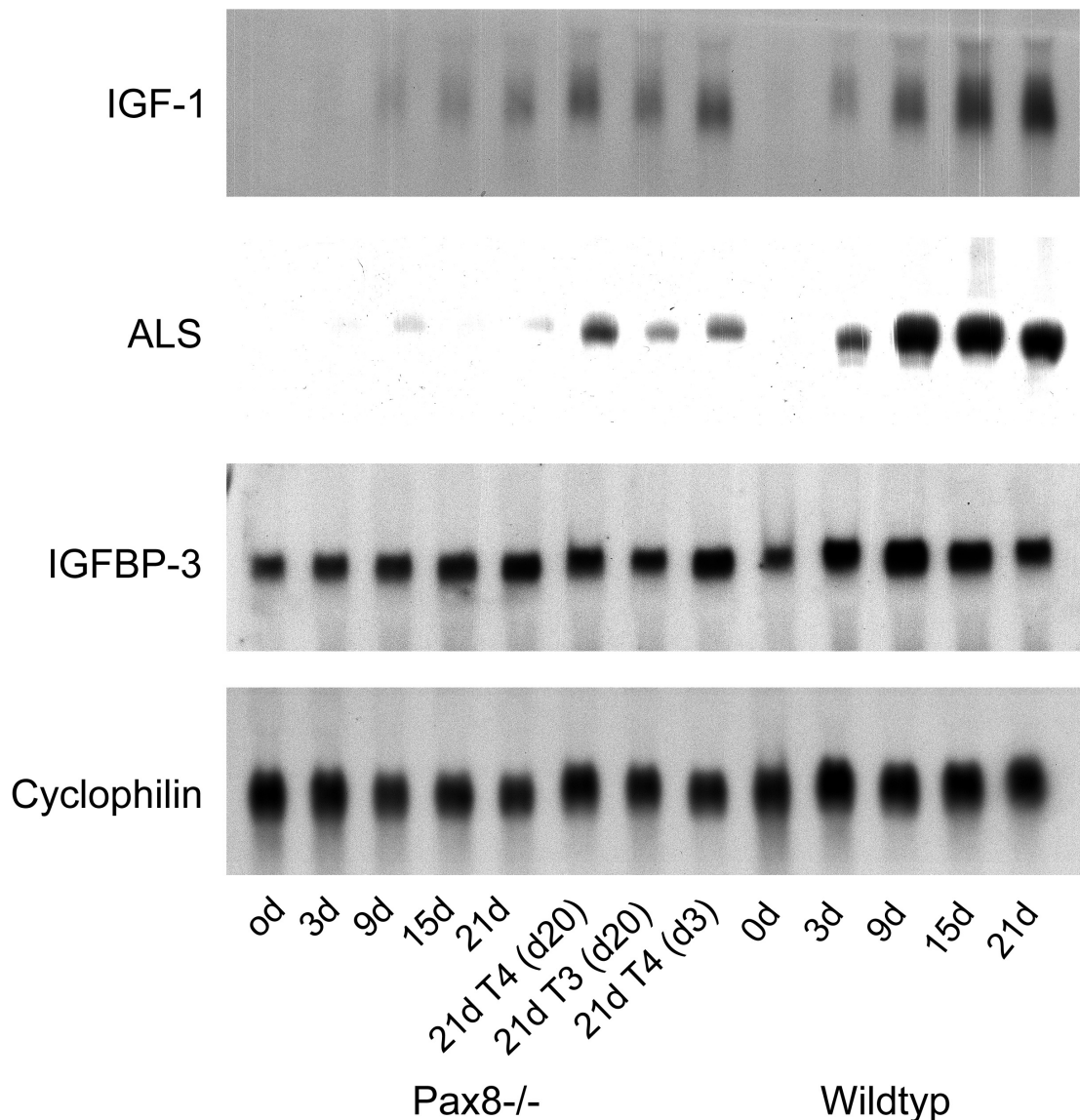


Abb. 24: mRNA-Expression der am ternären IGF-Serumkomplex beteiligten Proteine IGF-1, IGFBP-3 und ALS in der Leber von Wildtyp-Tieren und Pax8^{-/-} Mäusen während der postnatalen Entwicklung und nach Behandlung von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 bzw. T3 für 24h sowie Pax8^{-/-} Tieren, die von Tag 3 bis Tag 20 mit T4 behandelt wurden. Isoliert wurde die Gesamt-RNA aus Lebern von Wildtyp und Pax8^{-/-} Mäusen sowie von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Tieren, die von Tag 3 bis 20 täglich mit T4 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d3)) oder an Tag 20 mit T4 (200 ng/g Körpergewicht; 21d T4 (d20)) bzw. T3 (20 ng/g Körpergewicht; 21d T3 (d20)) behandelt wurden. Pro Gruppe wurde das Gewebe von 3-5 Tieren gepoolt. Wie unter Material und Methoden beschrieben erfolgte die Northern-Blot Analyse mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten, spezifisch für IGF-1, IGFBP-3 und ALS. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung mit mRNA und des Transfers auf die Membran erfolgte eine Hybridisierung mit Cyclophilin.

Sowohl in den Pax8^{-/-} Mäusen als auch in den Kontrolltieren kam es zu einem postnatalen Anstieg der Expression von IGF-1. Die Transkriptspiegel in den Wildtyp-Tieren waren aber an allen untersuchten Zeitpunkten deutlich höher als in den Pax8^{-/-} Tieren. Die mRNA-Expression von ALS stieg in den Kontrolltieren von der Geburt bis Tag 9 an und blieb dann bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt (Tag 21) konstant. In den Pax8^{-/-} Mäusen konnte nahezu kein ALS Transkript nachgewiesen werden. Die Expression von IGFBP-3 war von der Geburt bis zum Tag 21 konstant und zeigte keinen Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Pax8^{-/-} Tieren.

Eine Behandlung von 20 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen mit T4 (200 ng/g Körpergewicht) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht) führte innerhalb von 24 Stunden zu einer Zunahme sowohl der mRNA-Expression von IGF-1 als auch von ALS, wobei die mRNA-Level immer noch deutlich unter denen lagen, die in den Kontrolltieren beobachtet wurden. Eine tägliche Injektion der Pax8^{-/-} Tiere mit einer physiologischen Dosis T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 führte zwar zu einem Anstieg der mRNA-Expression an Tag 21, war aber ebenfalls nicht ausreichend, um die Expression wieder auf das Wildtyp-Niveau zu erhöhen.

Diskussion

Wachstumverzögerung und Schilddrüsenhormonstatus

Eine normale Funktion der Schilddrüse ist essentiell für Entwicklung, Wachstum und die Homeostase des Stoffwechsels. Die Aufrechterhaltung eines euthyroiden Zustands setzt unter anderem eine normal entwickelte Schilddrüse, ein funktionierendes System zur Schilddrüsenhormonsynthese sowie –signalverarbeitung und eine ausreichende Versorgung mit Iod voraus. In Europa wird kongenitaler Hypothyreoidismus bei 1:3600 Neugeborenen diagnostiziert. Er führt, wenn er nicht direkt nach der Geburt durch Schilddrüsenhormonsubstitution behandelt wird, zu Kretinismus, einem Syndrom, das unter anderem durch eine retardierte Entwicklung und multiple Störungen der ZNS-Funktion charakterisiert ist (Porterfield und Hendrich 1993).

Kongenitaler Hypothyreoidismus wird beim Menschen in 20% der Fälle durch Defekte in der Schilddrüsenhormonsynthese und -signalverarbeitung und in 80% der Fälle durch Defekte in der Entwicklung der Schilddrüse (Dysgenese) verursacht. In etwa 20% der Individuen mit kongenitalem Hypothyreoidismus entwickelt sich überhaupt keine Schilddrüse (Agenese) (Krude et al. 2000 und Kopp et al. 2002). Dysgenese und Agenese der Schilddrüse werden vor allem durch Mutationen verschiedener Transkriptionsfaktoren unter anderem von Pax8 verursacht (Macchia et al. 1998). In dieser Arbeit wurde die Pax8^{-/-} Maus als Modell verwendet, um den Effekt des kongenitalen Hypothyreoidismus zu untersuchen: Im Gegensatz zu anderen Tiermodellen, bei denen der Hypothyreoidismus operativ oder pharmakologisch hervorgerufen wird, hat die Pax8^{-/-} Maus verschiedene Vorteile.

Eine Thyreoektomie ist sehr aufwendig (vor allem bei neugeborenen Mäusen), da die Nebenschilddrüsen erhalten bleiben müssen, und gelingt praktisch nie vollständig. Dies führt dazu, daß die Schilddrüsenhormonkonzentrationen in diesen Tieren zwar sehr niedrig sind, durch das verbliebene Schilddrüsengewebe aber weiter Schilddrüsenhormone synthetisiert werden können. Eine operative Entfernung ist darüber hinaus erst postnatal möglich.

Auch bei einer Behandlung mit Thyreostatika wie z.B. PTU (Propylthiouracil) oder MMI (1-Methyl-2-Mercapto-Imidazol) sind noch sehr niedrige, biologisch wirksame Schilddrüsenhormonkonzentrationen vorhanden (Samuels et al. 1989). Durch die Behandlung mit Thyreostatika kann darüber hinaus kein Hypothyreoidismus bei Föten induziert werden ohne auch die Mutter hypothyroid zu machen. Es ist daher nicht möglich zu unterscheiden, ob die beobachteten Effekte auf den Hypothyreoidismus der Mutter oder den der Nachkommen

zurückzuführen sind. Darüber hinaus führt die Behandlung mit PTU und MMI zu Nebenwirkungen, die die Ergebnisse beeinflussen könnten.

Eine weitere Möglichkeit, Hypothyreodismus zu induzieren, ist die Zerstörung der Schilddrüse durch eine Radioiodtherapie (Franklyn et al. 1985). Auch diese geht aber mit erheblichen Nebenwirkungen einher. Eine gleichzeitige Bestrahlung des benachbarten Thymus z.B. hat eine Schädigung des sich entwickelnden Immunsystems zur Folge.

Im Gegensatz zu allen diesen Modellen muß bei der Pax8^{-/-} Maus keine externe Manipulation erfolgen. Behandlungsbedingte Nebenwirkungen sind daher ausgeschlossen. Der Schilddrüsenhormonstatus der Pax8^{+/-} Mütter ist normal, während durch die Deletion des Pax8-Gens die Schilddrüsenhormon-produzierenden Thyrozyten in den Pax8^{-/-} Mäusen nicht angelegt werden (Mansouri et al. 1998). Anders als bei den anderen Tiermodellen ist die Gefahr einer Schilddrüsenhormon-Restaktivität daher ausgeschlossen. Die Pax8^{-/-} Maus stellt damit das ideale Modellsystem dar, um den klinischen Fall eines athyroiden Organismus mit einer euthyroiden Mutter zu untersuchen.

