

Medizinische Kernklinik und Poliklinik des  
Universitäts-Krankenhaus Eppendorf  
Martinistraße 52, 20246 Hamburg  
Direktor Prof. Dr. med. H. Greten

Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  und Tumornekrose-  
faktor- $\alpha$  reduzieren die mRNA für  $\beta_1$ -Schilddrüsenhormonrezeptoren  
in kultivierten HepG2-Zellen

# D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich der Universität Hamburg vorgelegt von

Claudia Brinkmann  
aus Hamburg

Hamburg, 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 30.05.2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. H. Greten

# 1. EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK

1.1	EINLEITUNG .....	5
1.2	SCHWERE ALLGEMEINERKRANKUNGEN ( TRAUMA, SCHOCK, SEPSIS ) .....	5
1.2.1	<i>Ebb-, Flow- und Rekonvaleszenzphase</i> .....	6
1.2.2	<i>Hormonausschüttung bei schweren Allgemeinerkrankungen</i> .....	9
1.2.3	<i>Rolle der Zytokine bei schweren Allgemeinerkrankungen</i> .....	11
1.3	SCHILDDRÜSENHORMONE .....	14
1.3.1	<i>Bildung und Speicherung</i> .....	14
1.3.2	<i>Sekretion und Transport der Schilddrüsenhormone</i> .....	15
1.3.3	<i>Regelkreis</i> .....	15
1.3.4	<i>Wirkung der Schilddrüsenhormone</i> .....	16
1.3.5	<i>Schilddrüsenhormonrezeptoren</i> .....	16
1.3.6	<i>Schilddrüsenhormone und schwere Allgemeinerkrankungen</i> .....	20
1.4	PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT .....	24
2.	MATERIAL UND METHODEN .....	25
2.1	MATERIALIEN .....	25
2.1.1	<i>Laborgeräte</i> .....	25
2.1.2	<i>Laborbedarf</i> .....	26
2.1.3	<i>Photolabor</i> .....	27
2.1.4	<i>Zellkultur</i> .....	27
2.1.5	<i>PCR</i> .....	28
2.1.6	<i>Elektrophorese</i> .....	28
2.2	METHODEN .....	29
2.2.1	<i>Kultivierung der HepG2-Zellen</i> .....	29
2.2.2	<i>Zellstimulation</i> .....	29
2.2.3	<i>Zellmorphologie</i> .....	30
2.2.4	<i>RNA-Isolation</i> .....	30
2.2.5	<i>Messung des mRNA-Gehaltes</i> .....	31
2.2.7	<i>c-DNA Synthese</i> .....	39
2.2.8	<i>Quantitative PCR</i> .....	40
2.2.9	<i>Statistische Analyse und Auswertung</i> .....	41
3.	ERGEBNISSE .....	42
3.1	<i>c-DNA SYNTHESE DES SCHILDDRÜSENHORMONREZEPTORS</i> .....	42
3.2	<i>ERGEBNIS DER PCR MIMIC-HERSTELLUNG</i> .....	43
3.3	<i>QUANTITATIVE KOMPETITIVE PCR</i> .....	44
3.4	<i>UNSTIMULIERTE ZELLEN</i> .....	45

3.5 ZYTOKINEFFEKTE .....	46
3.5.1 <i>Zeitabhängigkeit</i> .....	46
3.5.2 <i>Dosisabhängigkeit</i> .....	48
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
4.1 AUSWAHL DER VERSUCHSBEDINGUNGEN .....	50
4.1.1 <i>Vorteile der Verwendung von HepG2-Zellen</i> .....	50
4.1.2 <i>Verwendung der PCR</i> .....	51
4.1.3 <i>Zytokine</i> .....	52
4.2 VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT BISHERIGEN WISSENSCHAFTLICHEN .....	53
UNTERSUCHUNGEN .....	53
4.2.1 <i>Dosisabhängigkeit</i> .....	53
4.2.2 <i>Zeitabhängigkeit</i> .....	55
4.3 BEDEUTUNG DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE FÜR DAS VERSTÄNDNIS DER ..	57
PATHOPHYSIOLOGIE SCHWERER ALLGEMEINERKRANKUNGEN .....	57
4.4 EFFEKTE VON TRIJODTHYRONIN AUF DIE SYNTHESE VON WACHSTUMSHORMON <sup>60</sup>	
4.5 THERAPIEANSÄTZE .....	61
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>63</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>65</b>
<b>7. WERTETABELLEN .....</b>	<b>79</b>
7.1 RNA .....	79
7.2 PCR-ESSAYS .....	80
<b>8. DANKSAGUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>9.LEBENS LAUF .....</b>	<b>95</b>

# **1. Einführung in die Thematik**

## **1.1 Einleitung**

## **1.2 Schwere Allgemeinerkrankungen ( Trauma, Schock, Sepsis )**

Der Körper reagiert auf schwere Allgemeinerkrankungen mit charakteristischen systemischen Reaktionen, die auch als „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS) bezeichnet werden. Der klinische Verlauf dieses SIRS ist unter anderem abhängig von der Schwere des Traumas, dem Ausmaß der Störung der Mikrozirkulation und den verschiedenen metabolischen Veränderungen (95). Die Reaktion auf ein Trauma beginnt schon vor dem eigentlichen Ereignis, unter anderem durch die Wahrnehmung einer bevorstehenden Gefahr. Die Hypothalamus-Hypophysen-Achse wird aktiviert, und es kommt zur Sekretion von Kortikotropin (ACTH), Wachstumshormon (STH), Prolaktin und Vasopressin. Gleichzeitig wird der Sympathikus aktiviert, was unter anderem zu einer Mobilisierung der Energiereserven führt. Über die Erregung von Barorezeptoren und Chemorezeptoren, sowie durch die Ausschüttung von Zytokinen wird die Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse aufrecht erhalten (144).

Die Reaktion des Organismus im Rahmen dieser schweren Allgemeinerkrankungen wird auch als Akute-Phase-Antwort bezeichnet. Sie geht unter anderem mit Fieber und einer Erhöhung der Blutkörperchensenkungs-Geschwindigkeit (BSG) einher (34). Außerdem erhöht sich aufgrund der verstärkten Proteinsynthese der Leber und der gesteigerten Glukoneogenese zur Aufrechterhaltung des Kohlehydrathaushaltes, der Bedarf der Leber an Aminosäuren (34, 94). Gedeckt wird dieser durch eine verstärkte Proteolyse der Skelettmuskulatur. Die Folge davon ist ein Verlust an Muskelmasse und eine negative Stickstoffbilanz (1, 94). Trotz exogener Zufuhr von Aminosäuren, kann ein Abbau der Skelettmuskulatur in dieser katabolen Phase nicht verhindert werden (144).

Die Hepatozyten reagieren im Rahmen dieser Akute-Phase-Antwort, mit einer Veränderung des Sekretionsmusters. Die Produktion von Albumin und Transferrin ist eingeschränkt und es kommt zu einer verstärkten Ausschüttung von Proteinaseinhibitoren und Akute-Phase-Proteinen. Zu diesen Akute-Phase-Proteinen gehören das C-reaktive Protein (CRP),  $\alpha_2$ -Makroglobulin,  $\alpha_1$ -Glykoprotein, Haptoglobin, Coeruloplasmin, Fibrinogen, Hämopexin, Serum-Amyloid A und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (34, 55, 83, 95). Die Ausschüttung der Akute-

Phase-Proteine wird durch Zytokine, die bei schweren Allgemeinerkrankungen verstärkt ausgeschüttet werden, reguliert (55, 95).

Die Sekretion der Akute-Phase-Proteine durch die Leber als Reaktion auf schwere Allgemeinerkrankungen hat einen protektiven Effekt auf die Aufrechterhaltung der Homöostase des Körpers und das Überleben des Patienten (83). Eine schwache Akute-Phase-Antwort beispielsweise bei einer Sepsis ist demzufolge mit einer schlechten Prognose der Erkrankung assoziiert (39).

### **1.2.1 Ebb-, Flow- und Rekonvaleszenzphase**

Der Ablauf von Stoffwechselreaktionen bei schweren Allgemeinerkrankungen läßt sich gemäß Cuthbertson in drei Phasen aufteilen, die als Ebb-, Flow- und Rekonvaleszenzphase bezeichnet werden. Bei schweren Verletzungen ist ein bestimmtes Zeitschema von dem Beginn des traumatischen Ereignisses bis hin zur Genesung erkennbar. Für die Sepsis läßt sich ein derartiger schematischer Verlauf jedoch nicht beschreiben, da bei ihr beispielsweise durch wiederholte Schübe einer Bakteriämie die Ebb- und die Flow-Phase mehrfach durchlaufen werden können. Dies führt in der Regel zu einer Verschlechterung der Prognose und zu einem schwer vorhersehbaren Verlauf (50).

#### **1.2.1.1 Ebb-Phase**

Nach schwerem Trauma oder bei Infektionen reagiert der Körper in der sogenannten Ebb-Phase mit der Mobilisierung von Energiereserven, bei gleichzeitig reduzierter Verstoffwechslung der mobilisierten Metaboliten (50). Auch die Mikrozirkulation ist stark beeinträchtigt (95). In Abhängigkeit von der Intensität des Traumas und von dessen Behandlung beträgt die Dauer dieser Phase ca. 12-24 Stunden. In diesem Zeitraum kommt es zu einer Aktivierung des Sympathikus und der Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark, sowie gleichzeitiger Sekretion von Vasopressin und Kortikotropin (ACTH) aus der Hypophyse. Durch die Adrenalinsekretion kommt es, gemeinsam mit einer gesteigerten Kortisolexkretion aus der Nebennierenrinde durch ACTH, zu einer vermehrten Glykogenolyse in der Leber und der Skelettmuskulatur mit folgendem Anstieg der Blutzuckerkonzentration im Serum (144). Au-

ßerdem ist, durch die Glykogenolyse in der Skelettmuskulatur, die Sekretion von Laktat erhöht. Die hohe Plasmakonzentration der Katecholamine führt auch zu einer verstärkten Lipolyse mit Mobilisierung von freien Fettsäuren und Glycerin. Die Lipolyse wird durch die gehemmte Ausschüttung von Insulin aus dem Pankreas zusätzlich verstärkt. Das Maximum der Mobilisation der Energiereserven wird innerhalb von ein bis zwei Stunden erreicht, die metabolischen Veränderungen bestehen allerdings noch über diesen Zeitraum hinaus (50).

Die Hyperglykämie persistiert, obwohl die Glykogenreserven der Leber schon lange erschöpft sind. Die Ursache hierfür liegt zum einen in einer anhaltenden Glukoneogenese der Leber aufgrund der Stimulation durch Adrenalin, Kortisol und Glukagon, und zum anderen in einer Hemmung der peripheren Glukoseverwertung (50, 144).

### **1.2.1.2 Flow-Phase**

Soweit die Patienten die ersten Stunden überleben, schließt an die Ebb-Phase die katabole Flow-Phase an. Diese Phase wird bestimmt durch einen Anstieg des Grundumsatzes, der Körpertemperatur und der Herzfrequenz. Sie erreicht nach 7-10 Tagen ihr Maximum und ist in ihrer Intensität und Dauer von der Schwere des Traumas abhängig (50, 95).

Der Anstieg von Kortisol, Glukagon und Adrenalin bewirkt eine allgemeine katabole Stoffwechsellage. Die dadurch erhöhte Stickstoffausscheidung im Urin mit resultierender negativer Stickstoffbilanz spiegelt einen erhöhten Abbau von Muskelproteinen wider. Die Stoffe 3-Methylhistidin, Zink, Kreatinin und Kreatin sind durch den Muskelabbau ebenfalls vermehrt im Urin nachweisbar. Die erhöhte Stoffwechselaktivität ist zunächst hauptsächlich auf eine vermehrte Fettoxidation zurückzuführen (51). Die verbrauchte Energie wird nur zu ca. 20 % durch freigesetzte Aminosäuren aus dem Proteinkatabolismus geliefert. Außerdem trägt die beschleunigte Oxidation von Glukose zu dem erhöhten Grundumsatz bei. Die Insulinkonzentration steigt beim Übergang von der Ebb-Phase in die Flow-Phase allmählich an und erreicht ihr Maximum zeitgleich mit der maximalen Stickstoffausscheidung. Der erhöhte Proteinsatz trotz hoher Insulinwerte, die normalerweise für anabole Stoffwechselwirkungen verantwortlich sind, spiegelt sehr deutlich die bereits in der Ebb-Phase zu beobachtende Insulinresistenz wider (50).

Persistiert die Katabolie der Flow-Phase, resultiert daraus gegebenenfalls ein Multiorganversagen. Das in diesem Zusammenhang auftretende Leberversagen äußert sich in einem progressiven Ikterus und einer eingeschränkten Stoffwechselleistung der Leber. Die Synthese von Akute Phase-Proteinen, die Freisetzung von Aminosäuren und auch von Glucose sind reduziert (95).

### **1.2.1.3 Rekonvaleszenzphase**

Der Übergang von der Flow-Phase in die Phase der Rekonvaleszenz ist fließend. Langsam entwickelt sich aus der katabolen Flow-Phase eine allgemeine anabole Stoffwechselaktivität, die sich über einen Zeitraum von mehreren Monaten erstreckt und zu einer Wiederherstellung geschädigter Organsysteme und zur Erholung des Patienten führt (50).



## **1.2.2 Hormonausschüttung bei schweren Allgemeinerkrankungen**

### Katecholamine

Die Katecholamine sind für die Aufrechterhaltung des Kreislaufs und des Stoffwechsels in Stresssituationen von großer Bedeutung. Die vermehrte Sekretion von Adrenalin und Noradrenalin gehört zu der initialen Reaktion des Organismus auf ein schweres Trauma. Sie sorgen für die Mobilisierung von Energiereserven, steigern die Herzfrequenz und den arteriellen Blutdruck (50). Bei schweren Allgemeinerkrankungen konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Katecholamine und der Schwere der Erkrankung beobachtet werden. Hohe Adrenalinspiegel kamen vor allem bei Patienten in einem kritischen Allgemeinzustand vor (49).

### Kortisol

Als Reaktion auf ein schweres Trauma wird über die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse vermehrt ACTH ausgeschüttet, so daß schon zu Beginn der Reaktion eines Organismus hohe Kortisolspiegel zu beobachten sind. Der Anstieg der Kortisolkonzentration in der Ebb-Phase schwerer Allgemeinerkrankungen hat einen erheblichen Effekt auf den Abbau der Skelettmuskulatur (50). Kortisol stimuliert dort die Proteolyse und hemmt die Umwandlung von Aminosäuren in Muskelproteine (12). In der Flow-Phase fällt die Konzentration relativ schnell wieder ab, kann aber bei schwerwiegenderen Verletzungen auch noch über den Zeitpunkt der maximalen Katabolie hinaus erhöhte Werte aufweisen (50). In einer Studie mit septischen Patienten wurde die Aufhebung der normalen pulsatilen und zirkadianen Kortisolsekretion beobachtet. Bei diesen Patienten waren außerdem die Pulsfrequenz und der Pulsspitzenanstieg im Vergleich zu gesunden Probanden vermindert (137).

### Wachstumshormon

Im Rahmen der hypophysären Aktivierung während der Ebb-Phase schwerer Allgemeinerkrankungen wurde ein Anstieg der Wachstumshormonkonzentration im Serum beobachtet. Die erhöhte Konzentration fällt im Verlauf der Flow-Phase ab und erreicht zum Zeitpunkt der maximalen Katabolie bereits wieder Normalwerte (50). Wachstumshormon übt seine anabolen Effekte inklusive der Synthese von Muskelproteinen über die Stimulation der Synthese

von Somatomedin-C („insulin-like growth factor“, IGF) aus (12, 144). Bei schweren Allgemeinerkrankungen wird die Aktivität dieses Peptidhormons trotz hoher Wachstumshormonwerte vorübergehend unterdrückt (50). Die bei schweren Allgemeinerkrankungen ausgeschütteten Zytokine führen zu einer Reduktion der Wachstumshormonrezeptoren in Leberzellen und zu einer verminderten Synthese von Somatomedin-C (145).