Der Athyreodismus der unbehandelten Pax8^{-/-} Mäuse hat zur Folge, daß die Tiere äußerst selten länger als drei Wochen überleben. Eine tägliche Substitution der Pax8^{-/-} Mäuse mit einer physiologischen Dosis T4 von der Geburt an führt dazu, daß die postnatale Entwicklung ähnlich verläuft wie bei den Wildtyptieren. Die adulten substituierten Pax8^{-/-} Tiere sind nicht von Kontrolltieren zu unterscheiden und haben eine normale Lebenserwartung. Daher kann man davon ausgehen, daß es sich bei den durch die Deletion des Pax8 Gens verursachten Veränderungen, um Effekte handelt, die durch den Athyreodismus und nicht direkt durch das Fehlen des Pax8 Gens selbst verursacht wurden.

Bei den Pax8^{-/-} Mäusen ist nicht nur das postnatale Wachstum verzögert, sie werden auch mit einem niedrigeren Gewicht als ihre Wildtypgeschwister geboren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß in den Pax8^{-/-} Mäusen die Schilddrüsenhormonmengen schon pränatal niedriger sind als in den Kontrolltieren. Dem zu widersprechen scheint die Tatsache, daß auch in den Wildtyptieren am Tag der Geburt T3 und T4 im Serum nicht nachzuweisen sind. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß signifikante Mengen an Schilddrüsenhormon im Gewebe der fötalen Kontrolltiere verfügbar sind. Tatsächlich scheinen die D1 Enzymaktivität und mRNA-Expression in der Leber und der Niere schon direkt nach der Geburt in den Kontrollmäusen höher zu sein als in den Pax8^{-/-} Tieren, was darauf hindeutet, daß die Leber und die Niere in den Wildtyptieren schon pränatal höheren Schilddrüsenhormonkonzentrationen als in den Pax8^{-/-} Föten ausgesetzt sind. Die extrem niedrigen Serumkonzentrationen von T3 und T4 am Tag der Geburt sowohl in den

Kontrolltieren als auch in den Pax8^{-/-} Tieren weisen auf einen geringeren placentalen Transfer dieser Hormone zumindest in den späteren Stadien der Schwangerschaft hin. Reguliert wird der placentale Transfer der Schilddrüsenhormone wahrscheinlich durch die D3 katalysierte Inaktivierung von T₄, bei der rT₃ entsteht (Bianco et al. 2002 und Mortimer et al. 1996). Dieser Abbau von T₄ in der Placenta würde zum einen die sehr niedrigen T₃ und T₄ Werte aber auch die hohen rT₃ Werte in den neugeborenen Mäusen erklären. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu dem prominenten maternal-fötalen Transfer von Schilddrüsenhormonen durch die humane Placenta, der bei Säuglingen mit durch eine Agenesie der Schilddrüse hervorgerufenem kongenitalem Hypothyreoidismus, beobachtet wurde (Morreale de Escobar et al. 2000 und Vulsma et al. 1989). Der nicht erfolgende postnatale Anstieg der T₃- und T₄-Serumkonzentrationen in den Pax8^{-/-} Mäusen läßt weiterhin vermuten, daß bei Mäusen, wie auch beim Menschen nachgewiesen (van Wassenaer et al. 2002), kaum ein Transfer von Schilddrüsenhormonen über die Milch von der Mutter zu den Jungen erfolgt.

Im Gegensatz zu den extrem niedrigen T₃- und T₄-Serumkonzentrationen direkt nach der Geburt, sind die Serumkonzentration von rT₃ sowohl in den Kontrolltieren als auch in den Pax8^{-/-} Mäusen sehr hoch und fallen dann steil ab. Dies deutet darauf hin, daß das rT₃ im Serum der Föten durch IRD von maternalem T₄ in der Placenta und eventuell auch im Uterus entsteht (Bianco et al. 2002 und Roti et al. 1983). Durch den Wegfall der maternalen Versorgung mit T₄ und seinen placentalen Metaboliten, verschwindet rT₃ sehr schnell aus dem Serum der neugeborenen Pax8^{-/-} Mäuse. In den Kontrollmäusen fällt die rT₃-Konzentration nach der Geburt zu Beginn zwar auch ab, dies geschieht aber sehr viel langsamer und durch den postnatalen Anstieg der Schilddrüsenfunktion, der sich auch in den steigenden T₃- und T₄-Konzentrationen widerspiegelt, steigt die rT₃-Serumkonzentration langsam wieder an. Dieser Wiederanstieg von rT₃ im Serum wird wahrscheinlich durch die 5-Deiodierung von T₄ in Geweben mit hoher D3-Aktivität, wie z.B. im Gehirn oder der Haut (Bates et al. 1999, Huang et al. 1985 und 1988), verursacht.

Deiodinasen

Das beobachtete drastisch verminderte Wachstum könnte durch eine reduzierte Nahrungsaufnahme und/oder Nahrungsverwertung verursacht werden. Dies könnte die Schlußfolgerung zulassen, daß die beobachteten Veränderungen in der Expression der Deiodinasen nur indirekt durch das Fehlen von Schilddrüsenhormonen bedingt sind, da schon früher gezeigt werden konnte, daß es beim Fasten und bei lebensbedrohlichen Krankheiten zu Veränderungen des peripheren Schilddrüsenhormonmetabolismus kommt (Docter et al. 1993).

In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, daß die Veränderungen in der postnatalen Expression der Deiodinasen in den Pax8^{-/-} Mäusen durch Gabe von T3 oder T4 sehr schnell rückgängig gemacht werden können. Daher kann man davon ausgehen, daß es sich bei den durch die Deletion des Pax8 Gens verursachten Veränderungen in der Expression der Deiodinasen, um Effekte handelt, die direkt durch den Hypothyreoidismus und nicht durch Hungern bzw. Unterernährung hervorgerufen werden.

Deiodinase Typ 1

Das postnatale Profil der D1-mRNA-Expression und D1-Aktivitäten in der Leber und der Niere der Kontrolltiere verläuft parallel zum postnatalen Anstieg der Serumkonzentrationen von T3 und T4. In den Pax8^{-/-} Mäusen wird der nicht vorhandene Anstieg der T3- und T4-Konzentrationen im Serum von einem nahezu kompletten Verlust der mRNA-Expression und Aktivität von D1 in Niere und Leber begleitet. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Studien zur Regulation der D1-Expression durch den Schilddrüsenhormonstatus in Nagern, die gezeigt haben, daß es sowohl in thyreoektomierten (Escobar-Morreale et al. 1997) als auch in PTU behandelten Ratten (O'Mara et al. 1993) zu einer Abnahme der D1 mRNA-Mengen und Enzymaktivität kommt. Die sehr niedrigen, aber doch nachweisbaren D1-Transkriptspiegel und Enzymaktivitäten in Leber und Niere von 9-15 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen deuten zumindest auf eine geringe Schilddrüsenhormon-unabhängige D1-Expression hin. Substitution der Pax8^{-/-} Mäuse mit relativ niedrigen Dosen von T3 und T4 führt sowohl in der Leber als auch in der Niere innerhalb von 24 Stunden zu einem Anstieg der D1-mRNA-Expression auf ein Niveau, das höher war als in den Kontrolltieren, während die D1-Aktivitäten nur auf etwa 50% der in den Kontrollen gemessenen Werte ansteigt. Dies begründet sich wahrscheinlich durch die Verzögerung der Produktion von funktionellem D1-Protein nach dem hormoninduzierten Anstieg der mRNA-Expression. O'Mara et al. konnten in hypothyroiden Ratten, die mit Schilddrüsenhormon behandelt wurden, zeigen, daß der Anstieg der D1 Enzymaktivität erst 12 Stunden nach der Zunahme der D1 mRNA-Expression beginnt (O'Mara et al. 1993). Die Korrelation zwischen den hepatischen und renalen D1 Transkriptspiegeln und den D1 Enzymaktivitäten während der postnatalen Entwicklung in den Kontrollmäusen sowie in den Pax8^{-/-} Mäusen nach T3 oder T4 Behandlung läßt vermuten, daß die Expression der D1 hauptsächlich auf prätranslationeller Ebene reguliert wird. In Übereinstimmung mit der Identifikation von TR-bindenden responsiven Elementen (TRE) im Promotor (Toyada et al., Jakobs et al. 1997 und Zhang et al. 1998) des D1 Gens

weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, daß die Regulation durch Schilddrüsenhormone vor allem durch T3 auf der Ebene der Transkription erfolgt.

Deiodinase Typ 2

Die cerebrale Enzymaktivität der D2 ist zu allen untersuchten Zeitpunkten in den Pax8^{-/-}-Mäusen sehr viel höher als in den euthyroiden Kontrolltieren. Eine Erhöhung der D2-Transkriptlevel im Vergleich zu den Wildtyptieren konnte in den Pax8^{-/-}-Tieren hingegen nur an Tag 21 festgestellt werden. Anscheinend erfolgt vor diesem Zeitpunkt die Regulation der D2 durch Schilddrüsenhormone vorwiegend auf translationeller oder posttranslationeller Ebene. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen vor allem in Ratten überein, die gezeigt haben, daß im Gehirn und der Hypophyse die negative Kontrolle der D2-Expression durch Schilddrüsenhormone zwei verschiedene Mechanismen beinhaltet (Bianco et al. 2002). Zum einen erfolgt eine Schilddrüsenhormon-abhängige Verminderung der mRNA-Expression, die wahrscheinlich über die nukleären Schilddrüsenhormonrezeptoren vermittelt wird (Burmeister et al. 1997 und Halperin et al. 1994). Dabei konnte bisher nicht geklärt werden, ob die Unterdrückung der Transkription des D2-Gens durch die Bindung von T3-Schilddrüsenrezeptoren an ein negatives TRE im Promotor des Gens verursacht wird. Den zweiten und wahrscheinlich entscheidenderen Mechanismus zur Regulation der D2 stellt die substratinduzierte Inaktivierung des Enzyms durch T4 und rT3 dar. Das Produkt T3 hat im Vergleich dazu ein viel geringeres inhibitorisches Potential (Köhrle 1999). In Gliazellen der Ratte konnte gezeigt werden, daß die Verminderung der D2 Enzymaktivität durch T4 und rT3 durch die Internalisierung von Plasmamembran-gebundenem D2-Protein vermittelt wird (Leonard et al. 1997, Farwell et al. 1996 und Stachelek et al. 2000). In Hypophysenzellen und Zellen, die mit D2-cDNA transfiziert wurden, konnte nachgewiesen werden, daß die Modifizierung durch Ubiquitin und damit der Abbau über das Proteasom an der Substrat-induzierten Inaktivierung der D2 beteiligt ist (Steinsapir et al. 1998 und 1999, Gereben et al. 2000). Der exakte molekulare Mechanismus der durch T4 und rT3 induzierten Transformation des D2-Proteins, der zum Abbau des Enzyms führt, ist aber noch nicht bekannt.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit früheren Studien in Ratten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die cerebrale D2-Expression ihr Maximum in der postnatalen Phase hat (Bates et al. 1999, Kaplan und Yaskoski 1981 und Obregon et al. 1991). Die D2-Enzymaktivität erreichte ihr Maximum an Tag 15, wobei sie in den Pax8^{-/-}-Mäusen etwa zehnmal so hoch war wie in den Kontrolltieren. Schon am Tag der Geburt konnte ein signifikanter Unterschied

in den D2-Aktivitäten zwischen den Pax8^{-/-} Tieren und den Kontrollmäusen beobachtet werden, obwohl die Enzymaktivitäten sehr niedrig waren. Vermutlich werden diese Veränderungen durch kleine Unterschiede in der Konzentration der Schilddrüsenhormone im Gehirn während der perinatalen Periode verursacht. Bei der Geburt scheint rT3 das dominante Schilddrüsenhormon im Serum zu sein. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen aber keine Rückschlüsse darauf zu, ob mögliche Unterschiede in der rT3-Konzentration zwischen neugeborenen Pax8^{-/-} Mäusen und Kontrollmäusen mit einer unterschiedlich starken Inaktivierung der D2 einhergehen.

In der Hypophyse von 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen waren ebenfalls sowohl die Transkriptspiegel als auch die Enzymaktivitäten der D2 höher als in den Kontrolltieren. Die genaue physiologische Funktion der D2 in der Hypophyse ist bisher noch nicht geklärt. Einige Studien haben Hinweise darauf geliefert, daß die lokale Umwandlung von T4 zu T3 durch die D2 in der Hypophyse an der negativen Rückkopplungsregulation der TSH-Sekretion durch Schilddrüsenhormone beteiligt ist (Larsen 1982). Die beschriebene negative Regulation der D2 durch Schilddrüsenhormone würde allerdings Änderungen in der intrazellulären T3-Konzentration, verursacht durch eine veränderte Schilddrüsenaktivität, in den thyrotropen Zellen dämpfen und damit in eine adäquate *Feedback*-Kontrolle der TSH-Sekretion eingreifen. D2 wird auch in den anderen Hypophysenzellen unter anderem den laktotropen, somatotropen und gonadotropen Zellen expremiert, deren Funktion ebenfalls von der lokalen Umwandlung von T4 in T3 abhängig ist (Tannahill et al. 2002). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, kommt es in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse zu einer dramatischen Abnahme der Prolaktin-, GH- und Gonadotropin-expremierenden Zellen. Gleichzeitig kommt es zu einer drastischen Zunahme der thyrotropen Zellen. Dies läßt vermuten, daß in der Hypophyse der Pax8^{-/-} Tiere die D2 vor allem auf den thyrotropen Zellen lokalisiert ist und der Anstieg der D2-Expression durch die Zunahme dieser Zellen zustande kommt. In zukünftigen Experimenten sollte diese Frage durch Koloalisationsstudien der Hypophysenhormone mit der D2-Expression aufgeklärt werden.

Deiodinase Typ 3

In den Gehirnen der neonatalen Tiere wurden die höchsten D3-mRNA-Level und Enzymaktivitäten in den ersten drei Tagen nach der Geburt gemessen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien zur Entwicklung der D3-Aktivität im Gehirn von Ratten, die gezeigt haben, daß die höchste cerebrale D3-Aktivität im Fötus vorhanden ist (Bates et al. 1999, Huang et al. 1988 und Kaplan und Yaskoski 1981). Der relativ starken

Expression um die Geburt herum folgte ein moderater Abfall sowohl der mRNA-Level als auch der Enzymaktivität bis Tag 15. Innerhalb der ersten Tage nach der Geburt konnte kein Unterschied in der D3-Expression zwischen den Pax8^{-/-} Mäusen und den Kontrolltieren beobachtet werden, an Tag 15 und 21 hingegen waren sowohl die D3-Transskriptspiegel als auch die Enzymaktivitäten in den Pax8^{-/-} Tieren niedriger als in den Kontrollen. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen aus früheren Studien überein, in denen ebenfalls eine positive Kontrolle der D3-Expression durch Schilddrüsenhormone gezeigt werden konnte (Tu et al. 1999 und Esferandi et al. 1992). Die Entwicklung des D3-Aktivitätsprofils läuft in beiden Versuchsgruppen parallel zu den Veränderungen der mRNA-Level. Dieser parallele Verlauf läßt vermuten, daß im Gehirn die Regulation der D3-Expression vorwiegend auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Der genaue Mechanismus der Schilddrüsenhormon-abhängigen Regulation der D3-Expression im Gehirn ist aber noch nicht endgültig geklärt. Die Expression der D3 unterliegt nicht in allen Geweben einer Kontrolle durch Schilddrüsenhormone. Eine Ausnahme bildet unter anderem die Placenta (Emerson et al. 1988 und Koopdonk-Kool et al. 1996). Die physiologische Funktion der hohen D3-Enzymaktivitäten in der Placenta, dem Uterus Schwangerer und verschiedenen fötalen Geweben ist ebenfalls noch nicht vollständig verstanden. Es wird aber vermutet, daß sie dazu dient, die wachsenden Gewebe vor zu hohen T3-Konzentrationen zu schützen bis das aktive Hormon für die Induktion der Differenzierung benötigt wird.

Hypophyse

Die Adenohypophyse steuert als übergeordnete Hormondrüse nahezu das gesamte periphere endokrine System. Die Sekretion der Hypophysenhormone wird einerseits durch die zentralen Stimuli des Hypothalamus und andererseits durch die Rückkopplungsmechanismen der peripheren Drüsen reguliert. Der Athyreodismus der Pax8^{-/-} Mäuse führt zu dramatischen Änderungen in der zellulären Zusammensetzung der Hypophyse, die allesamt durch eine dauerhafte Gabe von Schilddrüsenhormonen rückgängig gemacht werden können. Es handelt sich also eindeutig um Defekte, die durch das Fehlen von Schilddrüsenhormonen und nicht etwa durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors Pax8 selbst ausgelöst werden. Der einzige Zelltyp in der Hypophyse der von dem kongenitalen Hypothyreodismus nicht beeinflusst wurde, waren die kortikotropen Zellen. Eine Beobachtung die mit den Ergebnissen früher Studien in hypothyroiden Tieren übereinstimmt (DeFesi et al. 1979, Samuels et al. 1989 und Horvath et al 1990).

Thyrotrope Zellen

In den Pax8^{-/-} Mäusen war die TSH mRNA- und Proteinexpression dramatisch erhöht. Dies spiegelte sich auch in der im Vergleich zum Wildtyp etwa hundertfachen Erhöhung der TSH-Sekretion wider. Ähnliche Veränderungen zeigt auch die hyt/hyt Maus, die eine natürlich aufgetretene Mutation im TSH-Rezeptorgen trägt. Durch die Mutation verliert der Rezeptor seine Affinität zu TSH (Stein et al. 1994). Dies hat zur Folge, daß die Tiere mit einer hypoplastischen Schilddrüse geboren werden und die T4-Serumkonzentrationen nur etwa 10% der Werte im Wildtyp erreichen (Beamer et al. 1981, Beamer und Cresswell 1982). Zusätzlich zu den etwa 100fach erhöhten TSH-Plasmakonzentrationen zeigen sie, ähnlich wie die Pax8^{-/-} Mäuse, ein verzögertes Wachstum und eine Hypertrophie der thyrotropen Zellen (Naguchi et al. 1985). Neben der Hypertrophie kommt es bei beiden Mausmutanten zu einer dramatischen Zunahme der Anzahl thyrotroper Zellen. Diese stellen in den Adenohypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse den dominanten Zelltyp dar, während sie bei euthyroiden Mäusen nur etwa 2-5% der Zellen ausmachen (Thorner 1992). Studien in adulten Ratten, die mit PTU behandelt wurden, haben ebenfalls gezeigt, daß die Expression von TSH in hypothyroiden Tieren erhöht ist (Franklyn et al. 1985 und Mirell et al. 1987). Die Proliferation der thyrotropen Zellen und der Anstieg der TSH-Expression ist wahrscheinlich durch das Fehlen eines adäquaten Schilddrüsenhormon-*Feedbacks* bedingt (Shupnik et al. 1989).

Rodriguez-Garcia et al. haben gezeigt, daß im Vergleich zu Kontrolltieren in hypothyroiden Ratten eine Erhöhung der TSH mRNA-Expression erst am postnatalen Tag 3 in Erscheinung tritt. Die beobachtete Zunahme der TSH-Transkriptspiegel nimmt mit dem Alter zu (Rodriguez-Garcia et al. 1995). Im Einklang damit konnte gezeigt werden, daß in der Pax8^{-/-} Maus einer Hypertrophie der thyrotropen Zellen bereits an Tag 3 nachweisbar ist, eine deutliche Erhöhung der Anzahl der Thyrotropen aber erst an Tag 9 offensichtlich wird.

Die Schilddrüsenfunktion wird durch einen hypothalamisch-hypophysären Regelkreislauf gesteuert. An diesem sind neben den thyrotropen Zellen in der Hypophyse auch der paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus beteiligt, dessen Neuronen das Thyrotropin-*Releasing-Hormon* (TRH) in das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem freisetzen (Guillemin 1978 und Schally 1978). Die durch TRH verursachte Stimulation der Expression und Sekretion von TSH in den thyrotropen Zellen wird durch den TRH-R1 vermittelt. Neben der Zunahme der TSH Expression kommt es in der Pax8^{-/-} Maus zum einen zu einer erhöhten TRH-Expression im Hypothalamus (Stephanie Christ, persönliche Mitteilung) und zum anderen zu einer Erhöhung der Anzahl TRH-R1 exprimierender Zellen. Eine Regulation der Expression des TRH-R1 durch Schilddrüsenhormone konnte schon früher gezeigt werden und

ist ebenfalls auf eine fehlende Rückkopplungsregulation durch Schilddrüsenhormone zurückzuführen (De Lean und Ferland 1977 und Schomburg und Bauer 1995).