### Glukagon

Glukagon wird von den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas sezerniert (12). Die Ausschüttung von Glukagon aus dem Pankreas wird durch Adrenalin vermittelt, so daß es in der Ebb-Phase zu einer erhöhten Konzentration kommt. Glukagon fördert die Glykogenolyse und Glukoneogenese in der Leber und trägt auf diese Weise zu einer Hyperglykämie bei. In der Flow-Phase fällt die Konzentration schnell ab, und erreicht ungefähr 7-10 Tage nach dem Trauma Normalwerte (50). Erhöhte Glukagonspiegel fördern die Lipolyse und führen zu einer verstärkten Oxidation freier Fettsäuren (12).

### Insulin

Die Insulinkonzentration unterliegt in der Ebb-Phase einer großen individuellen Schwankungsbreite. Diese Schwankungsbreite repräsentiert zwei gegeneinander wirkende Effekte der Insulinsekretion, zum einen die Stimulation durch die nach einem Trauma auftretende initiale Hyperglykämie, und zum anderen die Hemmung durch eine erhöhte Adrenalinkonzentration (50). Auch die periphere Glucoseverwertung wird durch Adrenalin antagonisiert (12, 50), so daß die Hyperglykämie bestehen bleibt. In der Flow-Phase kommt es zum Anstieg der Insulinsekretion des Pankreas, diese erreicht nach ungefähr 10 Tagen maximale Werte (50).

Die Insulinsekretion führt jedoch nicht zu den für das Hormon typischen anabolen Effekten. Sowohl die Glykogenolyse und Glukosesekretion als auch die Lipolyse persistieren trotz steigender Insulin- und Glukosekonzentrationen. Es besteht eine periphere Insulinresistenz. Eine Wechselwirkung zwischen Insulin und Interleukin-1 (IL-1) auf der Ebene der Prostaglandinsekretion (PGF<sub>2</sub>) wird in diesem Zusammenhang als möglicher ursächlicher Faktor diskutiert (50).

### **1.2.3. Rolle der Zytokine bei schweren Allgemeinerkrankungen**

Zytokine sind körpereigene, hormonähnliche, regulatorische Proteine, die für die interzelluläre Kommunikation verantwortlich sind. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen, bei der Immunantwort, Chemotaxis, bei Fieber und der Bildung von Akute-Phase-Proteinen. Außerdem sind sie auch an der Tumorregression und Tumorprogression beteiligt (113).

Bei schweren Allgemeinerkrankungen (Trauma, Schock, Sepsis) induzieren die Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten) Stoffwechselreaktionen zur Unterstützung der Abwehrreaktion des Körpers. Die durch sie sezernierten Zytokine zählen zu den zentralen Vermittlern metabolischer und endokriner Reaktionen im Rahmen einer Entzündungsreaktion (6, 69). Die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) haben auf diese Umstellung des Organismus einen entscheidenden Einfluß (94). IL-1 und TNF fördern die Ausschüttung von Insulin und Glukagon (34) und führen über eine direkte Stimulation der Hypophyse zur gesteigerten Sekretion von Wachstumshormon, ACTH, CRH, TSH und Vasopressin (69, 96). Zytokine stimulieren den Proteinabbau in der Skelettmuskulatur (45, 46), fördern die Aufnahme von Aminosäuren in die Leber und die hepatische Sekretion von Akute-Phase-Proteinen (25, 53, 55, 95). In-Vitro Versuche zeigten, daß IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  insbesondere zu einer Sekretion von  $\alpha_1$ -Glykoprotein, Komplementfaktor 3 (C3) und Haptoglobin führen (3, 55). Die maximale Sekretion weiterer Akute-Phase-Proteine kann durch diese beiden Zytokine allein jedoch nicht erreicht werden (3, 25), sondern ergibt sich aus dem Zusammenwirken zusätzlicher Faktoren wie beispielsweise Interleukin-6 und Glukokortikoide (4). TNF und IL-1 führen beide zu hämodynamischen Veränderungen wie der Senkung des arteriellen Blutdruckes und des venösen Druckes (6, 104). Die Induktion von IL-1 durch TNF und deren synergistische Effekte verstärken den Einfluß der Zytokine auf den Organismus erheblich und fördern die Entstehung eines Schockzustandes (104).

#### **1.2.3.1 Interleukin-1**

Interleukin-1 (IL-1) existiert in zwei Formen. Interleukin-1 $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  sind die Produkte unterschiedlicher Gene, besitzen verschiedene Aminosäuresequenzen, binden aber

durch strukturelle Verwandtschaft an denselben Rezeptor auf der Zelloberfläche, wo sie ähnliche biologische Reaktionen auslösen (37).

Interleukin-1 (IL-1) wird von Monozyten und Makrophagen gebildet und ist unter anderem unter der Bezeichnung „Lymphozyten aktivierender Faktor“(LAF) oder „endogenes Pyrogen“ bekannt. Es wird an dem Ort der Verletzung beziehungsweise des toxischen Geschehens direkt produziert und erreicht, durch das Eindringen in die Blutbahn auch andere Gewebe wie Leber, Pankreas, Knochen und Gehirn (34).

Bei der Synthese des Zytokins entstehen zunächst sogenannte Vorläufermoleküle mit einem Molekulargewicht von 31 kDa, die dann mit Hilfe intrazellulärer Proteasen in die aktive Form mit einem Molekulargewicht von 17,5 kDa gespalten werden. IL-1 $\alpha$  verbleibt meist im Zytosol und fungiert dort als autokriner Botenstoff, oder es gelangt an die Zelloberfläche, wo es an der Vermittlung parakriner Funktionen beteiligt ist. IL-1 $\beta$  wird dagegen von der Zelle sezerniert und gelangt in den Körperkreislauf (37). Die Plasmakonzentration von IL-1 $\beta$  liegt normalerweise unterhalb der Nachweisgrenze von 40 pg/ml. Erhöhte Spiegel treten bei Patienten mit Sepsis, bei akuter Organabstoßung, bei akuten Schüben von verschiedenen Autoimmunerkrankungen, nach extremer körperlicher Anstrengung oder bei Frauen nach der Ovulation auf (18, 41).

IL-1 ist, durch seine stimulierende Wirkung auf die Sekretion von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Hypothalamus, für die Erhöhung der Körperkerntemperatur verantwortlich (1, 34, 42). Die erhöhte Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentration fördert unter anderem den Proteinkatabolismus in der Skelettmuskulatur (1) und führt zu einer Herabsetzung der Schmerzschwelle. Bei septischen Patienten ruft IL-1 durch die Erhöhung der Plasmakonzentration von Mediatoren wie plättchenaktivierendem Faktor, Prostaglandinen und Stickoxid (37) eine Senkung des arteriellen Blutdruckes und des systemischen peripheren Widerstandes hervor, woraus sich ein akuter Schockzustand entwickeln kann (104). IL-1 verstärkt außerdem die Lymphozytenproliferation, die für die Abwehr von Mikroorganismen von Bedeutung ist und dem IL-1 eine protektive Rolle bei der Immunantwort des Organismus zukommen läßt. IL-1 erhöht durch seinen Einfluß auf das Knochenmark die Zahl der Granulozyten und besitzt zusätzlich chemotaktische Wirkung. Bei schweren Allgemeinerkrankungen stimuliert es die Produktion der Akute-Phase-Proteine in der Leber (34).

Außerdem ist von IL-1 eine schlafinduzierende Wirkung bekannt, die den Patienten in einen Zustand verringerten Energiebedarfs versetzt und auf diese Weise Abwehr- und Regenerationsvorgänge unterstützt (34).

Der physiologisch vorkommende Interleukin-1-Rezeptorantagonist gehört ebenfalls zur Interleukin-1-Familie und inhibiert durch die Bindung an den Interleukin-1-Rezeptor auf der Zelloberfläche die Wirkung von Interleukin-1 (37). In Tierversuchen reduzierte die Blockade des Rezeptors das Ausmaß der Entzündungsreaktion und erhöhte die Überlebensrate des Organismus (36). Die Tatsache, daß bei unterschiedlichsten Erkrankungen eine erhöhte Plasmakonzentration von IL-1 Rezeptorantagonisten festgestellt wurde, läßt eine ihm zukommende Schutzfunktion vor den Zytokineffekten vermuten (37).

### **1.2.3.2 Tumor-Nekrose-Faktor**

Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder auch „Cachectin“ wurde in Studien über Kachexie bei chronischen Erkrankungen entdeckt. Es kommt als TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  (Lymphotoxin) vor. TNF- $\alpha$  besitzt ein Molekulargewicht von 17 kDa (8) und vermittelt seine Wirkung über die Bindung an membranständige Rezeptoren von denen zwei Subtypen existieren. Der 75 kDa-Rezeptor befindet sich vor allem auf Zellen lymphatischen Ursprungs und führt zu einer Stimulation der Lymphozytenproliferation. Der 55 kDa-Rezeptor ist dagegen häufiger auf Zellen epithelialen Ursprungs zu finden. Bei der Synthese von TNF entsteht zunächst eine inaktive Vorstufe, die dann durch Proteasen in die aktive Form gespalten wird. TNF ist ein endogenes Pyrogen und ein bedeutender Mediator bei Entzündungsreaktionen. Unter dem Einfluß von Endotoxinen und Lipopolysaccariden wird es von Makrophagen und Monozyten sezerniert (6). TNF hemmt die Lipoproteinlipase (7, 12) und induziert sowohl die Synthese als auch die Sekretion spezifischer Proteine wie MHC (major histocompatibility complex) Klasse I Protein, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und IL-1 (35, 102). TNF- $\alpha$  fördert den Proteinkatabolismus in der Skelettmuskulatur und steigert außerdem die Synthese der Akute-Phase-Proteine in der Leber (8, 12).

Es ist in der Lage Fieber auszulösen, zum einen durch direkte Wirkung auf Neurone des Hypothalamus und zum anderen über die Induktion von IL-1, welches ebenfalls eine pyrogene Wirkung besitzt (35).

TNF führt außerdem zu hämostatischen Veränderungen am Gefäßendothel. Durch die Produktion prokoagulatorischer Aktivität und der Hemmung der Thrombomodulinexpression auf der Zelloberfläche wird die Thrombozytenaggregation gefördert und kann, über den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren, zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen (103). Die toxische Wirkung von TNF auf die Endothelzellen (124) führt zu einem intravasalen Flüssigkeits- und Elektrolytverlust in den extravasalen Raum. Sowohl die daraus resultierende Hämokonzentration als auch die Infiltration verschiedener Organe mit Leukozyten und die Entwicklung eines Endotoxinschocks, sind auf TNF und eine dadurch bedingte Sekretion bestimmter Mediatorsubstanzen (Leukotriene, Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF)) zurückzuführen und beeinflussen dessen Verlauf (7). Nach der Infusion von TNF bei Ratten in einer Konzentration, die nach Lipopolysaccharidgabe endogen produziert wird, wurden neben Reaktionen wie Haarausfall und Diarrhoe eine Hämokonzentration, eine metabolische Azidose und ein Schockzustand, der mit starken Organschädigungen einherging, beobachtet (132).

## **1.3 Schilddrüsenhormone**

### **1.3.1 Bildung und Speicherung**

Die beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin ( $T_4$ ) und Trijodthyronin ( $T_3$ ) entstehen aus der Aminosäure Thyrosin. Die Bildung der Hormone erfordert zunächst die Aufnahme von Jodid aus der Nahrung. Es wird durch aktiven Transport über die Basalmembran aus dem Blut in die Thyreozyten aufgenommen und zu elementarem Jod oxidiert. In der darauf folgenden Jodisation wird das elementare Jod an Thyrosin gekoppelt und es entstehen die Hormonvorstufen 3-Monojodthyrosin und 3,5-Dijodthyrosin. In der Schilddrüse entsteht aus zwei Molekülen 3,5-Dijodthyrosin das Schilddrüsenhormon Thyroxin ( $T_4$ ), welches an Thyreoglobulin gebunden, in den Follikeln der Schilddrüse gespeichert wird. Aus 3-Monojodthyrosin und einem Molekül 3,5-Dijodthyrosin entstehen in der Schilddrüse das 3,5,3'-Trijodthyronin ( $T_3$ ) und das 3,3',5'-Trijodthyronin („reverses Trijodthyronin“,  $rT_3$ ).  $T_3$  ist die aktive Form der Schilddrüsenhormone und wird zum größten Teil extrathyreoidal durch Abspaltung eines Jodmoleküls von Thyroxin durch das Enzym 5'-Dejodinase gebildet

(133, 140). Die Leber stellt einen wichtigen Ort dieser Konversion von  $T_4$  zu  $T_3$  dar. Ein Teil von  $T_4$  wird zu  $rT_3$  dejodiniert, welches im Vergleich zu  $T_3$  und  $T_4$  jedoch stoffwechsellaktiv ist (140).

### **1.3.2 Sekretion und Transport der Schilddrüsenhormone**

Die Sekretion der Schilddrüsenhormone erfordert zunächst den Abbau des Thyreoglobulins, so daß sowohl  $T_3$  als auch  $T_4$  in den Körperkreislauf übertreten können. Der größte Anteil der Hormone ( $T_4$  99,95%;  $T_3$  99,5%) ist im Serum reversibel an Transportproteine gebunden. Derartige Proteine sind das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), das Thyroxin-bindende Albumin (TBA) und das Transthyretin. Sie werden in der Leber synthetisiert und sorgen für die gleichmäßige Verteilung der Schilddrüsenhormone im Körper. Außerdem dienen sie als Hormonreservoir, aus dem bei Bedarf die sofortige Freisetzung der Hormone möglich ist. Veränderungen der Konzentration verfügbarer Transportproteine gehen kurzfristig mit einer veränderten Serumkonzentration der freien Schilddrüsenhormone einher (133, 140).

### **1.3.3 Regelkreis**

Die Produktion der Schilddrüsenhormone wird durch den Hypothalamus-Hypophysen Regelkreis beeinflusst, welcher sehr empfindlich auf kleinste Konzentrationsänderungen der Hormone reagiert. Aus den Neuronen des Hypothalamus wird das „thyrotropin releasing hormone“ (TRH) freigesetzt, welches in der Adenohypophyse die Freisetzung von Thyroidea-stimulierendem-Hormon (TSH) anregt. Über eine negative Rückkopplung der TSH-Spiegel und der Schilddrüsenhormonkonzentration erfolgt die Regulation der TRH-Sekretion aus dem Hypothalamus. Das TSH wirkt auf die Schilddrüse und reguliert dort unter anderem die Jod-aufnahme, die Hormonsynthese und die Ausschüttung von  $T_3$  und  $T_4$ . Die zirkulierenden Schilddrüsenhormone regulieren über eine negative Rückkopplung die TSH-Sekretion aus dem Hypothalamus und die Hormonausschüttung der Schilddrüse (133).

### **1.3.4 Wirkung der Schilddrüsenhormone**

Die Schilddrüsenhormone beeinflussen eine Reihe von Stoffwechselreaktionen (133). Sie kontrollieren die körperliche und geistige Entwicklung, das Wachstum und den Grundumsatz (117). Sie stimulieren die Thermogenese, erhöhen die Empfindlichkeit verschiedener Gewebe für Katecholamine und beeinträchtigen sowohl die Produktion von Proteinen als auch die Produktion von Enzymen und Hormonen. Ein erhöhter Serumspiegel von  $T_3$  wie beispielsweise bei einer Hyperthyreose äußert sich in einer Tachykardie, übermäßigem Schwitzen und Unruhezuständen (117). Außerdem besteht ein erhöhter Grundumsatz mit gesteigerter Lipolyse und Glykolyse. Um die Glukosekonzentration im Serum konstant zu halten, wird kompensatorisch die Glukoneogenese gefördert, mit der ein vermehrter Abbau von Muskelproteinen verbunden ist. Daraus resultiert eine katabole Stoffwechsellage mit negativer Stickstoffbilanz und Gewichtsverlust (15, 54, 117, 133). Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen wie beispielsweise bei einer Hypothyreose führt zu einem verminderten Grundumsatz mit in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration bestehender Bradykardie und Kälteintoleranz (12, 117).