Die Normalisierung des Expressionsmuster sowohl von TSH als auch vom TRH-R1 durch eine tägliche Substitution der Pax8^{-/-} Mäuse mit einer physiologischen Dosis T4 von Geburt an unterstützt diese Annahme. Auch eine kurzfristige Behandlung der Pax8^{-/-} Mäuse mit T4 für 3-6 Tage führt zur Wiederherstellung einer mit dem Wildtyp vergleichbaren TSH mRNA-Expression. Die *Feedback*-Regulation durch die Schilddrüsenhormone scheint also relativ schnell wirksam zu werden. Die im Vergleich zu Wildtypmäusen zu beobachtende leichte Reduktion der thyrotropen Zellen sowie der TSH mRNA-Expression kommt wahrscheinlich durch einen milden, durch die Substitution bedingten, Hyperthyreodismus zustande.

Glykoprotein hormone

Neben den dramatischen Veränderungen, die die TSH-Expression betreffen, war eine deutliche Abnahme der mRNA-Expression der beiden Gonadotropine, LH und FSH, in den Pax8^{-/-} Mäusen zu beobachten. Diese ist wahrscheinlich durch die drastische Abnahme der gonadotropen Zellen in der Hypophyse bedingt. Im Gegensatz zu den beobachteten Veränderungen stehen Untersuchungen in PTU behandelten adulten Ratten, in denen weder eine Veränderung der mRNA-Expression der Gonadotropine (Samuels et al. 1989) noch eine Abnahme der gonadotropen Zellen in der Hypophyse beschrieben wurde (DeFesi et al. 1979 und Horvath et al 1990). Eine Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte sein, daß in diesen Studien adulte Tiere verwendet wurden, während in dieser Arbeit 3 Wochen alte Tiere untersucht wurden. Ein zweiter wahrscheinlich noch entscheidenderer Unterschied ist, daß die hier untersuchten Tiere von der Geburt an athyroid waren, während in den anderen Studien der Hypothyreodismus erst im adulten Stadium induziert wurde. Anders als in adulten PTU behandelten Ratten (DeFesi et al. 1979) nimmt in den Pax8^{-/-} Mäusen das Gewicht bzw. das Volumen der Hypophysen, und damit wahrscheinlich auch die Gesamtzahl der Zellen, nicht zu. Wenn die Gesamtzahl der Zellen konstant ist, führt dies zwangsweise dazu, daß die massive Zunahme an Thyrotropen auf Kosten einer Abnahme aller anderen Zellen geht. Dies würde auch eine Verminderung der gonadotropen Zellen erklären.

Die Transkriptspiegel der α -Untereinheit der Glykoprotein hormone war in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse erhöht. Diese Hochregulation wird wahrscheinlich durch das Fehlen der T3 vermittelten Repression der Transkription von α GSU verursacht. Für diese Annahme spricht zum einen die Normalisierung der Expression in T4 substituierten Pax8^{-/-} Mäusen. Zum anderen wurde schon in früheren Studien mit PTU behandelten Ratten gezeigt, daß die

Expression von α GSU in hypothyroiden Tieren erhöht ist (Shupnik et al. 1983, Mirell et al. 1987 und Samuels et al. 1989).

Somatotrope und laktotrope Zellen

Die somatotropen Zellen sind in der Hypophyse von normalen Tieren der dominante Zelltyp und machen etwa 40% aller Zellen aus (Thorner et al. 1992). In den Pax8^{-/-} Mäusen war die Anzahl der GH immunpositiven Zellen deutlich niedriger als in den Kontrolltieren und es kam zu einer drastischen Abnahme der GH Transkriptspiegel in der Hypophyse. Frühere Studien in adulten Tieren, bei denen der Hypothyreodismus chemisch bzw. operativ induziert wurde (Yaffe und Samuels 1984, Mirell et al. 1987 und Samuels et al. 1989), zeigten eine ähnliche Reduktion der GH Expression. Die beobachtete Abnahme der GH-mRNA-Expression in a- bzw. hypothyroiden Tieren ist ein direkter Effekt des fehlenden Schilddrüsenhormons. Diese Annahme wird durch Promotoranalysen des GH-Gens sowohl in der Ratte als auch der Maus unterstützt. Diese Untersuchungen konnten die Existenz Schilddrüsenhormon-responsiver Elemente (TRE) in der Promotorregion des Wachstumshormongens zeigen (Glass et al. 1987 und Das et al. 1996).

Die Abnahme der GH immunpositiven Zellen in den Hypophysen der Pax8^{-/-} Mäuse ist vergleichbar mit Beobachtungen, die in der kongenital hypothyroiden hyt/hyt Maus gemacht wurden (Noguchi et al. 1985). Eine Abnahme der somatotropen Zellen wurde auch in PTU behandelten adulten Ratten (DeFesi et al. 1979) und in der hypothyroiden α GSU^{-/-} Maus beobachtet (Kendall et al. 1995). Das Fehlen der α GSU führt zum Verlust biologisch aktiver Heterodimere der Glykoproteinhormone TSH, FSH und LH. Vergleichbar mit der hyt/hyt Maus, der ein funktioneller TSH-Rezeptor fehlt, werden diese Tiere mit einer hypoplastischen Schilddrüse geboren (Kendall et al. 1995). Durch eine 6-8 wöchige Substitution der α GSU^{-/-} Tiere mit Schilddrüsenhormonen kam es zu einer Normalisierung der somatotropen Zellpopulation. Dies deuten Stahl et al. als Hinweis, daß es in der hypothyroiden α GSU^{-/-} Maus zu einer Reduktion der Anzahl differenzierter somatotroper Zellen kommt (Stahl et al. 1999).

Die Substitution der Pax8^{-/-} Mäuse mit T4 führte schon nach drei Tagen zu einer Normalisierung der somatotropen Zellpopulation, was mit Untersuchungen von Lloyd et al. übereinstimmt. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen konnten sie zeigen, daß 3 Tage nach Ende der PTU Behandlung die Zahl der GH exprimierenden Zellen wieder das Wildtypniveau erreicht (Lloyd et al. 1990). Die schnelle Zunahme der Anzahl GH immunpositiver Zellen nach Beginn der Schilddrüsenhormongabe in den Pax8^{-/-} Mäusen läßt eher vermuten, daß der

Anstieg durch die Induktion der GH-Expression in schon vorhandenen somatotropen Zellen zustande kommt und nicht durch neu entstehende somatotrope Zellen, wie von Stahl et al. postuliert (Stahl et al. 1999). Auch eine Umkehr der von Horvath et al. beschriebenen Transdifferenzierung von Somatotropen in Thyrotrope (Horvath et al. 1990) wäre denkbar, da gleichzeitig mit der Zunahme der GH positiven Zellen die Zahl der thyrotropen Zellen in den T4 behandelten Pax8^{-/-} Mäusen wieder abnimmt.

GH ist der wichtigste Regulator des postnatalen Wachstums (Ohlsson 1998). Die anabolen und wachstumsfördernden Effekte von GH werden hauptsächlich durch die Stimulation der IGF-1-Expression in der Leber (Somatomedin-Hypothese) vermittelt, obwohl neuere Studien auch eine direkte Wirkung von GH gezeigt haben (LeRoith 2001a und 2001b). Der größte Teil des IGF-1 im Serum ist in einem ternären 150 kDa Komplex gebunden, der aus dem IGFBP-3 (IGF-Bindungsprotein 3), ALS (*acid labile subunit*) und dem IGF-1 selbst besteht (Jones 1995). In dieser Arbeit wurde die hepatische mRNA-Expression der Komponenten dieses Serumkomplexes in den kongenital hypothyroiden Pax8^{-/-} Mäusen und Kontrolltieren untersucht. Sowohl die mRNA-Level von IGF-1 als auch die der ALS waren in den Pax8^{-/-} Tieren deutlich niedriger als in den Kontrolltieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die in der Hypophyse beobachtete Abnahme der GH-Expression in den Pax8^{-/-} Mäusen sich sowohl auf die Expression von IGF-1 als auch von ALS auswirkt. Diese Annahme steht im Einklang mit der schon früher beobachteten Stimulation der IGF-1-Expression durch GH (Lupu 2001, LeRoith 2001). Eine tägliche Behandlung der Pax8^{-/-} Mäuse mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) von der Geburt an führte zu einer deutlichen Zunahme der IGF-1 und ALS Transkriptspiegel in der Leber. Da auch die GH mRNA-Expression in den Hypophysen der substituierten Pax8^{-/-} Mäuse sich wieder normalisiert, scheint es wahrscheinlich, daß der Anstieg der hepatischen Expression von IGF-1 und ALS durch die Erhöhung der GH Expression ausgelöst wird. Auch eine einmalige Behandlung der Pax8^{-/-} Tiere mit T4 (200 ng/g Körpergewicht) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht) führte nach 24 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von IGF-1 und ALS. Ob es nach dieser einmaligen Injektion innerhalb von 24 Stunden auch schon zu einem Anstieg der hypophysären GH Expression und zur Erhöhung der GH-Serumwerte kommt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Rodriguez-Garcia et al. haben zwar gezeigt, daß es in hypothyroiden Ratten schon 12 Stunden nach einer einmaligen Injektion von T3 (2 µg/g Körpergewicht) zu einem massiven Anstieg der GH mRNA-Expression kommt; die Zunahme der GH-Serumkonzentration folgte verzögert (Rodriguez-Garcia et al. 1995). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß der Anstieg der IGF-1 und ALS Expression in den behandelten

Tieren nicht nur indirekt durch die Erhöhung der GH Expression, sondern auch direkt durch Schilddrüsenhormone beeinflusst wird. Zur Klärung dieser Frage könnte untersucht werden ob es trotz einer Inaktivierung von GH z.B. durch Antikörper, nach einer T4 Behandlung der Pax8^{-/-} Mäuse zu einem ähnlich starken Anstieg der IGF mRNA-Expression in der Leber kommt.

Die Ergebnisse früherer Studien bezüglich der Schilddrüsenhormonabhängigkeit der Expression von Prolaktin sind uneinheitlich. Die Daten aus *in vitro* Experimenten zeigen eine Inhibition der Prolaktinexpression durch Schilddrüsenhormone (Maurer 1982 und Davis et al 1986). *In vivo* Studien mit PTU behandelten Ratten haben hingegen keine Veränderung der Prolaktin Transkriptspiegel (Franklyn et al. 1985 und Mirell et al. 1987) bzw. eine Abnahme der mRNA-Expression im hypothyroiden Zustand auf 10-30% der im Wildtyp beobachteten Werte gezeigt (Samuels et al. 1989, Lloyd et al. 1990 und Horvath et al. 1990).

In dieser Arbeit wurde eine drastische Abnahme der mRNA-Expression von Prolaktin in den athyroiden Pax8^{-/-} Mäusen nachgewiesen. Die Diskrepanz der Ergebnisse ergibt sich wahrscheinlich zum einen aus einem Unterschied zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten, da eine Inhibition der Prolaktinexpression nämlich ausschließlich in Zellkulturexperimenten beobachtet wurde (Maurer 1982 und Davis et al. 1986). Zum anderen erfolgte in den *in vivo* Experimenten die Behandlung der Tiere mit PTU in den einzelnen Studien für unterschiedliche Zeiten (Mirell et al. 1987 und Samuels et al. 1989), oder der Hypothyreoidismus wurde durch eine Radioiodtherapie induziert (Franklyn et al. 1987). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß die uneinheitlichen Ergebnisse der früheren Studien durch die unterschiedliche Behandlung der Tiere und damit durch einen eventuell unterschiedlichen Schilddrüsenhormonstatus hervorgerufen wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Pax8^{-/-} Maus zeigen aber ganz deutlich, daß sowohl die mRNA-Expression als auch die Serumkonzentration von Prolaktin im Vergleich zu euthyroiden Kontrollen in den athyroiden Mäusen extrem niedrig sind.

Diese Abnahme der Prolaktinexpression geht mit einer dramatischen Abnahme an Prolaktin-positiven Zellen in den 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen einher. In zwei anderen kongenitalen hypothyroiden Mausmodellen, der *hyt/hyt* (Noguchi et al. 1985 und Stahl et al. 1999) und der α GSU^{-/-} Maus (Kendall et al. 1995), wurde eine vergleichbare Reduktion der laktotropen Zellen beobachtet. Die Differenzierung der laktotropen Zellen der Adenohypophyse wird durch das Gonadotropin-*Releasing* Hormon (GnRH) induziert (Begeot et al. 1983). Zellkulturversuche an explantierten adenohypophysären Primordia haben gezeigt, daß dieser Effekt über α GSU vermittelt wird (Begeot et al. 1984). Auf Grund dieser Tatsache kann im

Fall der α GSU^{-/-} Maus nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Abnahme der laktotropen Zellen direkt durch das Fehlen von α GSU und nicht durch den Hypothyreodismus verursacht wird. Neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, daß eine Substitution der α GSU^{-/-} Tiere mit Schilddrüsenhormonen zu einer Normalisierung der laktotropen Zellpopulation führt (Stahl et al. 1999). Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die gezeigt haben, daß es trotz einer Erhöhung der Serumwerte von α GSU in den athyroiden Pax8^{-/-} Mäusen zu einer Abnahme der Prolaktin-positiven Zellen kommt, läßt dies vermuten, daß Schilddrüsenhormone einen entscheidenden Einfluß auf die Entstehung der laktotropen Zellen haben.

Eine tägliche Substitution der Pax8^{-/-} Mäuse mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) führt zu einer Normalisierung der laktotropen Zellpopulation. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, daß es sich bei der Reduktion der Prolaktin-positiven Zellen tatsächlich um einen Effekt handelt, der durch den Athyreodismus der Tiere bedingt ist. Eine kürzere Behandlung mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) für 3 bzw. 6 Tage (von Tag 18 bis Tag 20 bzw. Tag 15 bis Tag 20) war dafür nicht ausreichend. Auch in den α GSU^{-/-} Mäusen wurde durch eine 8wöchige Substitution mit Schilddrüsenhormonen eine Normalisierung der Anzahl laktotroper Zellen erreicht, während eine dreitägige Behandlung keine Wirkung zeigte (Stahl et al. 1999). Es ist bekannt, daß die Expression von Prolaktin durch Estradiol stimuliert wird (Liebermann et al. 1978 und Maurer 1982). Daher wurden Pax8^{-/-} Tiere für 3 Tage (Tag 18 bis Tag 20) mit Estradiol (100 ng/g Körpergewicht) behandelt, um die Prolaktinexpression in eventuell vorhandenen Laktotropen, deren Expression supprimiert war, zu stimulieren. Die Behandlung mit Estradiol führt zwar zu einer Verstärkung der Expression von Prolaktin in den vorhandenen laktotropen Zellen, es konnte aber keine Zunahme der Anzahl an Prolaktin-positiven Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es im Gegensatz zu den Somatotropen, deren GH-Expression zwar unterdrückt wird, die aber vorhanden sind (siehe oben), es zu einer Verringerung der Anzahl Prolaktin-positiver Zellen kommt.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß die thyrotropen, laktotropen und somatotropen Zellen von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen (Watkins-Chow und Camper 1998 und Scully und Rosenfeld 2002). Die Untersuchung der beiden zwergwüchsigen Mauslinien *Snell dwarf* und *Jackson dwarf* hat gezeigt, daß Mutationen in dem POU-Domänen-Transkriptionsfaktor Pit1 die Differenzierung der thyrotropen, somatotropen und laktotropen Zellen in der Hypophyse (Sheng et al. 1997 und Li et al. 1990) verhindern. Stahl et al. diskutieren, daß die massive Rekrutierung von Pit1-positiven Vorläuferzellen für die Differenzierung in thyrotrope Zellen zur Folge haben könnte, daß der Pool an

Vorläuferzellen, der für die Differenzierung in die anderen Zelltypen zur Verfügung steht, drastisch reduziert ist. Diese Reduktion des Vorläuferpools könnte dann eine mögliche Erklärung für die Abnahme der laktotropen und somatotropen Zellpopulationen sein (Stahl et al. 1999). Verschiedene Studien deuten darauf hin, daß die laktotropen Zellen sich wahrscheinlich aus somatotropen Zellen entwickeln (Dasen und Rosenfeld 2001). Zum einen konnte in Hypophysen von neonatalen Ratten die Existenz somatomammotroper Zellen gezeigt werden (Hoeffler et al. 1985). Zum anderen führte die genetische Ablation GH exprimierender Zellen auch zu einer Reduktion der laktotropen Zellen (Behringer et al. 1988). Die in dieser Arbeit gezeigte im Vergleich zum euthyroiden Wildtyp normale Anzahl an somatotropen Zellen an Tag 3 bzw. an Tag 9 in den Pax8^{-/-} Mäusen deutet aber darauf hin, daß zumindest die Entstehung der Somatotropen nicht beeinflusst wird (siehe oben). Die Abnahme der laktotropen Zellen ist also wahrscheinlich eher dadurch bedingt, daß die Entwicklung der Laktotropen aus den Somatotropen in den hypo- bzw. athyroiden Tieren gestört ist, als durch die von Stahl et al. postulierte Reduktion des Pit1-positiven Vorläuferpools (Stahl et al. 1999).

Bisher wurde angenommen, daß Estradiol den entscheidenden Faktor für die Umwandlung somatotroper Zellen in laktotrope Zellen darstellt. Sowohl Zellkulturexperimente als auch *in vivo* Studien an Ratten haben einen proliferativen Effekt von Estradiol auf laktotrope Zellen gezeigt (Amara et al. 1987, Lieberman et al. 1983 und Lloyd 1983). Auch beim Menschen konnte gezeigt werden, daß eine chronische Einnahme von pharmakologischen Dosen von Estradiol die Entstehung von Prolaktinoma induzieren kann (Gooren et al. 1988). Dieser Annahme stehen Ergebnisse aus verschiedenen Mausmodellen gegenüber. Die natürliche *hpg/hpg* Mausmutante, die auf Grund einer genomischen Deletion kein Gonadotropin-*Releasing*-Hormon (GnRH) produziert, zeigt eine dramatische Reduktion der Gonadotropinexpression, die Hypogonadismus und sehr niedriger Serumkonzentrationen der gonadalen Steroide zur Folge hat (Mason 1986). In der ER α ^{-/-} Maus wurde das Gen des Estradiol-Rezeptor α inaktiviert und damit die Estradiolsignalvermittlung unterbunden (Scully et al. 1997). Sowohl die *hpg/hpg* als auch die ER α ^{-/-} Maus zeigen aber im Vergleich zum Wildtyp nur eine moderate Reduktion der Anzahl laktotroper Zellen (Stahl et al. 1999 und Scully et al. 1997), während es in der athyroiden Pax8^{-/-} Maus zu einer drastischen Abnahme der laktotropen Zellen in der Adenohypophyse kommt. Die Untersuchungen der *hpg/hpg* und ER α ^{-/-} Mäuse lassen zum einen vermuten, daß der Einfluß von Estradiol auf die Proliferation der laktotropen Zellen geringer ist als bisher angenommen. Zum anderen zeigen die Ergebnisse in der Pax8^{-/-} Maus, daß der Schilddrüsenhormonstatus einen wesentlichen

Einfluß auf die Entstehung der laktotropen Zellen hat. Wahrscheinlich beeinflussen die Schilddrüsenhormone die Umwandlung der Somatotropen in Laktotrope, indem sie die Expression eines noch unbekanntes parakrinen Faktors regulieren. Ein möglicher Kandidat wäre z.B. der *nerve growth factor* (NGF), von dem in Zellkultur gezeigt werden konnte, daß unter seinem Einfluß die sommatomammotrope Zelllinie GH₃ einen mammotropen/laktotropen Phenotyp annimmt (Missale et al. 1994). Die Aufklärung der Identität dieses Faktors bleibt der Gegenstand weiterer Studien.

Zusammenfassung

Schilddrüsenhormone sind essentiell für das Leben. Sie beeinflussen die Synthese- und Abbauraten einer Vielzahl von Enzymen, den Stoffwechsel fast aller Grundsubstanzen, die Sekretion- und Abbauraten anderer Hormone sowie das Wachstum und die Entwicklung. Ein Mangel an Schilddrüsenhormon (Hypothyreodismus) bei Neugeborenen und ganz besonders in der fötalen Phase führt zu einer Retardierung aller Entwicklungsvorgänge und zu schweren multiplen Störungen der ZNS-Funktion (Kretinismus). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pax8^{-/-} Maus, die ohne Schilddrüse geboren wird, als neues Tiermodell für kongenitalen Hypothyroidismus genutzt.