Reverse  $T_3$  ist stoffwechselinaktiv und beeinflusst daher nicht den Proteinkatabolismus in der Muskulatur. Es hat weder Einfluß auf die TSH Antwort durch TRH-Stimulation noch auf die Serumkonzentrationen von  $T_4$  und  $T_3$ , kann aber in In-Vitro-Studien die Umwandlung von  $T_4$  zu  $T_3$  hemmen (15). Ein Einfluß der Schilddrüsenhormone auf die Produktion von Akute-Phase-Proteinen bei Entzündungsreaktionen konnte in In-Vitro-Studien mit Rattenhepatozyten (HepG2-Zellen) und humanen Zellen (H-35) nicht nachgewiesen werden (17).

### **1.3.5 Schilddrüsenhormonrezeptoren**

Die Wirkung der Schilddrüsenhormone wird auf zellulärer Ebene durch die Bindung an spezifische nukleäre Rezeptoren vermittelt (133). Schilddrüsenhormonrezeptoren kommen in nahezu allen menschlichen Geweben vor (28). Die Rezeptoren wurden sowohl beim Menschen als auch bei Ratten nachgewiesen (91) und kommen in menschlichen Leberzellen und in Rattenhepatozyten in gleicher Anzahl vor. Sie befinden sich im Zellkern und sind chromatin-assoziierte Proteine, die nicht zu den Histonen gehören. In der Leber und der Hypophyse



existiert eine hohe Anzahl nukleärer Schilddrüsenhormonrezeptoren, weshalb diese Gewebe auch die stärkste Reaktion auf den Einfluß von  $T_3$  zeigen (133).

### 1.3.5.1 Molekularer Aufbau und Struktur

Die Schilddrüsenhormonrezeptoren gehören zur Superfamilie der *erbA*-verwandten, DNA-bindenden Proteine, zu denen unter anderem die Rezeptoren für Steroidhormone, Vitamin D und Retinoide gehören (43, 116, 149). Sie enthalten eine DNA-bindende Domäne und ein terminales Carboxylende, welches den Liganden ( $T_3$ ) bindet (43). Der  $T_3$ -Rezeptor bindet über seine DNA-bindende Domäne an das sogenannte „thyroid hormone responsive element“ (TRE), der Promotor-Region eines entsprechenden Zielgens (z.B. Wachstumshormon von Ratten) (67). Die DNA-bindende Domäne besitzt eine fingerähnliche Struktur, die als ‘two zinc finger’-Einheit bezeichnet wird. Der eine Finger bindet an das TRE des zu regulierenden Gens, während der andere Finger vermutlich mit weiteren, an der Transkription beteiligten, Faktoren interagiert (28). Die Bindung des Liganden ( $T_3$ ) an den Rezeptor ermöglicht die Bindung an das entsprechende TRE der Promotorregion des Zielgens, wodurch es zu einer Beeinflussung der Gentranskription kommt (43). Der  $T_3$ -Rezeptor kann sowohl als Homodimer oder auch als Heterodimer gemeinsam mit anderen nukleären Proteinen an das TRE binden, wobei Heterodimere mit höherer Affinität als Homodimere binden (76, 110, 148).

Von den Rezeptoren existieren vier Rezeptorsubtypen, die alle sowohl in Ratten als auch beim Menschen nachgewiesen werden konnten (149). Die Rezeptorsubtypen werden auf zwei verschiedenen Genen kodiert (121, 149). Das Chromosom 17 kodiert den  $\alpha$ -Rezeptor aus dem durch alternatives RNA-Splicing entweder der  $\alpha_1$ -Rezeptor oder der  $\alpha_2$ -Rezeptor, hervorgeht (101, 121). Der  $\alpha_1$ -Typ, meist in der Skelettmuskulatur und braunem Fettgewebe vorkommend (87), besitzt eine starke Bindungsaffinität zu Trijodthyronin ( $T_3$ ). Der humane  $\alpha_2$ -Rezeptor, der reichlich im Gehirn zu finden ist (87), bindet den Liganden  $T_3$  nicht (82, 87, 100). Er besitzt die Fähigkeit die Bindung des Rezeptors an das TRE zu inhibieren und ist außerdem in der Lage mit dem  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Rezeptor zu interagieren, und deren Funktionen zu hemmen (76, 82). Leber und Nieren enthalten nur eine geringe Anzahl von  $\alpha_1$ -Rezeptoren, dagegen aber eine große Anzahl  $\beta$ -Rezeptoren, so daß vermutlich der  $\beta$ -Rezeptor für die zahlreichen  $T_3$  vermittelten Effekte dieser Gewebe verantwortlich ist (87). Die  $\beta$ -Rezeptoren wer-

den vom Chromosom 3 kodiert und die Subtypen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  entstehen ebenfalls durch alternatives RNA-Splicing (141). Die Rezeptoren vom Typ  $\beta_1$ , der vor allem in Leber, Herz und Niere verbreitet ist (66, 85), und  $\beta_2$ , die hypophysenspezifische Form des Rezeptors, weisen eine hohe Bindungsaffinität zu  $T_3$  auf (66).

### **1.3.5.2 Regulation der Rezeptorkapazität und Rezeptoraffinität**

Die Schilddrüsenhormonrezeptoren werden durch bestimmte Stoffe oder Stoffwechsellustände in ihrer Funktion und vor allem in ihrer Bindungskapazität reguliert. Die Rezeptoren besitzen eine sehr hohe Affinität zu Trijodthyronin ( $T_3$ ) und eine deutlich geringere zu Thyroxin ( $T_4$ ) bei begrenzter Bindungskapazität (86, 119). In Zellkulturen mit  $GH_1$ -Zellen betrug die maximale Bindungskapazität sowohl für  $T_3$  als auch für  $T_4$   $13 \times 10^{-15}$  mol/20 $\mu$ g DNA entsprechend 5000  $T_3$ - bzw.  $T_4$ -Bindungsstellen pro Zellkern (119). In  $GH_1$ -Zellen betrug die Dissoziationskonstante der Hormonbindung an den Rezeptor  $1,8 \times 10^{-10}$  mol/l für  $T_3$  und  $1,2 \times 10^{-9}$  mol/l für  $T_4$ , so daß man von einer zehnfach höheren Rezeptoraffinität von  $T_3$  im Vergleich zu  $T_4$  ausgehen kann (120). Bei kultivierten humanen Leberzellen (HepG2) wurde eine Affinitätskonstante der  $T_3$ -Bindung von  $1,8 \times 10^{10}$  l/mol bei maximaler Bindungskapazität von 0,1 pmol/mg Protein festgestellt. Die Bindungskapazität der HepG2-Zellen entspricht einer Anzahl von 1800  $T_3$ -Bindungsstellen pro Zellkern (68). In Mäusehepatozyten wurden ungefähr 4500  $T_3$ -Bindungsstellen pro Zellkern gefunden (13).

Glukagon hat einen Einfluß auf die maximale Bindungskapazität des Schilddrüsenhormonrezeptors. Dillmann et al. beobachtete 17 bis 65 Stunden nach Beginn einer Glukagoninfusion bei Ratten eine Reduktion der Bindungskapazität um ungefähr 30 %, wobei die Glukagonkonzentration im Plasma den Werten bei Ratten im Hungerzustand oder nach Hepatektomie entsprachen (30, 32). Ungefähr 24 Stunden nach Hepatektomie wurde bei Ratten eine Reduktion der Bindungskapazität von 53 % beobachtet (30). Auch das Schilddrüsenhormon  $T_3$  beeinträchtigt die Bindungskapazität nukleärer Schilddrüsenhormonrezeptoren. Bei Ratten wurde durch  $T_3$ -Gabe im Lebergewebe ein Anstieg der Bindungskapazität der Rezeptoren beobachtet (65). In hypophysären Zellen ( $GH_1$ -Zellen) führte  $T_3$  dagegen zu einer Verminderung der nukleären  $T_3$ -Bindungskapazität des Rezeptors (48, 61, 118). Auch Retinoide, die synergistisch mit Schilddrüsenhormonen das Wachstum und die Entwicklung von Zellen beeinflussen, bewirken sowohl in hoher, als auch in niedriger Konzentration die Verminde-

zung der Kapazität der Schilddrüsenhormonrezeptoren (65, 109). Die Affinität der Schilddrüsenhormonrezeptoren blieb nach Glukagongabe unbeeinflusst, erhöhte sich jedoch nach der Gabe von Retinoiden (108).

Bei hypophysären Zellen wurden in einer Zellkultur nach TRH- oder  $T_3$ -Gabe verminderte mRNA-Spiegel der  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\alpha_1$ -Rezeptoren beschrieben. Die Regulation der Anzahl der Schilddrüsenrezeptorsubtypen erfolgt dem zufolge unter anderem auf prätranslationaler Ebene, also der Ebene der mRNA (72).

### **1.3.5.3 Funktion des Rezeptors**

Das Ausmaß der Schilddrüsenhormonwirkung ist abhängig von der Anzahl der im Gewebe vorhandenen Rezeptoren und auch der Hormonkonzentration im Serum (15, 98, 118). Die Anzahl der Rezeptoren im Gewebe bestimmt dessen Reaktion auf die Schilddrüsenhormone, so daß eine Reduktion der Rezeptoren mit einer verminderten Wirksamkeit der Hormone einhergeht (73).

Die Bindung von  $T_3$  an den Rezeptor führt zu einer Bindung seiner DNA-bindenden 'two finger'-Einheit an das TRE des Zielgens. Diese Bindung geht vermutlich auch mit einer Interaktion weiterer für die Transkription benötigter Faktoren einher, so daß es letztendlich zu einer Induktion der Transkription entsprechender mRNA kommt. Neben diesen aktivierenden Effekten wurde auch die Vermittlung hemmender Effekte durch TRE auf die Transkription der mRNA beobachtet (28). Die gesteigerte, beziehungsweise verminderte mRNA-Synthese führt über entsprechende Veränderungen in der Proteinsynthese zu den typischen metabolischen Effekten von  $T_3$  (28, 67, 133). In einer Studie wurde die Bindung des humanen Schilddrüsenhormonrezeptors an das TRE auch in Abwesenheit von  $T_3$  beobachtet, so daß die Bindung des Liganden vermutlich keine Voraussetzung für die Bindung zwischen Rezeptor und Zielgen ist. Dies läßt vermuten, daß der Rezeptor in Abwesenheit des Hormons die Transkription eher begrenzt und die Bindung des Liganden ( $T_3$ ) zu einer Aufhebung der Repressorfunktion des Rezeptors führt (28). Es besteht eine positive Korrelation zwischen der  $T_3$ -Bindungskapazität des Rezeptors und der Induktion verschiedener metabolischer Effekte durch  $T_3$  in den unterschiedlichen Geweben (140). In Fastenstudien mit Ratten zeigte sich bei gleichzeitig bestehender niedriger  $T_3$ -Serumspiegel eine Reduktion der maximalen  $T_3$ -Bindungskapazität des Rezeptors (14, 33).

### **1.3.6 Schilddrüsenhormone und schwere Allgemeinerkrankungen**

Bei schweren Allgemeinerkrankungen kommt es zu charakteristischen Veränderungen im Schilddrüsenhormonhaushalt. Sie äußern sich in einer Modifizierung auf allen Ebenen der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. Die Veränderungen im Schilddrüsenhormonsystem werden auch unter den Namen Low-T<sub>3</sub>-Syndrom oder „non-thyroidal illness“ zusammengefaßt (140).

#### **1.3.6.1 Veränderungen der Hormonkonzentration**

Im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen sind die T<sub>3</sub>-Spiegel vermindert, so daß man von einem Low-T<sub>3</sub>-Syndrom spricht. Die Ursache dieser absinkenden Konzentration liegt unter anderem an einer geringeren Aktivität des Enzyms 5'-Dejodinase, welches für die Umwandlung von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub> verantwortlich ist (62, 140). Eine weitere Ursache der geringen T<sub>3</sub>-Konzentration ist der bei schweren Allgemeinerkrankungen vorkommende erhöhte Kortisolspiegel, dessen hemmende Wirkung auf die Umwandlung von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub>, und die durch ihn verursachte Verminderung des TRH-Spiegels (140). Bei Patienten mit „non-thyroidal illness“ besteht außerdem eine unterschiedliche Verfügbarkeit von T<sub>3</sub> in den verschiedenen Geweben (133). Die Konzentration von reversem T<sub>3</sub> (rT<sub>3</sub>) steigt, bedingt durch eine verzögerte rT<sub>3</sub>-Clearance und eine erhöhte 5-Dejodination von T<sub>4</sub>, an. Das Ausmaß der Abnahme der T<sub>3</sub>-Konzentration und der Anstieg des rT<sub>3</sub> Serumspiegels korreliert positiv mit dem Grad der Gewebsverletzung. Extrem niedrige T<sub>3</sub>-Spiegel kündigen eine schlechte Prognose der Erkrankung an (140). Die Serumkonzentration von Thyroxin (T<sub>4</sub>) und freiem T<sub>4</sub> ist bei Ratten mit systemischen Erkrankungen ebenfalls erniedrigt (14, 27). Auch bei Menschen mit schweren Allgemeinerkrankungen wurden verminderte bis stark erniedrigte Thyroxinkonzentrationen beobachtet (133, 140). Die Plasmakonzentration von T<sub>4</sub> variiert in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung. Je niedriger die Konzentration, desto ungünstiger ist die Prognose des Patienten (10, 74, 128). Die Veränderung der T<sub>4</sub>-Konzentration basiert zum größten Teil auf einer verringerten Bindung dieses Hormons an Transportproteine (62). In einer Studie mit Patienten im Zustand einer „non-thyroidal illness“, wurde eine Beeinträchtigung der Funktion des Thyroxin-bindenden-Globulins (TBG) durch im Patientenserum existierende Faktoren

beobachtet (44, 122). Hierbei handelt es sich um Faktoren, welche die Bindung von  $T_3$  und  $T_4$  an Transportproteine inhibieren können (106). Dies ist vermutlich eine Ursache für die bei schweren Allgemeinerkrankungen vorkommende relative Erhöhung der freien Serumfraktion von  $T_4$  und  $T_3$  (75). Außerdem zeigte sich eine verminderte Aufnahme von Thyroxin in das Gewebe. Zirkulierende freie Fettsäuren sind vermutlich über eine kompetitive Hemmung der Bindung von  $T_4$  an Transportproteine ursächlich an diesen Veränderungen beteiligt (44, 122).

### **1.3.6.2 Beeinträchtigung der TSH- und TRH-Serumkonzentration**

Die Regulation des TSH-Spiegels erfolgt unter anderem durch die Konzentration der zirkulierenden Schilddrüsenhormone, so daß es bei niedrigen Hormonwerten zu einem Anstieg des TSH kommt und umgekehrt bei hohen Hormonkonzentrationen zu einem Absinken des TSH-Spiegels. Bei Patienten mit Low- $T_3$ -Syndrom wird in der Regel eine normale TSH-Konzentration beobachtet, was zu der Bezeichnung „euthyroid sick syndrome“ führte (140).

Die bei niedriger Hormonkonzentration unter physiologischen Bedingungen zu erwartende gesteigerte Ansprechbarkeit von TSH auf TRH, bleibt bei einem Low- $T_3$ -Syndrom jedoch normal oder ist geringfügig reduziert (92, 133). In einer Patientenstudie wurden bei Patienten mit „non-thyroidal illness“ normale Serumkonzentrationen freier Schilddrüsenhormone und TSH beobachtet. Auch die Ansprechbarkeit von TSH auf eine TRH-Stimulation blieb trotz „non-thyroidal illness“ unbeeinträchtigt. Nach einer Gabe von Glukokortikoiden oder Dopamin (Dopamin hemmt die Ausschüttung von TSH aus der Hypophyse) konnte jedoch eine Erniedrigung dieser zuvor noch normalen Serumspiegel beobachtet werden. Sowohl therapeutisch verabreichte Glukokortikoide als auch Dopamin sind anhand dieser Untersuchungsergebnisse an der Regulation des Schilddrüsenhormonhaushaltes mitbeteiligt (44, 114). Bei einer Studie von van den Berghe et al. wurde durch Dopamininfusion bei schweren Allgemeinerkrankungen die Entwicklung eines Low- $T_3$ -Syndroms mit sehr niedrigen TSH-Konzentrationen beschrieben, und somit der vermutete Zusammenhang zwischen endogen und iatrogen zugeführtem Dopamin und den Veränderungen im Schilddrüsenstoffwechsel bestärkt (134). In einer Studie mit schwerkranken Patienten wurden bei der Messung der TSH-Konzentrationen Abweichungen von den aus bisherigen Studien bekannten Normalwerten beobachtet, die in engem Zusammenhang mit der Mortalität und Prognose der Patienten

standen (114). Subnormale TSH-Werte entstehen vermutlich durch eine verminderte Sekretion von TSH. Die Ursache hierfür kann in der im Rahmen einer „non-thyroidal illness“ auftretenden veränderten Proteinbindungsaffinität der Schilddrüsenhormone, und dem damit verbundenen Anstieg der Konzentration freier Schilddrüsenhormone und negativer hypophysärer Rückkopplungsmechanismen liegen (106, 114).

In der Erholungsphase nach schweren Allgemeinerkrankungen steigt die TSH-Sekretion im Serum langsam wieder an (44).

### **1.3.6.3 Einfluß auf die Schilddrüsenhormonrezeptoren**

Unter verschiedenen pathologischen und physiologischen Bedingungen wurden Veränderungen der nukleären Schilddrüsenhormonrezeptoren beobachtet. Die Kapazität der  $T_3$ -Rezeptoren wird beispielsweise durch Einwirkung von  $T_3$ , Glukagon sowie Retinoiden auf die untersuchten Zellsysteme verändert. In hypophysären Zellen kam es durch  $T_3$  zu einer Verminderung der nukleären Schilddrüsenhormonrezeptoren (48, 61, 72, 118). Glucagon-Infusionen und auch die Einwirkung von Retinoiden führten bei Ratten zu einer Reduktion der maximalen Bindungskapazität nukleärer  $T_3$ -Rezeptoren in Hepatozyten (31, 32). Schwere bakterielle Infektionen (90), Urämie (131) und Neoplasien (129) führten neben der Entwicklung eines Low- $T_3$ -Syndroms ebenfalls zu einer Reduktion der Kapazität hepatischer Schilddrüsenhormonrezeptoren (33, 129). Nach deutlicher Reduktion der Schilddrüsenhormonrezeptorkapazität im Rahmen eines Low- $T_3$ -Syndroms konnte außerdem eine Hemmung der durch  $T_3$  induzierten Malat-Enzymproduktion in der Leber beobachtet werden (33). Die Reduktion der Rezeptorkapazität ist nicht leberspezifisch, sondern ereignet sich im gesamten Körper (131).

Eine Änderung der Affinität von  $T_3$  zu den nukleären Rezeptoren konnte in den beschriebenen Untersuchungen lediglich nach der Gabe von Retinoiden beobachtet werden (108). Sie blieb in den übrigen Untersuchungsmodellen unverändert.

### **1.3.6.4 Schilddrüsenhormone und Zytokine**

Anhand verschiedener Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Zytokinausschüttung und den bei schweren Allgemeinerkrankungen auftretenden Veränderungen des Schilddrü-

senhormonhaushaltes deutlich. Die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gelten als Mediatoren bei Veränderungen im Schilddrüsenhormonstoffwechsel, wie sie bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen sowie anderen schweren Allgemeinerkrankungen beobachtet wurden (19, 62, 97, 107, 135). Unter der Einwirkung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  kam es zu Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit einer Hemmung der TSH-Sekretion (69). In einer weiteren Untersuchung führte die Injektion von humanem rekombinanten TNF- $\alpha$  bei Mäusen zu einer Abnahme der Konzentrationen von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> im Serum und bewirkte eine verminderte Reaktion der Schilddrüse auf TSH, entsprechend der beim „euthyroid sick syndrome“ zu beobachtenden Veränderungen (107). Derartige Veränderungen sowie ein zusätzlich erhöhter Spiegel von rT<sub>3</sub> wurden ebenfalls nach einer Injektion von humanem rekombinanten TNF in einer Patientenstudie beobachtet (135). In einer Studie mit Nagetieren führte die Infusion von IL-1 $\beta$  zu einer verringerten Ansprechbarkeit von TSH auf die Stimulation mit TRH, abnehmenden TSH-Spiegeln im Plasma sowie zu einer signifikanten Verminderung des Plasmaspiegels von freiem T<sub>4</sub> (82). Nach einer einmaligen subcutan injizierten Dosis von humanem rekombinanten IL-1 bei Ratten wurde ein Anstieg des freien T<sub>4</sub> beobachtet. Die Serumkonzentrationen von T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> und TSH waren bei dieser Untersuchung ebenfalls vermindert (40).

Die Zytokine Interleukin-1 und TNF beeinflussen die Stoffwechselfunktion der Thyreozyten. Anhand einer Zellkultur menschlicher Thyreozyten wurde beispielsweise gezeigt, daß sowohl die basale, als auch die durch TSH stimulierte Thyreoglobulin-Sekretion der Thyreozyten durch sehr niedrige Konzentrationen IL-1 $\beta$  erhöht wurde. In Gegenwart hoher IL-1 $\beta$  Spiegel wurde dagegen eine verminderte Thyreoglobulin-Sekretion beobachtet (84, 113). Die Inkubation von Ratten-Thyreozyten (FRTL5-Zellen) mit humanem rekombinanten TNF führte zu einer eingeschränkten Funktion dieser Zellen, die sich in einer Abnahme der durch TSH stimulierten Jodidaufnahme und einer verminderten T<sub>3</sub>-Sekretion widerspiegelte (111). In einer weiteren Studie führte IL-1 $\beta$  bei menschlichen Thyreozyten ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Jodidaufnahme (123) und zu einer Hemmung der durch TSH stimulierten Sekretion von c-AMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) (113). Auch die Konzentration der Bindungsproteine „thyroid hormone binding globulin“ (TBG), Transthyretin und Albumin wird durch Zytokine vermindert. Bei humanen HepG2-Zellen wurden diese Proteine nach Zytokinstimulation in geringeren Mengen synthetisiert (2).

Der Einfluß der Zytokine auf den Schilddrüsenhormonrezeptor wurde in einer in vitro Studie mit humanen HepG2-Zellen deutlich. Hier führten die Zytokine zu einer verminderten Rezeptoranzahl, die anhand einer Reduktion der Bindungskapazität des Rezeptors für T<sub>3</sub> deutlich wurde. Die Affinität des Rezeptors blieb jedoch unbeeinträchtigt (146).

#### **1.4 Problemstellung und Ziel der Arbeit**

Bei den Schilddrüsenhormonrezeptoren stellen die  $\beta$ -Subtypen die Rezeptoren mit einer sehr starken Affinität zu T<sub>3</sub> dar. Der  $\beta_1$ -Subtyp kommt im gesamten Körper vor, wobei er in Niere und Leber am stärksten vertreten ist (66). Er repräsentiert somit einen wichtigen funktionellen Rezeptor bei der Vermittlung der Schilddrüsenhormoneffekte auf die Zellen und die gesamte Stoffwechselsituation des Körpers (67, 130). Die bei schweren Allgemeinerkrankungen auftretenden Veränderungen des Schilddrüsenhormonrezeptors durch Zytokine sollen in dieser Arbeit anhand des  $\beta_1$ -Rezeptors untersucht werden. Hinweise aus vorangegangenen Studien über eine Beeinträchtigung der Rezeptoren auf der prätranslationalen Ebene (72, 143) und die Beobachtung einer Kapazitätsverminderung der Schilddrüsenrezeptoren durch Zytokine (146), veranlaßten uns mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion den Einfluß der Zytokine auf die Regulation der mRNA dieses Rezeptors genauer zu untersuchen.



## **2. Material und Methoden**

Bei der Arbeit im Labor und in der Zellkultur wurde auf äußerste Sauberkeit geachtet, um Verunreinigungen bei der PCR zu vermeiden. Die Arbeitsflächen wurden mit 70 %igem Ethanol gereinigt und mit einem sterilen Tuch (Barrier, Sterile Field. 16 in x 29 in, Johnson & Johnson, Medical Inc., Arlington, Texas, USA) abgedeckt. Um den Kontakt mit giftigen Dämpfen zu vermeiden, wurde im allgemeinen unter einem Abzug gearbeitet (Steril gard hood, The Baker Company, Inc., Sanford, Maine, USA). Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten mit Latex Handschuhen (Satin Plus, Safeskin GMBH, 85375 Neufahrn, Deutschland). Die Pipettenspitzen und Gefäße wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert und, um Verunreinigungen zu vermeiden, erfolgte der Ansatz aller Lösungen, die zur Verarbeitung der Nukleinsäuren benötigt wurden, mit nukleasefreiem DEPC-Wasser oder sterilem Wasser (Aqua bi-distilata).

Bei der Entsorgung der mit radioaktiven Material in Kontakt gekommenen Materialien wurde auf größte Sorgfalt geachtet. Sie erfolgte in 20 Liter Radioaktivitätsentsorgungstonnen.

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Laborgeräte**

- Sterile Arbeitsfläche mit Abzug (steril gard hood), The Baker Company, Inc., Sanford, Maine, USA
- Photometer Beckmann, DU®-62 Spectrophotometer (Ser. Nr. 4296767), Beckmann Instruments Palo Alto, CA, US
- Szintillationszähler,  $\beta$ -Zähler, Packard, USA
- Wasserbad GFL, Gesellschaft für Labortechnik m.b.H+Co., Hannover, Deutschland
- Heizblock Techne, DRI-Block® DB-3, Techne INC., Princeton, NJ, USA
- Destille, Fritz Gössner, Hamburg, Deutschland
- Vortexer VF-2, Janke + Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br., Deutschland
- Kühlzentrifuge, Hettich Mikro rapid/K, Tuttlingen, Deutschland

- Tischzentrifuge, Hettich Mikroliter, Tuttlingen, Deutschland
- Vakuumentrifuge, UniVapo 100 H, Uni Equip Laborgerätebau, Vertrieb A.N. Kraupa, Martinsned, Deutschland

### **2.1.2 Laborbedarf**

- Bechergläser, Meßzylinder, Erlenmeierkolben unterschiedlicher Größe
- Magnetrührer, unterschiedlicher Größe
- Szintillationsgefäße mit Deckel, Packard Instr. Comp., Meriden, CT, USA
- Szintillationsgefäßständer, Packard Servo Tray®, Packard Instr. Comp., Meriden, CT, USA
- Radioaktivitätsentsorgungstonnen (20 Liter), Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Polypropylen-Röhrchen (10 ml), Greiner Labortechnik, Nürtingen, Deutschland
- Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml), Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Pipetten (2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl), Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Gilson Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 250 µl und 1000 µl), Gilson Medical Electronics, S.A.Viliers-le-Be, Frankreich
- Pasteurpipetten, WU, Mainz, Deutschland
- Pipettenspitzen (Gilson) verschiedener Größe: C10, C20 und C200, Gilson Medical Electronics, S.A.Viliers-le-Be, Frankreich
- Eppendorf Standardtips (1000 µl), Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Präzisionsküvetten, HELLMMA®, 10 mm Schichttiefe

### 2.1.3 Photolabor

- Dunkelkammer Konrad Bander, N 72, KW 254 mm/LW 366 mm, Wiesloch, Deutschland
- Photoapparat, Polaroid 600 SE, Polaroid, Japan
- Polaroids 667, 6<sup>1</sup>/<sub>4</sub> x 4<sup>1</sup>/<sub>4</sub>, ISO 3000/30, Polaroid Ltd., St. Albans, England
- Rotfilter, Rot R8 (25) 776 M55, HTMC Filter, Hama® Phot GmbH, Möheim, Deutschland
- Linse Hama Nah, +3 mm M55 (XII), +4 mm M55 (XII), Hama® Phot GmbH, Möheim, Deutschland

### 2.1.4 Zellkultur

- Zellkulturschalen (unbeschichtet): Nunclon™ (100 mm<sup>2</sup>), Nunc Wiesbaden, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen mit Deckel, Nunc Wiesbaden, Deutschland
- Zellkulturflaschen (162 cm<sup>2</sup>), Costar Corporation, MA, USA
- HepG2 Zellen, American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA
- Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), GIBCO, Berlin, Deutschland
- Fetales Kälberserum („fetal calf serum“, FCS), GIBCO, Berlin, Deutschland
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphat buffered saline“, PBS), GIBCO, Berlin, Deutschland
- Trypsin-EDTA-Lösung, GIBCO, Berlin, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin-Lösung, GIBCO, Berlin, Deutschland
- Humanes rekombinantes IL-1 $\beta$ , Research and Diagnostic Systems (R&D), Minneapolis, MN, USA
- Humanes rekombinantes TNF- $\alpha$ , Research and Diagnostic Systems (R&D), Minneapolis, MN, USA
- Ethanolamin, Transferrin, Selen, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

### 2.1.5 PCR

- PCR Maschine (Biometra), Oligonukleotide, TIB-Mol, Berlin, Deutschland
- PCR MIMIC-Construction Kit, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA
- Chroma Spin Column + TE 100, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA
- 1st Strand<sup>TM</sup> c-DNA Synthesis Kit, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA
- Human  $\beta$ -Actin Amplimer Set, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA
- <sup>33</sup>P  $\alpha$ -ATP (1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) NEN, Best.Nr. NEG-612-H
- Ampli<sup>®</sup>Taq-Polymerase 250 U/ $\mu$ l, 5 U/ $\mu$ l, Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA
- 10x-PCR-Puffer (1,5 ml) (100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/w) Gelatine), Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA

### 2.1.6 Elektrophorese

- Elektrophorese Gel-Kammer (RNA), Hoefer Super Sub, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
- Elektrophorese Gel-Kamm (20 well comb, 3 mm thick), Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
- Elektrophorese Gel-Kammer (c-DNA)Wide Mini-Sub Cell, 15x10 cm UVTP Gel Tray, Bio Rad, Hercules, CA, USA
- Elektrophorese Gel-Kamm (20 well comb, 1,5 mm thick), Bio Rad, Hercules, CA, USA
- Agarose (SEA KEM<sup>®</sup>GTG<sup>®</sup>), FMC Bio-Products, Rockland, ME, USA
- Ultra Pure Agarose, Betesha Research Laboratories, Gaithersbury, MD, USA
- Trisborat-Puffer (TBE-Puffer), Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung der HepG2-Zellen**

Die Kultivierung der HepG2-Zellen erfolgte in 162 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 30 ml DMEM und dem Zusatz von 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Mediumwechsel erfolgte, in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit und Mediumverbrauch der Zellen, entweder jeden zweiten Tag oder auch täglich. Nach ungefähr 5 Tagen mußten die Zellen aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung von dem Boden ihrer Kulturflasche gelöst und auf neue Kulturgefäße verteilt werden.