Von der Schilddrüse wird hauptsächlich das Prohormon T4 synthetisiert und sekretiert, daher beinhaltet der Mechanismus, der die intrazelluläre Konzentration des biologisch aktiven Hormons T3 reguliert, unter anderem die enzymatische Umwandlung von T4 in T3 durch 5'-Deiodierung und der Abbau von T4 und T3 durch 5-Deiodierung zu rT3 und 3,3'-T2. Untersucht wurden die Expression der Deiodinasen (Deiodinase Typ 1 (D1), D2 und D3) und die T4, T3 und rT3 Serumkonzentrationen in der Entwicklung sowohl in normalen Mäusen als auch in der Pax8^{-/-} Maus. Die Serumwerte für T4 und T3 waren in den Kontrolltieren am Tag der Geburt unter der Detektionsgrenze, stiegen dann aber an und erreichten ihr Maximum am Tag 15. T4 und T3 waren in den Pax8^{-/-} Mäusen zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Die in beiden Gruppen am Tag der Geburt hohen rT3-Werte fielen in den Pax8^{-/-} Mäusen rapide ab, während sie in den Wildtyp-Tieren zu Beginn zwar abnahmen, aber dann parallel zu T3 und T4 wieder anstiegen. Die D1 Transkriptspiegel und Enzymaktivitäten in der Leber und Niere waren am Tag der Geburt niedrig und stiegen dann in den Kontrolltieren parallel zu den steigenden Schilddrüsenhormonwerten an. In den Pax8^{-/-} Tieren blieben die D1 Aktivitäten und die mRNA-Expression niedrig. Die cerebralen D2 Aktivitäten waren am Tag der Geburt niedrig, stiegen dann an und erreichten ihre maximalen Werte am Tag 15, die in den Pax8^{-/-} Tieren ca. zehnmal höher waren als in den Wildtyp-Tieren. Eine Erhöhung der D2 mRNA-Expression in den Pax8^{-/-} Tieren im Vergleich zu den Kontrollen konnte nur am Tag 21 beobachtet werden. Die D3 mRNA-Expression und Aktivität im Gehirn waren am Tag der Geburt hoch und zeigten dann eine moderate Abnahme zwischen Tag 3 und 15, wobei die Werte in den Pax8^{-/-} Mäusen etwas niedriger waren als in den Wildtyp-Tieren. Eine einmalige Behandlung von Pax8^{-/-} Tieren mit T4 (200 ng/g Körpergewicht) oder T3 (20 ng/g Körpergewicht) führte mit Ausnahme der cerebralen D3 Aktivität zu einer zumindest teilweisen Wiederherstellung der Enzymaktivitäten und Transkriptspiegel, wie sie in Wildtyp-Tieren beobachtet wurden. In der Hypophyse der Pax8^{-/-} Maus wurde eine im Vergleich zu Kontrolltieren deutliche Erhöhung sowohl der D2 Enzymaktivität als auch der mRNA-Expression beobachtet.

Neben der Expression der Deiodinasen wurde in der Hypophyse der Einfluß des kongenitalen Hypothyreodismus in den Pax8^{-/-} Mäusen auf die endokrinen Zellen untersucht. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren die TSH-Transkriptspiegel in der Hypophyse und die TSH-Serumwerte sowie die Zahl der thyrotropen Zellen dramatisch erhöht. Die Expression von α GSU war ebenfalls erhöht, während die FSH-, LH- und GH-Expression in den Pax8^{-/-} Mäusen niedriger war als in den Wildtyp-Tieren. Weder die Expression von POMC bzw. ACTH noch die Zahl der kortikotropen Zellen war verändert. Im Gegensatz dazu waren sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression und die Serumwerte von Prolaktin in den Pax8^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen extrem vermindert. In den Hypophysen der Pax8 defizienten Tiere konnten kaum laktotrope Zellen nachgewiesen werden. Eine tägliche Behandlung der Pax8^{-/-} Tiere mit T4 (20 ng/g Körpergewicht) von Tag 3 bis Tag 20 führte zu einer Normalisierung der Expression aller Hypophysenhormone und der zellulären Zusammensetzung der Hypophyse in 21 Tage alten Pax8^{-/-} Mäusen. Während eine 3tägige

Substitution der Pax8^{-/-} Tiere mit T4 von Tag 18 bis 20 zu einer Normalisierung der Anzahl an thyrotropen und somatotropen Zellen führte, was sie, genauso wie eine kombinierte Therapie mit T4 von Tag 15 bis 20 und Estradiol (100 ng/g Körpergewicht) von Tag 18 bis 20 nicht ausreichend, um die laktotrope Zellpopulation wiederherzustellen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zum einen dramatische Entwicklungs- und Schilddrüsenhormon-abhängige Veränderungen in der Expression der Deiodinasen im ZNS und der Peripherie während der ersten 3 Lebenswochen und zum anderen drastische, durch den Athyreoidismus hervorgerufene Veränderungen der Expression der Hypophysenhormone und der zellulären Zusammensetzung der Hypophyse in den Pax8^{-/-} Tieren.

Stichworte: Pax8, Deiodinasen, Hypothyroidismus, Schilddrüsenhormone, Hypophyse, Prolaktin

Abstract

Thyroid hormones are essential for a variety of developmental and metabolic processes. Congenital hypothyroidism (CHT) results in severe defects in the development of different tissues, in particular brain. As an animal model for CHT, Pax8^{-/-} mice which are born without thyroid gland were studied.

The expression of iodothyronine deiodinase D1 in liver and kidney, D2 in brain and pituitary, and D3 in brain, as well as serum T4, T3 and rT3 levels in Pax8^{-/-} versus Pax^{+/+} and Pax^{+/-} (control) mice during the first 3 weeks of life were determined. In control mice, serum T4 and T3 were undetectable at postnatal day 1 and increased to maximum levels at day 15. In Pax8^{-/-} mice serum T4 and T3 remained below detection limits. Serum rT3 was high on day 1 in both groups, and rapidly decreased in Pax8^{-/-} but not in control mice. Hepatic and renal D1 activities and mRNA levels were low on day 1 and increased in control mice roughly parallel to serum T4 and T3 levels. In Pax8^{-/-} mice, tissue D1 activities and mRNA levels remained low. Cerebral D2 activities were low on day 1 and increased to maximum levels at day 15, which were ~10-fold higher in Pax8^{-/-} than in control mice. D2 mRNA levels were higher in Pax8^{-/-} than in control mice only on day 21. Cerebral D3 activities and mRNA levels were high on day 1 and showed a moderate decrease between day 3 and 15, with values slightly lower in Pax8^{-/-} than in control mice. One day after injection of 200 ng T4 or 20 ng T3 per g body weight, tissue deiodinase activities and mRNA levels were at least partially restored towards control levels with the exception of cerebral D3 activity.

The effect of the severe congenital hypothyroidism in the Pax8^{-/-} mice on the expression of the pituitary hormones was also analysed. In the Pax8^{-/-} mouse we found extremely high levels of TSH mRNA and protein as well as an elevated number of thyrotrope cells in the pituitary. The expression of α GSU was increased whereas the expression of FSH, LH and GH were lower than in wildtype animals. POMC protein and mRNA amounts were unchanged, but the expression of prolactin and the number of lactotropes was significantly lower in the Pax8 deficient than in the control mice. These data were also confirmed by very high plasma levels of TSH and low levels for FSH, LH and prolactin in the Pax8^{-/-} mouse. Daily injection of Pax8^{-/-} mice with T4 (20 ng/g body weight) from day 3 on restored the wildtype expression pattern for all pituitary hormones at day 21 whereas substitution from day 18 on only led to a normalization of the number of thyrotrope and somatotrope cells at day 21 but failed to restore the population of prolactin-expressing cells. Even a combined treatment of Pax8^{-/-} mice with T4 from day 15 on and estradiol (100 ng/g body weight) from day 18 on was not sufficient to rescue the lactotrope cell population at day 21.

In conclusion: these findings show dramatic age and thyroid state-dependent changes in the expression of deiodinases in central and peripheral tissues of mice during the first 3 weeks of life as well as severe changes in the expression of the pituitary hormones and in the cellular composition of the pituitary in Pax8^{-/-} mice due to the deficiency of thyroid hormones.

Keywords: Pax8, deiodinases, hypothyroidism, thyroid hormones, pituitary, prolactin

Abkürzungen

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
bp	Basenpaare
cpm	Impulse pro Minute
D1	Deiodinase Typ 1
D2	Deiodinase Typ 2
D3	Deiodinase Typ 3
DIG	Digoxigenin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GH	Wachstumshormon
α GSU	α -Untereinheit der Glykoproteinhormone
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IRD	<i>inner ring deiodination</i> / 5-Deiodierung
LH	Luteinisierendes Hormon
min	Minute
MOPS	3-[N-morpholino]propanolsulfonsäure
nt	Nukleotid
ORD	<i>outer ring deiodination</i> / 5'-Deiodierung
PTU	Propylthiouracil
POMC	Proopiomelanokortin
rT3	3',5,5'-Triiodthyronin
SDS	Natriumdodecylsulfat
T3	3,5,3'-Triiodthyronin
T4	Thyroxin / 3,5,3',5'-Tetraiodthyronin
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor
TRE	Schilddrüsenhormon-responsive Elemente
TRH	Thyrotropin-Releasing Hormon
TRH-R1	TRH-Rezeptor 1
Tris	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon

Literatur

Amara JF, van Itallie C, Dannies PS Regulation of Prolactin Production and Cell Growth by Estradiol: Difference in Sensitivity to Estradiol Occurs at Level of Messenger Ribonucleic Acid Accumulation. *Endocrinology* 120: 264-271

Bates JM, St. Germain DL, Galton VA 1999 Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140: 844-851

Bates JM, Spate VL, Morris JS, St. Germain DL, Galton VA 2000 Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in rat during development. *Endocrinology* 141: 2490-2500

Beamer WG, Eicher EM, Maltai LT, Southard JL 1981 Inherited primary hypothyroidism in mice. *Science* 212: 61-63

Beamer WG, Cresswell LA 1982 Defective thyroid ontogenesis in fetal hypothyroid (hyt/hyt) mice. *Anatomical Record* 202:387-393

Begeot M, Hemming FJ, Martinat N, Dubois MP, Dubois PM 1983 Gonadotropin releasing hormone (GnRH) stimulates immunoreactive lactotrope differentiation. *Endocrinology* 112: 2224-2226

Begeot M, Hemming FJ, Dubois PM 1984 Induction of Pituitary Lactotrope Differentiation by Luteinizing Hormone α Subunit. *Science* 226: 566-568

Behringer RR, Mathews LS, Palmiter RD, Brinster RL 1988 Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes Dev* 2: 453-461

Bell GI, Stempien MM, Fong NM, Rall LB 1986 Sequences of liver cDNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. *Nucleic Acid Res* 14 (20): 7873-7882

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17(6): 639-669

Bernal J 2002 Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest* 25: 268-288