### **2.2.2 Zellstimulation**

Für die Stimulationsexperimente wurden die Zellen auf unbeschichtete Zellkulturschalen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät und mit 8,5 ml DMEM und den bereits genannten Zusätzen versetzt. 48 Stunden vor der Stimulation der subkonfluenten Kulturen erfolgte ein Mediumwechsel mit serumfreiem DMEM, welches Transferrin (5 µg/ml), Ethanolamin (20 µM), Selen ( $2,5 \times 10^{-8}$  Mol/l), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt. Nach 24 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit den bereits erwähnten Zusätzen, so daß nach weiteren 24 Stunden die Stimulation mit rekombinantem Interleukin-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  beginnen konnte. Um eine Zeitabhängigkeit zwischen der Zytokinstimulation und der Zytokineffekte bestimmen zu können, erfolgte der Zusatz der Zytokine nach jeweils 6, 9 und 15 Stunden. Eine Dosisabhängigkeit wurde nach einer neunstündigen Inkubation der Zellen mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in Konzentrationen von 10, 50 und 100 ng/ml untersucht. Vor jeder Stimulation erfolgte ein erneuter Mediumwechsel der entsprechenden Zellkulturschale. Sowohl der unstimulierte Zellansatz, als auch die stimulierten Ansätze wurden als Dreifachansatz untersucht.

### **2.2.3 Zellmorphologie**

Die HepG2-Zellen wuchsen in DMEM mit 10 % FCS gleichmäßig und ohne morphologische Veränderungen. Durch den Zusatz von serumfreien DMEM verminderte sich das Zellwachstum erheblich. Bei der Auswahl der Kulturschalen für die Stimulationsversuche wurde auf ein gleichmäßiges Aussehen und subkonfluentes Wachstum der Zellen geachtet. Durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  waren mikroskopisch keine Veränderungen der Zellmorphologie erkennbar. Für die Isolation der RNA wurden nur diejenigen Kulturschalen ausgewählt, die mikroskopisch unveränderte Zellen aufwiesen, frei von Kontaminationen durch Pilze und Bakterien waren und deren Mediumüberstand klar aussah.

### **2.2.4 RNA-Isolation**

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zellhomogenisation und -lyse mit 1,8 ml denaturierender Solution D (250g Guanidin-isothiocyanat (GIT), 293 ml Aqua bidestilata, 17,6 ml 0,75 M Natriumcitrat (pH 7,0) und 26,4 ml 10 % Sacrosyl (N-Lauroylsarcosine)) und 360  $\mu$ l 2-Mercaptoethanol. Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, mit einer 2 ml Pipette resuspendiert und anschließend in ein 10 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Zur Ausfällung der Proteine und DNA wurden 180  $\mu$ l 2 M Natrium-Acetat (pH 4,0), 1,8 ml wassergesättigtes Phenol und 360  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) dazugegeben und vermischt. Es folgte eine fünfzehnminütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation für zwanzig Minuten bei 4°C und 9000 rpm in einer Kühlzentrifuge.

Hierdurch wurden drei Schichten in den Röhrchen erkennbar, wobei es sich um eine obere wässrige Phase mit gelöster RNA, eine weiße Zwischenschicht aus Proteinen, DNA und denaturierten Makromolekülen und eine untere Phenolphase handelte.

Die RNA-Phase wurde vorsichtig in ein neues 10 ml Röhrchen pipettiert und die beiden anderen Phasen verworfen. Zur Entfernung noch vorhandener Verunreinigungen erfolgte nach Zugabe von gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) eine erneute Zentrifugation bei 4°C für fünfzehn Minuten. Die wässrige Phase wurde anschließend erneut in ein frisches 10 ml Röhrchen überführt.

Zur Fällung der RNA erfolgte die Zugabe gleichen Volumens Isopropanol und anschließender vierundzwanzigstündiger Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Zur weiteren Bearbeitung der Proben wurden diese zwanzig Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, so daß das Präzipitat sedimentierte. Nun wurde der Überstand dekantiert, das RNA-Pellet in 0,3 ml denaturierender Solution D gelöst und die Lösung in ein 2 ml steriles Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit Ethanol, erfolgte eine erneute 24-stündige Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Nach dieser zweiten Fällung wurden die Proben erneut zentrifugiert ( 9000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 min.), der Überstand dekantiert und das RNA-Pellet durch die Zugabe von 1 ml 75 % Ethanol „gewaschen“. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschvorganges wurde das RNA-Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge 15 Minuten getrocknet. Durch anschließende Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser wurde das Pellet wieder gelöst und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.5 Messung des mRNA-Gehaltes**

Die Messung des mRNA-Gehaltes erfolgte photometrisch. Nach der 1:100 Verdünnung der mRNA mit DEPC-Wasser wurde in einer Präzisionsküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm die optische Dichte (O.D.) gemessen. Die Bestimmung der Reinheit der mRNA erfolgte aus dem Quotient  $\text{O.D.}260 \text{ nm}/\text{O.D.}280 \text{ nm}$ , wobei Werte zwischen 1,7 und 2,1 repräsentativ für eine von Proteinresten befreite mRNA waren. Bei Werten außerhalb dieses Bereiches, wurde die entsprechende RNA für weitere Versuche nicht mehr verwendet. Der Gehalt der mRNA wurde mit Hilfe der O.D. bei 260 nm bestimmt. Ausgehend von der bekannten Angabe, eine mRNA Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  entspreche einer O.D. 260 nm von 1, konnte der Gehalt mit dem jeweiligen Wert der O.D. 260 nm berechnet werden. Die Ausbeute einer von uns verwendeten 100 mm Zellkulturschale lag durchschnittlich bei 100-200  $\mu\text{g}$  mRNA.

Anschließend erfolgte die Überprüfung der Reinheit der mRNA anhand einer Gel-Elektrophorese. Nach dem Zusatz eines RNA-Ladepuffers (1mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin und mit DEPC Wasser auf 10ml auffüllen) zu jeweils 5  $\mu\text{g}$  RNA ließen sich die 28 S und die 18 S Untereinheiten der ribosomalen RNA auf einem 1,2 %igen Agarosegel darstellen.

## 2.2.6 Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) hat man die Möglichkeit kleinste Mengen DNA oder mRNA zu amplifizieren und einer Analyse zugänglich zu machen (139).

Die PCR teilt sich in drei Schritte auf. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei einer Temperatur von 94°C und einer Dauer von 45 Sekunden. Anschließend erfolgt die Anlagerung genspezifischer Primer, als Startermoleküle fungierende Oligonukleotide, an das 3'- und 5'-Ende der denaturierten DNA für eine Dauer von 45 Sekunden. Die Temperatur liegt dabei zwischen 55°C und 72°C und ist abhängig von der Primerlänge, der Konzentration der Primer und der Basenzusammensetzung (70). Im dritten Schritt, der Extension, werden mit Hilfe der Taq-Polymerase die Primer über die ganze Länge der Matrize verlängert und die komplementären Stränge gebildet. Die optimale Temperatur liegt hier bei 72°C für eine Dauer von 120 Sekunden. In Abhängigkeit von dem Puffer, dem pH-Wert, der Elektrolytkonzentration und der Beschaffenheit der DNA ergaben Schätzungen einen Nukleotideinbau von 35-100 pro Sekunde (71). Diese drei Schritte zusammen ergeben einen Zyklus der PCR, welcher ungefähr 30-40 mal wiederholt wird. Nach Beendigung der Zyklen erfolgt eine abschließende Extension bei 72°C für 5 Minuten, um sicher zu gehen, daß die amplifizierte DNA aus vollständigen Doppelsträngen besteht (115). Durch anschließende Kühlung auf 4°C wird die Reaktionskette beendet.



### 2.2.6.1 Quantitative kompetitive Polymerasekettenreaktion

Die quantitative kompetitive PCR stellt eine Methode dar, die neben qualitativen Ergebnissen über eine spezifische mRNA, zusätzlich die Möglichkeit bietet, quantitative Ergebnisse aus der Amplifikation geringster Mengen von mRNA (<0,1 ng) zu erhalten (139) (siehe Abb. 2.1).

Die quantitative PCR beinhaltet die Koamplifikation des Zielmoleküls mit einem internen Standard (38, 139). Als interner Standard wird ein nicht homologes DNA-Fragment (MIMIC) verwendet, welches mit dem Zielmolekül (c-DNA des Schilddrüsenhormonrezeptors) um das gleiche Paar genspezifischer Primer konkurriert, sich aber durch seine unterschiedliche Länge von der Ziel-DNA abgrenzen läßt (57, 139). Bei der c-DNA des Schilddrüsenhormonrezeptors handelt es sich um eine einsträngige Nucleinsäure, welche vor Beginn der PCR mit Hilfe der reversen Transkriptase komplementär zu der entsprechenden RNA-Sequenz des Schilddrüsenhormonrezeptors hergestellt wurde. Durch die Herstellung einer Verdünnungsreihe des MIMICS mit bekannten DNA-Konzentrationen und deren Zusatz zu einer konstanten Menge c-DNA, läßt sich am Ende der PCR eine Aussage über die Konzentration des Zielmoleküls machen. Durch die Annahme einer 100 %igen Effizienz der reversen Transkription der RNA in c-DNA, ist ein Rückschluß von der Konzentration des Zielmoleküls auf die mRNA-Konzentration möglich (79).

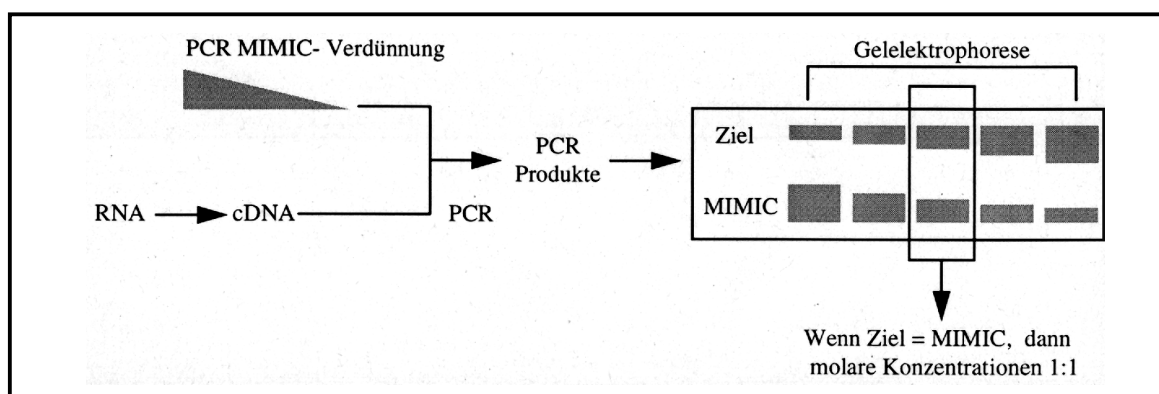


Abb. 2-1: Prinzip der quantitativen kompetitiven PCR

Der Vorteil dieser quantitativen kompetitiven PCR gegenüber nicht-kompetitiver PCR besteht darin, daß Störeinflüsse während der Amplifikation sowohl auf MIMIC als auch auf c-DNA wirken, ihr Verhältnis zueinander daher gleich bleibt, und somit das Ergebnis durch eventuelle minimale Verunreinigungen nicht beeinträchtigt wird (57, 139). Auch die Konzentrationsbestimmung muß durch dieses konstant bleibende Verhältnis nicht ausschließlich in der exponentiellen Phase der PCR erfolgen (20, 38, 139).

## **2.2.6.2 Primer**

### **2.2.6.2.1 Genspezifische Primer**

Genspezifische Primer sind als Startermoleküle fungierende Oligonukleotide. Sie heften sich, entsprechend der komplementären Basen der Ziel-DNA, an dessen 5'- und 3'- Ende. Die anschließende Amplifikation dieses DNA-Abschnittes wird durch Anlagerung weiterer komplementärer Nukleotide fortgesetzt. Bei der Primerauswahl wurde auf folgende Eigenschaften geachtet. Ihre Länge sollte zwischen 18 und 28 Nukleotiden und der Gehalt der Basen Guanin und Cytosin bei 50-60 % liegen. Der ideale Schmelzpunkt ( $T_{ms}$ ) liegt zwischen 55°C und 80°C. Außerdem wurde bedacht, keine komplementären Basen an den 3'- Enden der Primer zu erhalten, um die Vereinigung beider Primer zu verhindern, und die PCR Ausbeute nicht zu beeinträchtigen (70).

Die Primersuche erfolgte mit Hilfe der Nukleotidsequenz des humanen c-erb-A Gens, welches einen Rezeptor kodiert, der analog zu dem des humanen Schilddrüsenhormonrezeptors ist und die entsprechenden Funktionen und Affinität zu den Schilddrüsenhormonen besitzt (141).

Für die kompetitive PCR wurde der Plus-Strang Primer mit der Sequenz 5'-AACCCCAACAGTATGACAGAAAAT- 3', einem Guanin-Cytosin-Gehalt von 40 % und einem Schmelzpunkt bei 59,7°C verwendet. Der Minus-Strang Primer besaß die Sequenz 5'-ACGTGATACAGCGGTAGTGATACCC- 3', einen Guanin-Cytosin-Gehalt von 52 % und der Schmelzpunkt ( $T_m$ ) lag bei 60,9°C. Beide Stränge bestanden aus je 25 Basenpaaren. Diese genspezifischen Primer fungierten als Startermoleküle für die Amplifikation der DNA des

$\beta_1$ -Schilddrüsenhormonrezeptors bestehend aus 367 Basenpaaren (bp) und zwischen den Nukleotiden 288 bis 655 liegend.

### 2.2.6.2.2 MIMIC-Primer

PCR MIMIC-Primer sind zusammengesetzte, synthetische Oligonukleotide, die aus den bereits beschriebenen genspezifischen Primern und einem zusätzlichen Strang von 20 Nukleotiden bestehen. Die Sequenz dieser 20 bp besteht aus den entsprechenden komplementären Basen eines nicht-homologen DNA-Fragmentes, einem Restriktionsfragment, BamH I/EcoR I, des v-erbB Gens mit 574 bp (Clontech Lab. Palo Alto, CA, USA).

#### Herstellung der PCR MIMICS

Die Herstellung der MIMICS erfolgte nach einer Versuchsanleitung der Firma Clontech in zwei aufeinanderfolgenden PCRs und ist in Abb. 2.2 graphisch dargestellt.

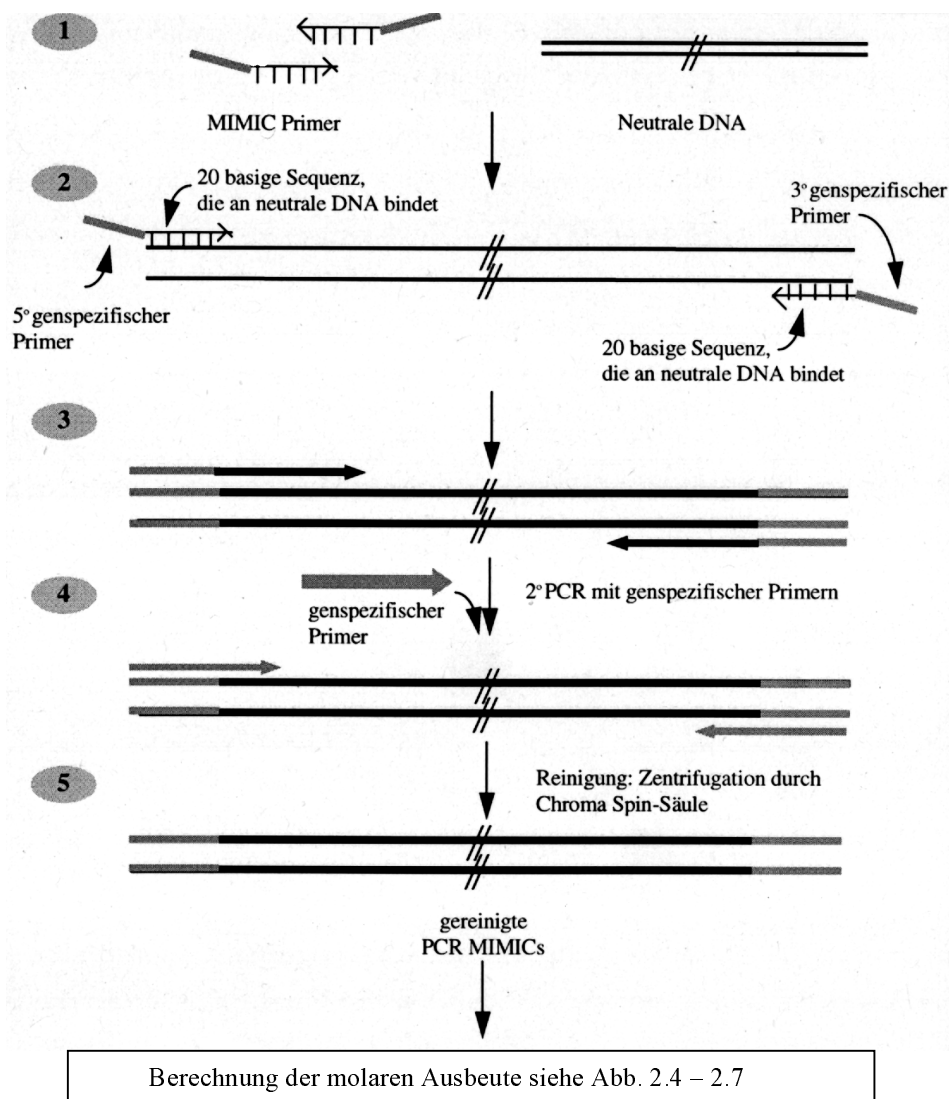


Abb. 2-2: Herstellung der PCR MIMICS

In der ersten PCR wurden die zusammengesetzten MIMIC-Primer (genspezifische Primer aus 25 bp + Sequenz von 20 Nukleotiden komplementär zur nicht-homologen DNA) und die nicht-homologe DNA hybridisiert, so daß die für den Schilddrüsenhormonrezeptor spezifischen Primer-Bindungsstellen in die nicht-homologe DNA eingebaut werden konnten. Der PCR-Ansatz enthielt 5 µl 10x-Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (w/v) Gelatine), 1 µl dNTP mix (10 mM), 4 µl der nicht-homologen DNA (2 ng), je 0,4 µM der MIMIC Primer und 0,4 µl AmpliTaq® DNA-Polymerase (5 U/µl). Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die PCR beinhaltete die Denaturierung bei 94°C für 45 Sekunden, anschließende Hybridisierung der Primer bei 60°C für weitere 45 Sekunden und eine abschließende Extension bei 72°C für 90 Sekunden. Insgesamt wurden 16 Zyklen durchlaufen und das Ergebnis anhand einer Gel-Elektrophorese überprüft. Dazu wurden auf ein mit Ethidiumbromid beladenen Agarosegel (1,5 %) 5 µl des PCR-Produktes, 3 µl Wasser und 2 µl Ladepuffer aufgetragen. Ein hierzu parallel laufender Marker (ΦX174/HaeIII) 0,5 µl + 7,5 µl Wasser + 2 µl Ladepuffer diente als Kontrolle für die richtige Lage und Größe der MIMICS, die als Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht wurden.

Anschließend wurden 2 µl des Produktes dieser PCR mit 198 µl Wasser verdünnt (1:100). Die zweite PCR erfolgte dann mit dem Einsatz von 2 µl dieser Verdünnung, 10 µl 10x Puffer bestehend aus den oben erwähnten Zusätzen, 2 µl dNTP mix, je 0,4 µM der MIMIC Primer und 0,6 µl AmpliTaq® DNA-Polymerase. Der gesamte Ansatz wurde auf 100 µl aufgefüllt und mit der gleichen Menge Mineralöl überschichtet. Nach dem Durchlaufen von 18 PCR-Zyklen erfolgte wiederum eine Kontrolle des PCR-Produktes auf einem 1,5 %igen Agarosegel unter Verwendung eines Markers (ΦX174/HaeIII). Durch diese zweite PCR wurde sichergestellt, daß alle MIMICS die komplette Sequenz der genspezifischen Primer enthielten.

### Reinigung der PCR MIMICS

Zur Entfernung von Primerresten und andere Reaktionskomponenten wurden je 45 µl des zweiten PCR-Produktes durch jeweils eine Säule gepreßt und dadurch von Verunreinigungen befreit. Die dazu verwendeten pre-spun CHROMA SPIN + TE-100 Säulen wurden mit dem

PCR-Produkt beladen und anschließend bei 4°C und 2500 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Auf diesem Weg konnte das PCR-Produkt von Verunreinigungen befreit werden. Anschließend erfolgte die Überprüfung des gereinigten PCR-Produktes und seiner Banden auf einem mit Ethidiumbromid beladenen Agarosegel.

### Bestimmung der PCR-Ausbeute

Um die PCR-Ausbeute bewerten und berechnen zu können, wurde erneut eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Mit deren Hilfe konnte die Intensität der Banden des PCR-MIMICS mit den Banden des in verschiedenen Konzentrationen eingesetzten Markers ( $\Phi$ X174/Hae III) verglichen werden. Zunächst erfolgte die Herstellung von drei Verdünnungsreihen des Markers mit dem Gehalt von 100 ng, 200 ng und 400 ng Marker-DNA. Das gereinigte PCR-MIMIC wurde mit 6,5  $\mu$ l Wasser, 1,5  $\mu$ l 10x PCR Puffer und 2  $\mu$ l Ladebuffer verdünnt, bevor 5  $\mu$ l davon zusammen mit je 5  $\mu$ l der drei Markerverdünnungen auf das Gel aufgetragen wurden. Unter UV-Licht konnte nun diejenige Bande der Markerverdünnungen herausgefunden werden, die mit der Bande des PCR-MIMICS übereinstimmte (Abb. 2.3).

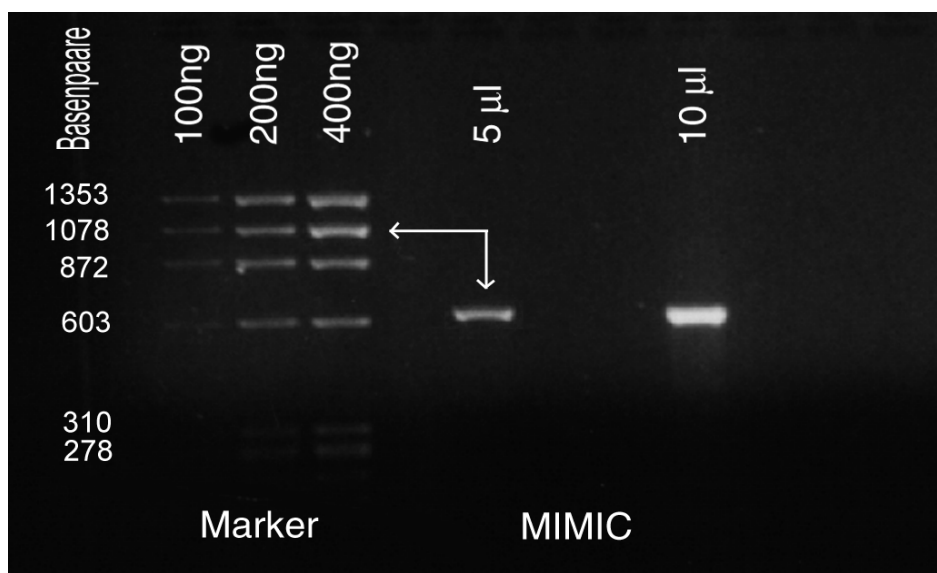


Abb. 2-3: Gel-Elektrophorese zum Vergleich von Marker- und MIMIC-Banden

*Die Übereinstimmung des MIMICs lag bei einer Markerkonzentration von 400 ng und einer Bandengröße von 1078 bp*

Die Berechnung der Ausbeute konnte nun, da der DNA-Gehalt des Markers und die Banden-  
größe im Verhältnis zur Gesamtgröße bekannt waren, nach folgender Formel berechnet wer-  
den:

$$\text{MIMIC Ausbeute} = \frac{(\text{Größe des } \Phi 174 \text{ DNA Fragmentes}) \cdot (\text{Menge der } \Phi 174 \text{ DNA})}{(\text{Summe aller } \Phi 174 \text{ DNA Fragmente}) \cdot (\text{eingesetztes MIMIC Vol.})}$$

*Abb. 2-4: Allgemeine Formel zur Berechnung der MIMIC-Ausbeute*

Um das Ergebnis in molaren Mengen anzugeben, wurde der Umrechnungsfaktor: 1 ng/μl  
eines 500 bp DNA-Fragmentes entspricht  $3 \times 10^3$  attomol/μl einer Nukleinsäure verwendet,  
und das Ergebnis nach folgendem Dreisatz berechnet:

$$\frac{1 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \text{ DNA}_{500 \text{ bp}}}{\text{MIMIC Ausbeute} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)} = \frac{3 \cdot 10^3 \frac{\text{attomol}}{\mu\text{l}}}{x}$$

*Abb. 2-5: Allgemeine Formel zur Umrechnung der MIMIC-Ausbeute von ng/μl in attomol/μl*

Für das in Abbildung 2.3 dargestellte PCR-Produkt ergibt sich nach Anwendung der oben  
erwähnten Formel folgende MIMIC-Ausbeute:

$$\text{MIMIC Ausbeute} = \frac{1078 \text{ bp} \cdot 400 \text{ ng}}{5386 \text{ bp} \cdot 5 \mu\text{l}}$$

$$\text{MIMIC Ausbeute} = 16,01 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$$

Abb. 2-6: Berechnung der MIMIC-Ausbeute unserer Versuche  
 dem folgenden Dreisatz:

l errechnete sich aus

$$\frac{1 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \text{ DNA}_{500 \text{ bp}}}{16,01 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \text{ DNA}} = \frac{3 \cdot 10^3 \frac{\text{attomol}}{\mu\text{l}}}{x}$$

$$x = \frac{16,01 \cdot 3 \cdot 10^3}{1} \frac{\text{attomol}}{\mu\text{l}}$$

$$x = 48030 \frac{\text{attomol}}{\mu\text{l}}$$

Abb. 2-7: Umrechnung der MIMIC-Ausbeute unserer Versuche anhand der Formel aus Abb. 2-5

Anschließend wurden die MIMICs mit einer MIMIC-Verdünnungslösung (50 µg/ml ultra-reines Glykogen) auf 100 attomol/µl verdünnt und bei 4°C gelagert. Dieses MIMIC-Produkt stellte die Stammlösung für die Erstellung einer Verdünnungsreihe dar, deren Konzentrationen zwischen  $5 \times 10^{-4}$  und  $3 \times 10^{-5}$  attomol/µl lagen. Diese Verdünnungsreihe wurde ebenfalls bei 4°C gelagert und für jeden Versuchsansatz neu hergestellt.

### 2.2.7 c-DNA Synthese

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach einer Anleitung der Firma Clontech Laboratories, Inc (20). Für die c-DNA Synthese wurde aus einem Triplicate der isolierten RNA Proben, von denen je 0,333 µg RNA eingesetzt wurden, eine Gesamt-RNA hergestellt. 1 µg dieser RNA wurde anschließend in ein 5 µl Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC-Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 1 µl Oligo (dT) Primer (=Oligonukleotide be-

stehend aus 12 bis 18 Nukleotiden) und einer Zentrifugation für zwei Minuten bei 3000 rpm erfolgte eine Inkubation für zwei Minuten bei 70°C in einer PCR-Maschine. Dieser Vorgang ermöglichte die Anheftung der Oligo (dT) Primer an das Poly-(A)-Ende der RNA. Anschließend wurden die Röhren auf Eis gestellt. Um eventuelle Pipettierfehler zu vermeiden und gleiche Versuchsbedingungen für jede zu synthetisierende c-DNA zu schaffen, wurde für die weitere Synthese der c-DNA zunächst ein Master Mix hergestellt. Dieser enthielt pro Röhren 4,0 µl 5x Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3mM Mg Cl<sub>2</sub>); 1,0 µl dNTP Mix (10 mM jeder Base), 0,5 µl recombinanten RNase Hemmers (1U/µl) und MMLV reverse Transkriptase ( $\geq 200$  U/µg RNA). Von diesem Master Mix wurden jeweils 6,5 µl zu jeder RNA Probe pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für sechzig Minuten bei 42°C in der PCR-Maschine. Beendet wurde die c-DNA Synthese durch Erhitzen auf 94°C für fünf Minuten, was zusätzlich jegliche eventuell vorhandene DNase-Aktivität zerstörte. Die Proben wurden dann mit 80 µl DEPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt, zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

## **2.2.8 Quantitative PCR**

### **2.2.8.1. Versuchsaufbau und Durchführung**

Bei der Durchführung der quantitativen PCR diente die Versuchsanleitung der Firma Clontech Laboratories, Inc. (20) als Vorlage.

Zunächst wurden 2 µl der c-DNA und 2 µl der PCR-MIMIC Verdünnungsreihe bei Raumtemperatur in sechs entsprechend beschriftete, sterile Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Herstellung eines Master Mixes, der pro Reaktionsansatz 5 µl eines 10 x-Reaktionspuffers (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % (w/v) Gelatine), 0,4 µM der genspezifischen Primer, 1 µl dNTP Mix (10 mM jeder Base), 0,4 µl AmpliTaq® DNA-Polymerase und 1 µCi <sup>33</sup>P markiertes dATP enthielt. Um ein Reaktionsvolumen von 50 µl zu erhalten, wurden die Proben mit destilliertem Wasser aufgefüllt und anschließend mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Proben durchliefen 40 Zyklen in einer PCR-Maschine mit den entsprechenden Schritten wie der Denaturierung bei 94°C für 45 Sekunden, der Anlagerung der Primer bei 60°C für weitere 45 Sekunden und der Kettenverlängerung bei 72°C für 120 Sekunden. Nach dem Durchlauf dieser 40 Zyklen



verlängerung bei 72°C für 120 Sekunden. Nach dem Durchlauf dieser 40 Zyklen endete die PCR mit dem Heizen auf 72°C über sieben Minuten und anschließender Abkühlung auf 4°C.

### **2.2.8.2. Auswertung der PCR**

Die Beurteilung und Auswertung des PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese. Verwendet wurde ein 2 %iges Agarosegel und ein 0,5 x Trisborat EDTA-Puffer.

Dem Agarosegel wurden 5 µl Ethidiumbromid zugesetzt, um die PCR Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Von dem PCR-Produkt wurden 8 µl in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend 2 µl eines PCR Ladepuffers (30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenolblau; ad. DEPC-Wasser) zugesetzt, bevor die gesamte Probe auf das Gel geladen wurde. In einer Dunkelkammer erfolgte unter UV-Licht die Kontrolle der Banden, die dann unter Verwendung einer +3 mm und +4 mm Linse und eines Rotfilters fotografiert wurden. Anschließend wurden die Banden einzeln ausgeschnitten, in Zählgefäße mit Szintillationsflüssigkeit überführt und in einen entsprechenden Szintillationsgefäßständer gestellt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem  $\beta$ -Zähler.

### **2.2.9 Statistische Analyse und Auswertung**

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde von dem Grundsatz ausgegangen, daß die absolute zugeführte Menge MIMIC dann der Menge des Zielmoleküls entspricht, wenn das molare Verhältnis zwischen Zielmolekül und dem MIMIC ähnlicher Bandenbreite gleich ist. Dies ist der Fall, wenn gleichwertige Mengen Radioaktivität sowohl in das MIMIC als auch in das Zielmolekül eingebaut wurden (127).

Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft EXCEL Version 5.0 erfolgte die graphische Auswertung der gemessenen Radioaktivität der einzelnen PCR-Produkte und die Berechnung der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors.