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23: 38-89

- Blithe DL, Richards RG, Skarulis MC** 1991 Free alpha molecules from pregnancy simulate secretion of prolactin from human decidual cells: a novel function for free alpha in pregnancy. *Endocrinology* 129: 2257-2259
- Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR Ooi GT** 1996 Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10028-10033
- Borelli E, Heyman RA, Arias C, Sawchenko PE, Evans RM** 1989 Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* 339: 538-541
- Burmeister LA, Pachucki J, St Germain DL** 1997 Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology* 138: 5231-5237
- Chin WW, Godine JE Klein DR, Chang AS Tan LK, Habener JF** 1983 Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the beta subunit of rat lutropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4649-4653
- Chin WW, Muccini JA, Shin L** 1985 Evidence for a single rat thyrotropin-beta-subunit gene: thyroidectomy increases its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 1152-1158
- Danielson PE, Forss-Petter S, Brow MA, Calavetta L, Douglass J, Milner RJ, Sutcliffe JG** 1988 p1B15: A cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* 7: 261-267
- Das P, Meyer L, Seyfert HM, Brockmann G, Schwerin M** 1996 Structure of the growth hormone-encoding gene and its promotor in mice. *Gene* 169: 209-213
- Dasen JS, Rosenfeld MG** 1999 Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 669-677
- Dasen JS, Rosenfeld MG** 2001 Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* 24: 327-355
- Davey JC, Schneider MJ, Becker KB, Galton VA** 1999 Cloning of a 5.8 kb cDNA for a mouse type 2 deiodinase. *Endocrinology* 140: 1022-1025
- Davis JRE, Lynam TC, Franklyn JA, Docherty K, Sheppard MC** 1986 Tri-iodothyronine and phenytoin reduce prolactin messenger RNA levels in cultured rat pituitary cells. *J Endocrinol* 109: 359

- De Fesi CR, Astier HS, Surks MI** 1979 Kinetics of Thyrotrophs and Somatotrophs during Development of Hypothyroidism and L-Triiodothyronine Treatment of Hypothyroid Rats. *Endocrinology* 104: 1172-1180
- De la Pena P, Delgado LM** 1992 Cloning and Expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH₃ rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 284: 891-899
- De Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA, Labrie F** 1977 Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology* 100:1496-1504
- Docter R, Krenning EP, de Jong M, Hennemann G** 1993 The sick euthyroid syndrome: changes in thyroid hormone serum parameters and hormone metabolism. *Clin Endocrinol* 39: 499-518
- Emerson CH, Bambini G, Alex S, Castro MI, Roti E, Braverman LE** 1988 The effect of thyroid dysfunction and fasting on placenta inner ring deiodinase activity in the rat. *Endocrinology* 122: 809-816
- Escobar-Morreale HF, Obregon MJ, Hernandez A, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G** 1997 Regulation of iodothyronine deiodinase activity as studied in thyroidectomized rats infused with thyroxine or triiodothyronine. *Endocrinology* 138: 2559-2568
- Esfandiari A, Courtin F, Lennon AM, Gavaret JM, Pierre M** 1992 Induction of type III deiodinase activity in astroglial cells by thyroid hormones. *Endocrinology* 131: 1682-1688
- Evans RM** 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895
- Farwell AP, Safran M, Dubord S, Leonard JL** 1996 Degradation and recycling of the substrate-binding subunit of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. *J Biol Chem* 271: 16369-16374
- Franklyn JA, Lynam T, Docherty K, Ramsden DB, Sheppard MC** 1986 Effect of hypothyroidism on pituitary cytoplasmic concentrations of messenger RNA encoding thyrotrophin β and α subunits, prolactin and growth hormone. *J Endocr* 108: 43-47
- Frawley LS, Bookfor FR** 1991 Mammosomatotrophs: Presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr Rev* 12:337-355

- Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St Germain EA, Bates JM, St Germain DL** 1999 Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *J Clin Invest* 103: 979-987
- Gereben B, Goncalves C, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC** 2000 Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol* 14: 1697-1708
- Glass CK, Franco R, Weinberger C, Albert VR, Evans RM, Rosenfeld MG** 1987 A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates transactivation by thyroid hormone. *Nature* 329: 738-741
- Gooren LJJ, Assies J, Asscheman H, de Slegte R, van Kessel H** 1988 Estrogen-Induced Prolactinoma in a Man. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 444-446
- Gubbins EJ, Maurer RA, Lagrimini M, Erwin CR, Donlon JE** 1980 Structure of the rat prolactin gene. *J Biol Chem* 255: 8655-8662
- Guillemin R** 1978 Peptides in the brain: The new endocrinology of the neuron. *Science* 202: 390-402
- Halperin Y, Shapiro LE, Surks MI** 1994 Down-regulation of type II L-thyroxine, 5'-monodeiodinase in cultured GC cells: different pathways of regulation by L-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 135: 1464-1469
- Hennemann G, Docter R, Friesema ECH, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ** 2001 Plasma membrane transport of thyroid hormones. and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 22: 451-476
- Hernandez A, Lyon GJ, Schneider MJ, St. Germain DL** 1999 Isolation and characterization of the mouse gene for the type 3 iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 140: 124-130
- Hoeffler JP, Boockfor FR, Frawley LS** 1985 Ontogeny of prolactin Cells in Neonatal Rats: Initial Prolactin Secretors also Release Growth Hormone. *Endocrinology* 117: 187-195
- Horvath E, Lloyd RV, Kovacs K** 1990 Propylthiouracil-Induced Hypothyroidism Results in Reversible Transdifferentiation of Somatotrophs into Thyroidectomy Cells. *Lab Invest* 63: 511-520

- Huang T, Chopra IJ, Beredo A, Solomon DH, Chua Teco GN** 1985 Skin is an active site of inner ring monodeiodination of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine. *Endocrinology* 111: 2106-2113
- Huang T, Chopra IJ, Beredo A, Solomon DH, Chua Teco GN** 1988 Thyroxine inner ring monodeiodinating activity in fetal tissues of the rat. *Pediat Res* 23:196-199
- Jakobs TC, Schmutzler C, Meissner J, Kohrle J** 1997 The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene – mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid hormone-responsive element. *Eur J Biochem* 247: 288-297
- Jones JI, Clemmons DR** 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins:biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34
- Kaplan MM, Yaskoski KA** 1981 Maturational patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. *J Clin Invest* 67: 1208-1214
- Kendall SK, Saunders TL, Jin L, Lloyd RV, Glode LM, Nett TM, Keri RA, Nilson JH, Camper SA** 1991 Targeted Ablation of Pituitary Gonadotropes in Transgenic Mice. *Mol Endocrinol* 5: 2025-2036
- Kendall SK; Samuelson LC, Saunders TL, Wood RI, Camper SA** 1995 Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone α -subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes Dev* 9: 2007-2019
- Koopdonk-Kool JM, de Vijlder JJ, Veenboer GJ, Ris-Stalpers C, Kok JH, Vulsma T, Boer K, Visser TJ** 1996 Type II and type III deiodinase activity in human placenta as a function of gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2154-2158
- Kopp P** 2002 Perspective: genetic defects in the etiology of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 143: 2019-2024
- Köhrle J** 1999 Local activation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* 151: 103-119
- Köhrle J** 2002 Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347: 125-167
- Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Ambrügger P, Grüters A** 2000 Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism. *Horm Res* 53 (Suppl 1): 12-18
- Larsen PR** 1982 Thyroid-pituitary interaction: feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones. *N Engl J Med* 306: 23-32

Leonard JL, Farwell AP 1997 Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain. *Thyroid* 7: 147-151

LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A 2001 the somatomedin hypothesis 2001. *Endocr Rev* 22: 53-74

LeRoith D, Scavo L, Butler A 2001 What is the role of circulating IGF-I? *TEM* 12: 48-52

Li S, Crenshaw III EB, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG 1990 Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene *pit-1*. *Nature* 347: 528-533

Liebermann ME, Maurer RA, Gorski J 1978 Estrogen control of prolactin synthesis *in vitro*. *Biochemistry* 75: 5946

Lieberman ME, Slabaugh MB, Rutledge JJ, Gorski J 1983 The role of estrogen in the differentiation of prolactin producing cells. *J Steroid Biochem* 19: 275-281

Liu JL, LeRoith D 1999 Insulin-Like Growth Factor I Is Essential for Postnatal Growth in Response to Growth Hormone. *Endocrinology* 140: 5178

Llyod RV 1983 Estrogen-induced hyperplasia and neoplasia in the rat anterior pituitary gland. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 113: 198-206

Lloyd RV, Jin L, Song J, Terry LC, Horvath E, Kovacs K 1990 Effects of Propylthiouracil on Growth Hormone and Prolactin Messenger Ribonucleic Acids in the Rat Pituitary. *Lab Invest* 62: 347-354

Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis 2001 Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol* 229: 141-162

Macchia PE, Lapi P, Krude H, Pirro MT, Missero C, Chiovato L, Souabni A, Baserga M, Tassi V, Pinchera A, Fenzi G, Gruters A, Busslinger M, Di Lauro R 1998 PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet* 19: 83-86

Magliano M, Di Lauro R, Zannini M 2000 Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13144-13149

Maia AL, Berry MJ, Sabbag R, Harney JW, Larsen PR 1995 Structural and functional differences in the DIO1 gene in mice with inherited type 1 deiodinase deficiency. *Mol Endocrinol* 9: 969-980

- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P** 1998 Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nature Genet* 19: 87-90
- Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young III WS, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH** 1986 A deletion Truncating the Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Is Responsible for Hypogonadism in the *hpg* Mouse. *Science* 234: 1366-1371
- Maurer RA** 1982 Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem* 257: 2133
- Maurer RA** 1982 Thyroid Hormone Specifically Inhibits Prolactin Synthesis and Decreases Prolactin Messenger Ribonucleic Acid Levels in Cultured Pituitary Cells. *Endocrinology* 110: 1507-1514
- Maurer RA** 1987 Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of complementary deoxyribonucleic acid for the beta-subunit of rat follicle stimulating hormone. *Mol Endocrinol* 1: 717-723
- Mirell CJ, Yanagisawa M, Lau R, Pekary AE, Chin WW, Hershman JM** 1987 Influence of Thyroidal Status on Pituitary Content of Thyrotropin β - and α -Subunit, Growth Hormone, and Prolactin Messenger Ribonucleic Acid. *Mol Endocrinol* 1: 408-412
- Missale C, Boroni F, Sigala S, Zanelatto A, Dal Toso R, Balsari A, Spano P** 1994 Nerve Growth Factor Directs Differentiation of the Bipotential Cell Line GH-3 into the Mammoth Phenotype. *Endocrinology* 135: 290-298
- Mortimer RH, Galligan JP, Cannell GR, Addison RS, Roberts MS** 1996 Maternal to fetal thyroxine transmission in the human term placenta is limited by inner ring deiodination. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2247-2249
- Nelson C, Albert VR, Elsholtz HP, Lu LIW, Rosenfeld MG** 1988 Activation of Cell-Specific Expression of Rat Growth Hormone and Prolactin Genes by a Common Transcription Factor. *Science* 239: 1400-1405
- Noguchi T, Kudo M, Sugisaki T, Satoh I** 1986 An immunocytochemical and electron microscopic study of the *hyt* mouse anterior pituitary gland. *J Endocr* 109: 163-168
- Obregon MJ, Ruiz de Ona C, Calvo R, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G** 1991 Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* 129: 2663-2673

Claes Ohlsson, Bengt-Åke Bengtsson, Olle G. P. Isaksson, Troels T. Andreassen, and Maria C. Sloomweg 1998 Growth Hormone and Bone. *Endocr. Rev.* 19: 55-79.

O'Mara BA, Dittrich W, Lauterio TJ, St. Germain DL 1993 Pretranslational regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinology* 133: 1715-1723

Pierce JG, Parsons TF 1981 Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465-495

Plachow D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P 1990 Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development* 110: 643-651

Porterfield SP, Hendrich CE 1993 The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development – current perspectives. *Endoc Rev* 14: 94-106

Ramos S, Goya L, Alvarez C, Pascual-Leone AM 1998 Mechanism of Hypothyroidism Action on Insulin-Like Growth Factor-I and II from Neonatal to Adult Rats: Insulin Mediates Thyroid Hormone Effects in the Neonatal Period. *Endocrinology* 139: 4782

Richard K, Hume R, Kaptein E, Sanders JP, van Toor H, de Herder WW, den Hollander JC, Krenning EP, Visser TJ 1998 Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2868-2874

Rodriguez-Garcia M, Jolin T, Santos A, Perez-Castillo A 1995 Effect of Perinatal Hypothyroidism on the Developmental Regulation of Rat Pituitary Growth Hormone and Thyrotropin Genes. *Endocrinology* 136:4339-4350

Roti E, Gnudi A, Braverman LE 1983 The placental transport, synthesis and metabolism of hormones and drugs which affect thyroid function. *Endocr Rev* 4: 131-149

Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR 1996 Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 98: 962-968

Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR 1996 Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology*. 137: 3308-3315

Samuels MH, Wierman ME, Wang C, Ridgway EC 1989 The Effect of Altered Thyroid Status on Pituitary Hormone Messenger Ribonucleic Acid Concentration in the Rat. *Endocrinology* 124: 2277-2282

- Schally AV** 1978 Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 202: 18-28
- Schäfer MKH, Day R** 1995 In situ hybridization techniques to study processing enzyme expression at the cellular level. *Methods Neurosci* 23:16-44
- Schomburg L, Bauer K** Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136: 3480-3485
- Schuller AG, Groffen C, van Neck JW, Zwarthoff EC, Drop SL** 1994 cDNA cloning and mRNA expression of six mouse insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 104: 57-66
- Schwartz J** 2000 Intercellular Communication in the Anterior Pituitary. *Endoc Rev* 21 (5):488-513
- Schwind JL** 1928 The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *Am J Anat* 41: 295-315
- Scully KM, Rosenfeld MG** 2002 Pituitary Development: Regulatory Codes in Mammalian Organogenesis. *Science* 295:2231-2235
- Setalo G, Nakane P** 1976 Functional differentiation of the fetal anterior pituitary cells in rat. *Endocrinol Exp* 10:155-166
- Sheng HZ, Moriyama K, Yamashita T, Li H, Potter SS, Mahon KA, Westphal H** 1997 Multistep Control of Pituitary Organogenesis. *Science* 278: 1809-1812
- Shupnik MA, Chin WW, Ross DS, Downing MF, Habener JF, Ridgway EC** 1983 Regulation by Thyroxine of the mRNA Encoding the α Subunit of Mouse Thyrotropin. *J Biol Chem* 258: 15120-15124
- Shupnik MA, Ridgway EC, Chin WW** 1989 Molecular Biology of Thyrotropin. *Endoc Rev* 10: 459-475
- Silva JE, Larsen PR** 1977 Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine. *Science* 198: 617-619
- Southern EM** 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517

Stachelek SJ, Kowalik TF, Farwell AP, Leonard JL 2000 Myosin V plays an essential role in the thyroid hormone-dependent endocytosis of type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 275: 31701-31707

Stahl JH, Kendall SK, Brinkmeier ML, Grecos TL, Watkins-Chow DE, Campos-Barros A, Lloyd RV, Camper SA 1999 Thyroid hormone is essential for Pituitary Somatotropes and Lactotropes. *Endocrinology* 140: 1884-1892

Stanley F, Samuels HH 1984 *n*-Butyrate Effects Thyroid Hormone Stimulation of Prolactin Production and mRNA Levels in GH₁ Cells. *J Biol Chem* 259: 9768-9775

Stein SA, Oates EL, Hall CR, Grumbles RM, Fernandez LM, Taylor NA, Puett D, Jin S 1994 Identification of a Point Mutation in the Thyrotropin Receptor of *hyt/hyt* Hypothyroid Mouse. *Mol Endocrinol* 8: 129-138

Steinsapir J, Harney J, Larsen PR 1998 Type 2 iodothyronine deiodinase in rat pituitary cells is inactivated in proteasomes. *J Clin Invest* 102: 1895-1899

Steinsapir J, Bianco AC, Buettner C, Harney J, Larsen PR 1999 Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteasomal degradation and requires interaction with the enzyme's active center. *Endocrinology* 141: 1127-1135

Tannahill LA, Visser TJ, McCabe CJ, Kachilele S, Boelaert K, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJI 2002 Dysregulation of iodothyronine deiodinase enzyme expression and function in human pituitary tumors. *Clin Endocrinol* 56: 735-743

Thomas PS 1980 Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5201

Thorner MO, Vance ML, Horvath E, Kovacs K 1992 The Anterior Pituitary. *Williams Textbook of Endocrinology* 8th edition: 221-295

N Toyoda, AM Zavacki, AL Maia, JW Harney, PR Larsen 1995 A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 1995 15: 5100-5112

Tramblay P, Gruss P 1994 Pax: genes for mice and man. *Pharmac Ther* 61: 205-226

Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM 1997 Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138: 3359-3368

- Tu HM, Legradi G, Bartha T, Salvatore D, Lechan RM, Larsen PR** 1999 Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 140: 784-790
- van Wassenaer AG, Stulp MR, Valianpour F, Tamminga P, Ris Stalpers C, de Randamie JS, van Beusekom C, de Vijlder JJ** 2002 The quantity of thyroid hormone in human milk is too low to influence plasma thyroid hormone levels in the very preterm infant. *Clin Endocrinol* 56: 621-627
- Visser TJ, Docter R, Hennemann G** (1977) Radioimmunoassay of reverse triiodothyronine. *J Endocrinol* 73: 395-396
- Visser TJ** 2002 Biosynthesis, transport, metabolism and action of thyroid hormones. In Wass J, Shalet S (Eds) *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford University Press (in press)
- Vulsma T, Gons MH, de Vijlder JJ** 1989 Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N Engl J Med* 321: 13-16
- Watkins-Chow DE, Camper SA** 1998 How many homeobox genes does it take to make a pituitary gland? *Trends in Genet* 14 (7):284-290
- Wicks RJ** 1986 RNA molecular weight determination by agarose gel electrophoresis using formaldehyde as denaturant: Comparison of RNA and DNA molecular weight markers. *Int J Biochem* 18: 277
- Yaffe BM, Samuels HH** 1984 Hormonal Regulation of the Growth Hormone Gene. *J Biol Chem* 259: 6284-6291
- Yen PM** 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81: 1097-1142
- Zhang CY, Sungwoo K, Harney JW, Larsen PR** 1998 Further characterization of thyroid hormone elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology* 139: 1156-1163

Lebenslauf

Name: Sönke Friedrichsen
Geburtsort: Hamburg
Geburtstag: 28.03.1974

Schulausbildung:

1980-1985 Grundsschule Aumühle
1985-1993 Hansa Gymnasium Bergedorf
Mai 1993 Abitur

Studium:

Studium der Biochemie:

1993-1998 Studium der Biochemie in Hannover
Universität Hannover
Tierärztliche Hochschule Hannover
Medizinische Hochschule Hannover
Juni 1995 Diplomvorprüfung
Juni 1998 Diplomprüfung
Juni - Dezember 1998 Diplomarbeit am Max-Planck-
Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover
Thema: Charakterisierung einer neuen Zink-
Metallopeptidase

Studium der Medizin:

1996-1998 Studium der Humanmedizin an der medizinischen
Hochschule Hannover
März 1998 Physikumsprüfung

Promotion:

1999-2002 Anfertigung der Dissertation im Fach Biochemie am
Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie
in Hannover

Literaturliste

Artikel:

Schomburg L, Kollmus H, Friedrichsen S, Bauer K 2000 Molecular characterization of a pyromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase, PILS-AP. Eur J Biochem 267: 3198-3207

Heuer H, Christ S, Friedrichsen S, Brauer D, Winckler M, Bauer K, Raivich G Connective tissue growth factor (CTGF), a novel marker of subplate (layer VII) neurons in the rat cerebral cortex. Zur Veröffentlichung eingereicht bei Neuroscience.

Friedrichsen S, Heuer H, Christ S, Winckler M, Brauer D, Bauer K, Raivich G CTGF mRNA Expression during mouse embryonic development. Eingereicht zur Veröffentlichung bei Developmental Dynamics.

Friedrichsen S, Christ S, Heuer H, Schäfer MKH, Mansouri A, Bauer K, Visser TJ Regulation of Iodothyronine Deiodinases in the Pax8^{-/-} Mouse Model of Congenital Hypothyroidism. Endocrinology (in press).

Friedrichsen S, Christ S, Heuer H, Schäfer MKH, Visser TJ, Bauer K Expression of the pituitary hormones in the Pax8^{-/-} Mouse Model of Congenital Hypothyroidism. In Vorbereitung

Meeting Abstracts:

Friedrichsen S, Brauer D, Christ S, Heuer H, Visser TJ, Bauer K 2000 Regulation of gene expression by thyroid hormones in the mouse brain. European Journal of Neuroscience 12 (Supplement 11), Abstract-Nr. 127.03

Friedrichsen S, Christ S, Heuer H, Visser TJ, Schäfer MKH, Bauer K 2001 Gene expression in the brain of the athyroid pax 8 ^{-/-} mouse. Proceedings of the 4th Meeting of the German Neuroscience Society 2001, Abstract-Nr. 1021

Friedrichsen S, Christ S, Heuer H, Visser TJ, Schäfer MKH, Bauer K 2002 Gene expression in the brain of the athyroid Pax8^{-/-} mouse. 3rd forum of the European Neuroscience Society, Abstract-Nr. 073.8