Durch Auftragen des Verhältnisses der Radioaktivität der c-DNA und der entsprechenden MIMIC Bande gegen den reziproken Wert der eingesetzten MIMIC Konzentration wurde eine quantitative Aussage in molaren Mengen ermöglicht. Durch die Annahme, daß die Synthese der c-DNA aus der gesamt RNA bei ungefähr 100% liegt, sind Abschätzungen aus den er-

rechneten molaren Mengen der c-DNA auf relative Veränderungen auf mRNA Ebene möglich (Clontech MIMIC construction kit protocol).

Die Ergebnisse sind in attomol/ $\mu$ g RNA als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### 3. Ergebnisse

In den hier vorgestellten Experimenten wurde der Einfluß der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  auf die mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors untersucht. Die Untersuchungen erfolgten anhand einer Zellkultur mit HepG2-Zellen. Diese Zellen ähneln in ihrer Funktion und ihrem Sekretionsmuster denen normaler menschlicher Hepatozyten. Sie besitzen Schilddrüsenhormonrezeptoren, die in ihren biochemischen Eigenschaften mit denen menschlicher Hepatozyten vergleichbar sind. Der in den hier dargestellten Experimenten untersuchte  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor repräsentiert die in der Leber und HepG2-Zellen vorherrschende Rezeptorform (85, 100).

#### 3.1 c-DNA Synthese des Schilddrüsenhormonrezeptors

Nach der Anleitung der Firma Clontech Laboratories und anhand der in 2.2.7 bereits beschriebenen Versuchsdurchführung wurde die c-DNA aus einem Dreifachansatz der zuvor isolierten RNA-Proben des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors hergestellt. Die Reinheit der c-DNA wurde anschließend anhand einer Gel-Elektrophorese geprüft (siehe Abb. 3.1).

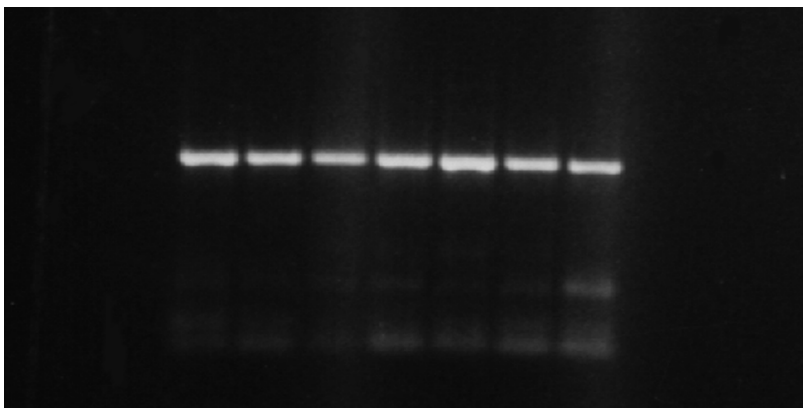


Abb. 3-1: Qualität der c-DNA Synthese

*Abb. 3-1 zeigt das Ergebnis der c-DNA Synthese nach Amplifikation mehrerer Proben gleicher DNA*

Die Überprüfung der Qualität unserer hergestellten c-DNA erfolgte mit Hilfe des Human  $\beta$ -Actin Control Amplimer Set. Hierbei wurde eine Probe eines ubiquitär vorkommenden „Housekeeping Gens“ gemeinsam mit einer negativ Kontrolle und einer positiv Kontrolle (c-DNA aus den Stimulationsversuchen) in einer PCR amplifiziert und anschließend auf ein Elektrophorese-Gel aufgetragen

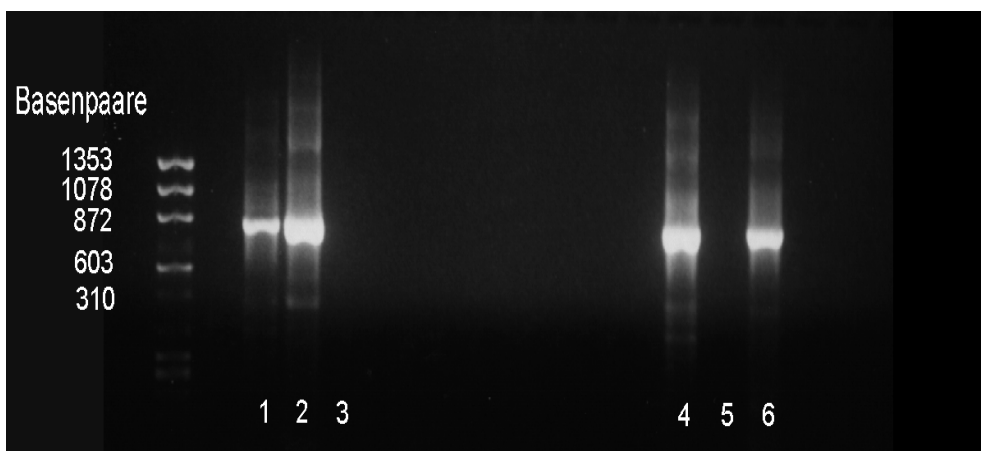


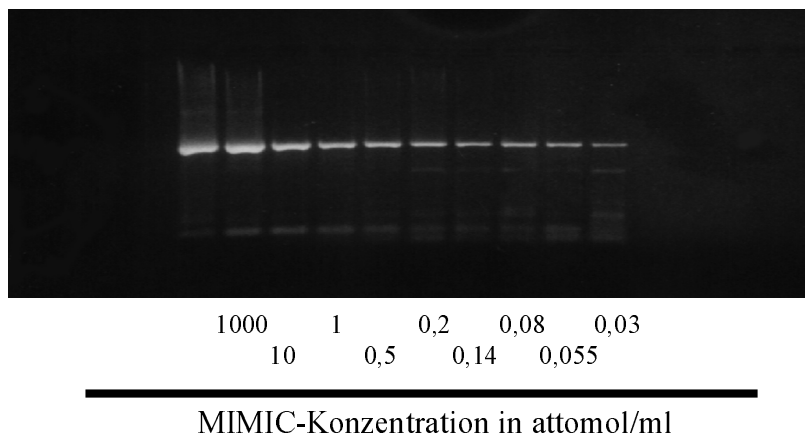
Abb. 3-2: Gel-Elektrophorese einer Qualitätsprüfung der c-DNA

*Hierbei wurde ein ubiquitär vorkommendes "Housekeeping Gen" humanes  $\beta$ -Actin, transkribiert und amplifiziert. In Reihe 3 und 5 wurden Negativkontrollen aufgetragen. Die Reihen 1, 2, 4 und 6 enthalten gleiche Mengen c-DNA, die mit Primern für humanes  $\beta$ -Actin amplifiziert wurden.*

### 3.2 Ergebnis der PCR MIMIC-Herstellung

Ein typisches Beispiel einer in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten PCR MIMIC Verdünnungsreihe, die nach der Versuchsbeschreibung in 2.2.6.2.2 aus einer MIMIC Stamm-lösung hergestellt wurde, ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Konzentrationen dieser Ver-

dünnungsreihe lagen zwischen  $5 \times 10^{-4}$  und  $3 \times 10^{-5}$  attomol/ $\mu$ l und wurde für jeden Versuchsansatz neu hergestellt (siehe Abb. 3.3).



*Abb. 3-3: MIMIC Verdünnungsreihe mit Angabe der entsprechenden Konzentrationen aus den beschriebenen Versuchsansätzen*

### 3.3 Quantitative kompetitive PCR

Nach der in 2.2.8 beschriebenen Versuchsanleitung wurde eine quantitative PCR für die einzelnen Versuchsansätze durchgeführt. Zunächst wurden 2  $\mu$ l der c-DNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors und 2  $\mu$ l der PCR-MIMIC Verdünnungsreihe in insgesamt sechs Reaktionsgefäße pipettiert. Nach dem Zusatz der für die PCR notwendigen Substanzen, durchliefen die Proben 40 Zyklen in der PCR-Maschine mit den bereits in 2.2.8 beschriebenen Schritten. Ein typisches Beispiel einer quantitativen kompetitiven PCR unserer Versuche ist in Abbildung 3.4 dargestellt. In der hier dargestellten Gel-Elektrophorese entspricht die obere Bande der nicht-homologen DNA (MIMIC, 606 bp) in absteigender am unteren Bildrand angegebenen Konzentrationen. Die untere Bande entspricht der c-DNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors (Zielmolekül, 367 bp).

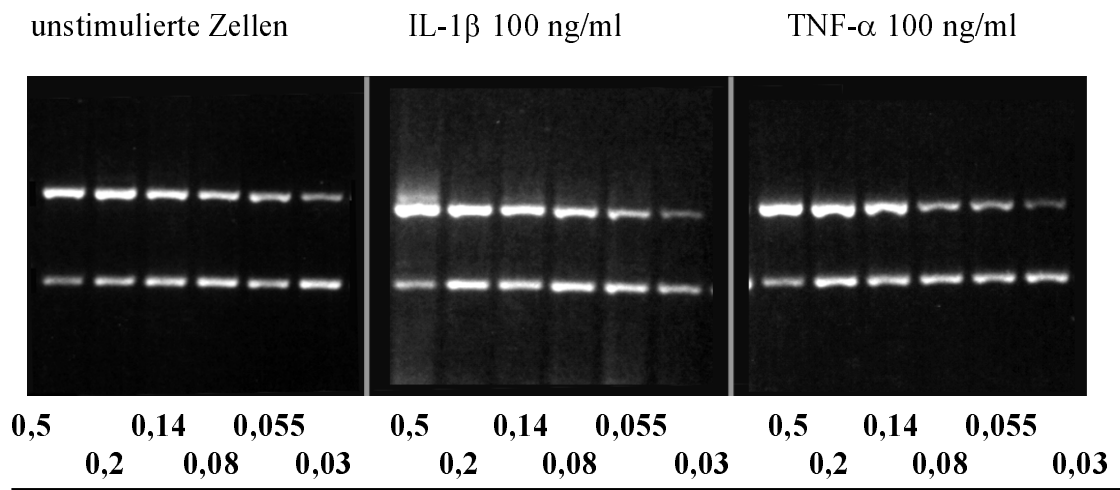


Abb. 3-4: Beispiel einer quantitativen kompetitiven PCR unserer Versuche nach Koamplifikation bekannter Konzentrationen einer nicht-homologen DNA (MIMIC) und der  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor c-DNA mit einem Paarspezifischer Primer.

### 3.4 Unstimulierte Zellen

Nach der statistischen Auswertung der einzelnen PCR-Ergebnisse der unstimulierten Zellen aller durchgeführten Stimulations- und Zeitversuche ergaben sich die folgenden Ergebnisse. Über einen Beobachtungszeitraum von 15 Stunden ist in unstimulierten Zellen tendentiell eine über die Zeit ansteigende mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors zu beobachten. Eine statistisch signifikante Veränderung der mRNA-Konzentrationen des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors besteht jedoch nicht (siehe Abb. 3.5).

Die mRNA-Spiegel lagen in einem typischen Experiment nach 6 Stunden bei  $0,2 \pm 0,05$  attomol/ $\mu\text{g}$  RNA, nach 9 Stunden bei  $0,22 \pm 0,03$  attomol/ $\mu\text{g}$  RNA und nach 15 Stunden bei  $0,27 \pm 0,01$  attomol/ $\mu\text{g}$  RNA.

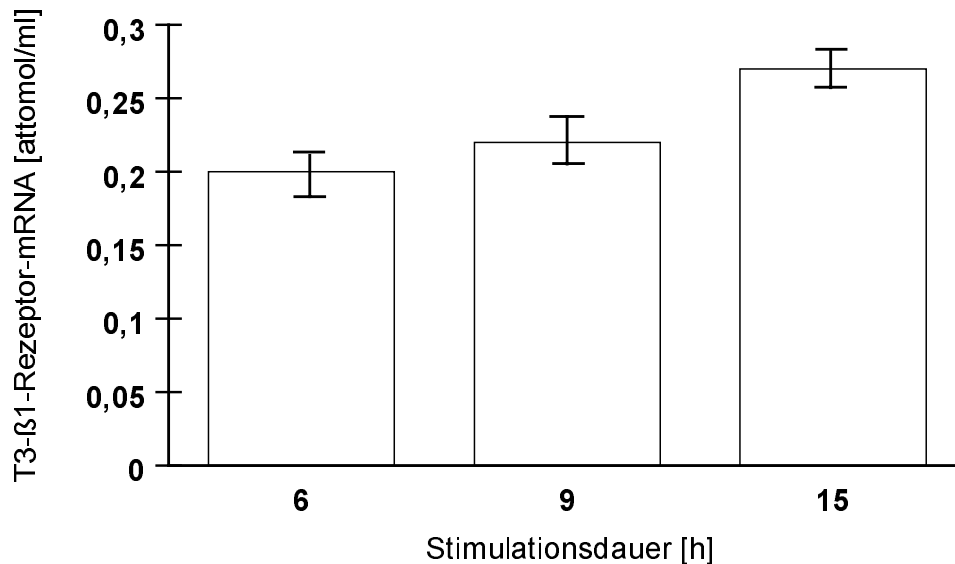


Abb. 3-5: mRNA-Konzentrationen in unstimulierten Kontrollzellen über einen Zeitraum von 15 Stunden

### 3.5 Zytokineffekte

#### 3.5.1 Zeitabhängigkeit

Um die Effekte der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  auf die mRNA Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer zu beobachten wurde ein 15-stündiger Zeitversuch durchgeführt. Im Rahmen dieses Versuches wurden HepG2-Zellen mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von jeweils 100 ng/ml stimuliert (Abb. 3.6).

Nach einer Stimulationszeit von sechs Stunden konnte bei den mit Interleukin-1 $\beta$  stimulierten Zellen eine geringe Abnahme der mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors auf  $0,16 \pm 0,02$  attomol/ $\mu\text{g}$  RNA beobachtet werden. Dieser Wert entsprach einer Konzentration von 77 % der unstimulierten Kontrollzellgruppe. IL-1 $\beta$  führte in einem Stimulationszeitraum von 9

Stunden zu einer stärkeren Reduktion der mRNA-Spiegel. Die Werte reduzierten sich um 52 % im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen und lagen bei  $0,11 \pm 0,01$  attomol/ $\mu$ g RNA. Nach einer Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  wurden sowohl nach sechs als auch nach neun Stunden jeweils geringere Konzentrationen als für IL1- $\beta$  gemessen. Die mRNA-Spiegel lagen nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  und einem Zeitraum von 6 Stunden bei  $0,09 \pm 0,03$  attomol/ $\mu$ g RNA und nach 9 Stunden bei  $0,1 \pm 0,02$  attomol/ $\mu$ g RNA. Dies entsprach im Vergleich zu Kontrollzellen einer Reduktion um 54 % (6h) beziehungsweise 55 % (9h). Nach 15-stündiger Inkubationszeit deutete sich bei den mit IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen eine Erholung der Zellen an. Die mRNA-Konzentration für den  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor lag bei  $0,16 \pm 0,12$  attomol/mg RNA und somit deutlich über dem nach 9 Stunden gemessenen Wert. Die mRNA-Spiegel der mit TNF- $\alpha$  stimulierten HepG2-Zellen blieben mit Werten von  $0,07 \pm 0,25$  attomol/ $\mu$ g RNA jedoch auch nach 15 Stunden deutlich erniedrigt.

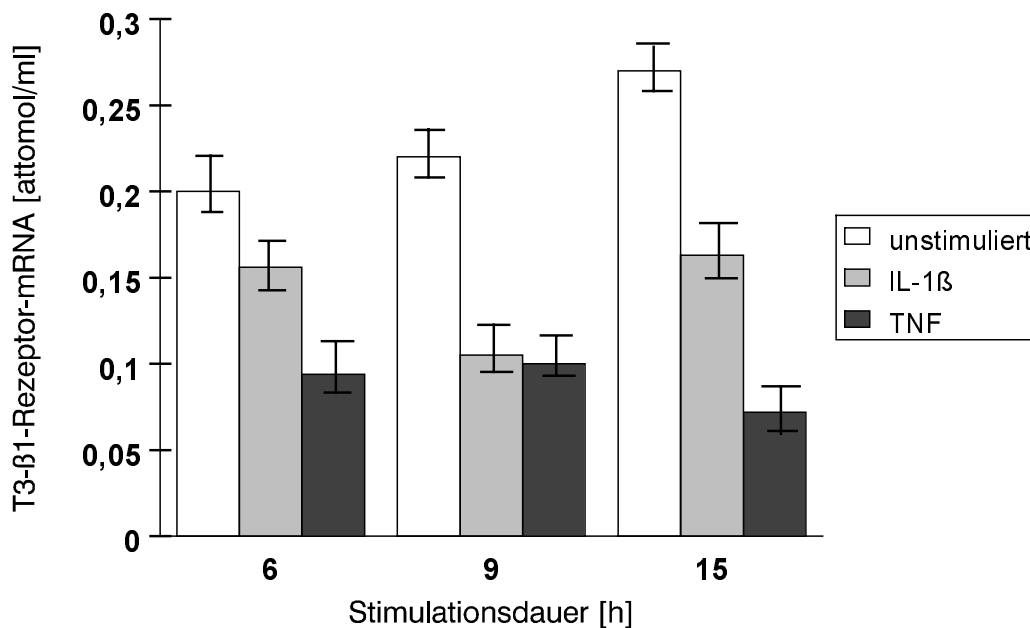


Abb. 3-6: mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -Schilddrüsenhormonrezeptors nach Stimulation mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen

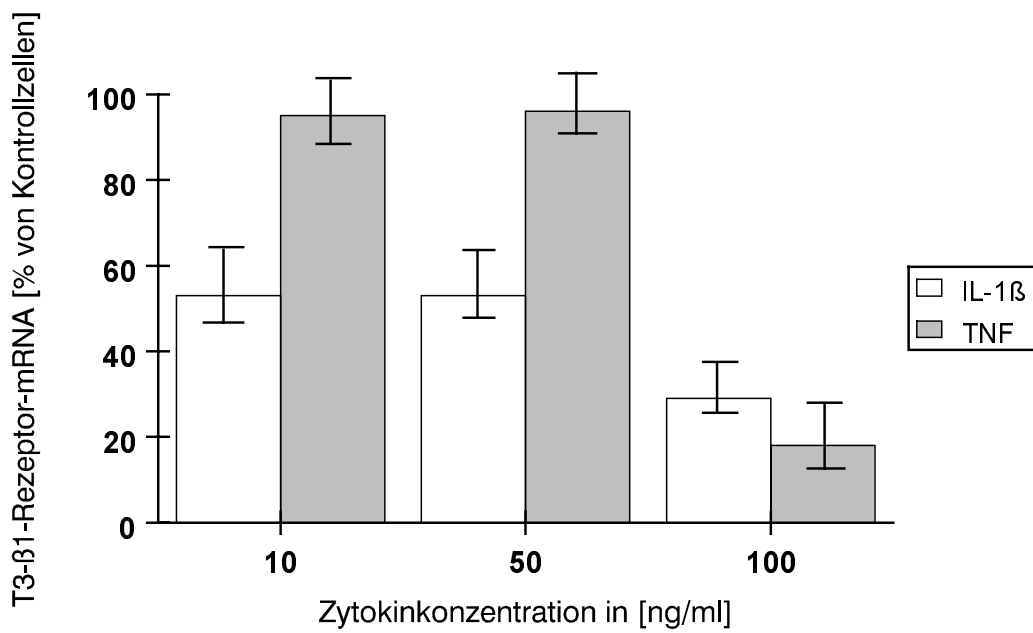
### 3.5.2 Dosisabhängigkeit

Nach Zytokinstimulation wurden in dem beschriebenen Zeitversuch für den Zeitraum von neun Stunden sowohl für IL-1 $\beta$  als auch für TNF- $\alpha$  deutlich erniedrigte mRNA-Spiegel der  $\beta_1$ -Form des T<sub>3</sub>-Rezeptors im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen beobachtet. Dieser Zeitraum wurde daher in den nun folgenden Versuchen gewählt, um die Frage der Dosisabhängigkeit der bisherigen Ergebnisse zu untersuchen. In den HepG2-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von Zytokinen stimuliert wurden, konnte nach einer Inkubationszeit von neun Stunden eine dosisabhängige Abnahme der  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor mRNA-Spiegel beobachtet werden (Abb. 3.7).

Die Inkubation mit Interleukin-1 $\beta$  in einer Konzentration von 10, 50 und 100 ng/ml führte zu einer Reduktion der Rezeptor-mRNA auf Werte von  $0,09 \pm 0,01$  attomol/ $\mu$ g RNA,  $0,09 \pm 0,03$  attomol/ $\mu$ g RNA und  $0,05 \pm 0,02$  attomol/ $\mu$ g RNA. Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellgruppen entsprechen diese Werte einer Verminderung der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors auf 53 %, 53 % und 29 %. Eine Suppression der mRNA-Spiegel der  $\beta_1$ -Form des T<sub>3</sub>-Rezeptors durch IL-1 $\beta$  ist bereits bei einer Inkubation mit niedrigen Zytokinkonzentrationen erkennbar, erreicht aber erst in einer Konzentration von 100 ng/ml einen signifikanten Effekt. Eine signifikante suppressive Wirkung konnte für Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ebenfalls erst in Konzentrationen von 100 ng/ml nachgewiesen werden. Die mRNA-Konzentrationen lagen hier bei  $0,03 \pm 0,01$  attomol/ $\mu$ g RNA. Dies entspricht im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellgruppen einer Reduktion der mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors auf 19 %. Nach der Inkubation mit 10 und 50 ng TNF/ml lagen die mRNA-Spiegel deutlich oberhalb der für IL-1 $\beta$  gemessenen Werte.

Die mRNA-Konzentrationen des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors lagen nach einer Stimulation mit 10 ng TNF/ml bei  $0,16 \pm 0,02$  attomol/ $\mu$ g RNA und nach einer Stimulation mit 50 ng TNF/ml bei  $0,17 \pm 0,01$  attomol/ $\mu$ g RNA. Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen entsprechen diese Werte einer Reduktion der mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors um jeweils 4 %, so daß unter der hier eingesetzten TNF-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellgruppen keine bedeutende Verringerung der mRNA-Konzentrationen zu beobachten war.





*Abb. 3-7: dosisabhängige suppressive Effekte der Zytokine IL1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  auf die mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -Schilddrüsenhormonrezeptors in Prozent der unstimulierten Kontrollzellen*

## **4. Diskussion**

### **4.1 Auswahl der Versuchsbedingungen**

#### **4.1.1 Vorteile der Verwendung von HepG2-Zellen**

Die Untersuchung der Regulation der mRNA des  $\beta_1$ -Schilddrüsenhormonrezeptors erfolgte an einem Zellkulturmodell mit HepG2-Zellen. Die Leber enthält eine hohe Anzahl an Schilddrüsenhormonrezeptoren und gilt als wichtiges Zielorgan für das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin ( $T_3$ ) (130). HepG2-Zellen stammen von einem menschlichen primären Hepatoblastom ab (81). Sie weisen ein kontinuierliches, homogenes Wachstum auf und bleiben langfristig morphologisch stabil (99). Diese von einem menschlichen Tumor stammenden Zellen besitzen viele biosynthetische Fähigkeiten normaler Leberparenchymzellen (24, 81, 99). Die Zellen sezernieren eine Reihe von Serumproteinen wie beispielsweise Albumin,  $\alpha_1$ -Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin, Komplementfaktor C3, Plasminogen (81) und auch das Transportprotein „thyroid hormon binding globulin“ (TBG) (2). Die Zellkultur von humanen HepG2-Zellen erwies sich bereits in verschiedenen In-Vitro-Studien über die Pathogenese schwerer Allgemeinerkrankungen als geeignetes Untersuchungsmaterial (4, 68, 81, 99). Insbesondere bei Untersuchungen über die Pathogenese des Low- $T_3$ -Syndroms und der Regulation des Schilddrüsenhormonrezeptors sind menschliche HepG2-Zellen besser geeignet als Rattenhepatozyten, da sich die Regulation des Schilddrüsenhormonhaushaltes bei den primären Rattenhepatozyten von der menschlicher Zellen unterscheidet (40, 78).

HepG2-Zellen reagieren auf eine Zytokinstimulation im Rahmen einer Akute-Phase-Antwort mit einem veränderten Sekretionsmuster der Proteine, die mit der Reaktion von Leberzellen in-vivo vergleichbar ist (3, 4, 17, 55). In einem Zellkulturmodell (HepG2) stieg beispielsweise nach der Stimulation mit IL-1 die Synthese von  $\alpha_1$ -Glykoprotein, Haptoglobin, Komplementfaktor C3,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin,  $\alpha_1$ -Antitrypsin und Fibrinogen an, während sich die Synthese von Albumin und Transferrin verringerte (4).

In einigen Untersuchungen konnten allerdings auch Unterschiede bei HepG2-Zellen im Vergleich zu normalen Leberparenchymzellen nachgewiesen werden (81). Sie wiesen chromo-

somale Veränderungen sowie eine eingeschränkte Sekretion der Akute-Phase-Proteine auf (3, 81). Das von ihnen sezernierte Schilddrüsenhormon-bindende-Globulin (TBG) zeigt, im Vergleich zu dem im menschlichen Plasma vorkommenden TBG, eine diskret verminderte Affinität von  $T_4$  und  $T_3$  sowie eine gesteigerte Hitzelabilität (99).

HepG2-Zellen besitzen Rezeptoren für verschiedene an Entzündungsreaktionen beteiligte Faktoren und Hormone wie beispielsweise für Prostaglandine, Katecholamine, Insulin, epidermale Wachstumsfaktor und Schilddrüsenhormon (4). Ichikawa et al. isolierte aus einer Zellkultur mit humanen HepG2-Zellen Schilddrüsenhormonrezeptoren, die in ihren biochemischen Eigenschaften den hepatischen Rezeptoren des menschlichen Organismus entsprechen. Nukleäre Schilddrüsenhormonrezeptoren sind nach der Bindung von Trijodthyronin ( $T_3$ ) an der Vermittlung vieler Stoffwechselfvorgänge beteiligt. HepG2-Zellen weisen im Vergleich zu normalen Leberzellen eine geringere Anzahl Schilddrüsenhormonrezeptoren (1000 Bindungsstellen) in den einzelnen Zellen auf. Die Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer  $T_3$ -Bindungsaffinität und ihrer molekularen Größe jedoch nicht von denen menschlichen Leberzellen oder Rattenhepatozyten, so daß HepG2-Zellen ein geeignetes Modell für Untersuchungen des Schilddrüsenhormonrezeptors darstellen (24, 68). Die  $\beta_1$ -Form des Schilddrüsenrezeptors wurde untersucht, da dieser die in der Leber vorherrschende Form des  $T_3$ -Rezeptors darstellt (85, 100).

Die Beobachtung, daß der Schilddrüsenhormonrezeptor durch das c-erbA Gen kodiert wird (121, 141), ermöglichte die Analyse der  $T_3$ -Rezeptoren auf molekularer Ebene sowie die Durchführung spezieller Studien zu den Veränderungen des Rezeptors unter verschiedenen pathologischen Bedingungen. Diese durch das c-erbA-Gen kodierten Schilddrüsenhormonrezeptoren entsprechen den bei Ratten und Menschen in großer Anzahl in den Zellkernen der Hepatozyten vorkommenden Rezeptoren (91).

#### **4.1.2 Verwendung der PCR**

Für die Untersuchung der Zytokineffekte auf die mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ - $T_3$ -Rezeptors stellte die quantitative kompetitive PCR eine geeignete sensitive Methode dar. Sie ermöglicht über eine schrittweise Amplifikation der c-DNA des  $\beta_1$ - $T_3$ -Rezeptors Aussagen über geringste Konzentrationsänderungen auf molekularer Ebene (139). Der Vorteil der hier verwendeten

quantitativen kompetitiven PCR gegenüber anderen nicht-kompetitiven PCRs liegt darin, daß bei bekannten Konzentrationen eines internen Standards die Möglichkeit besteht, die Konzentration des Zielmoleküls (c-DNA des Schilddrüsenhormonrezeptors) auszurechnen und somit die qualitativen Aussagen einer PCR durch quantitative Ergebnisse zu ergänzen (58). Diese Methode wurde bereits in verschiedenen Modellen beispielsweise zum Nachweis der Expression verschiedener c-erbA kodierter Schilddrüsenhormonrezeptoren in unterschiedlichen Geweben verwendet. Mit Hilfe eines kompetitiven Standards bekannter Konzentration wurde bei metabolischen Veränderungen oder Neoplasien eine quantitative Aussage über die Konzentration der mRNA des  $\beta_1$ -,  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Rezeptors in den Geweben ermöglicht (79). In einem Versuch mit IL-1 stimulierten HepG2-Zellen konnte, mit Hilfe der quantitativen kompetitiven PCR, eine Veränderung auf Transkriptionsebene als eine der Ursachen eines durch Zytokineinfluß veränderten Sekretionsmusters dieser Zellen dargestellt werden (4).

#### **4.1.3 Zytokine**

Der Organismus reagiert auf schwere Allgemeinerkrankungen wie Trauma, Sepsis und Neoplasien mit einer sogenannten Akute-Phase-Reaktion. Anhand verschiedener Studien wurde bestätigt, daß Zytokine zu den Vermittlern dieser Reaktion gehören und an den metabolischen Veränderungen im Rahmen dieser Akute-Phase-Reaktion beteiligt sind (7, 25, 26, 34, 55, 60, 94). Die Auswahl der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF erfolgte, da unter anderem in klinischen Studien über Patienten mit septischen Krankheitsbildern oder nach einer Endotoxininjektion ein vorübergehender Konzentrationsanstieg dieser proinflammatorischen Zytokine im Plasma beobachtet wurde (47, 60, 64, 94). Außerdem ergaben Untersuchungen von Zellkulturmodellen nach einer Stimulation mit den Zytokinen IL-1 und TNF- $\alpha$  einen Hinweis darauf, daß diese Zytokine an Veränderungen des Sekretionsmusters der Hepatozyten im Sinne einer Akute-Phase-Reaktion beteiligt sind (2, 3, 4, 25, 104). Sie besitzen außerdem eine wichtige Mediatorfunktion bei Erkrankungen, die mit dem Low-T<sub>3</sub>-Syndrom assoziiert sind und führen in diesem Rahmen zu einer Umstellung des Schilddrüsenhormonstoffwechsels (40, 52, 69, 113, 135).

Bei der Auswahl der Zytokinkonzentrationen richteten wir uns nach den aus der Literatur bekannten und in verschiedenen klinischen und experimentellen Untersuchungen über die

Pathogenese septischer Krankheitsbilder gemessenen Serumkonzentrationen von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Wir verwendeten Konzentrationen bis zu 100 ng/ml, da in bisherigen Untersuchungen die Induktion der Synthese der Akute-Phase-Proteine in der Leber in diesem Konzentrationsbereich beobachtet wurde (4).

Bei septischen Krankheitsbildern konnten bisher die höchsten Konzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Es wurden initiale Serumkonzentrationen für TNF- $\alpha$  von bis zu 5 ng/ml und für IL-1 $\beta$  von bis zu 3 ng/ml beobachtet. Die Konzentrationen fielen innerhalb von einigen Tagen auf nicht mehr nachweisbare Konzentrationen ab (16, 21, 59). Nach einer Endotoxininjektion bei gesunden Probanden lagen die gemessenen Plasmakonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-1 durchschnittlich unter 1 ng/ml (60, 94). Die Infusion einer letalen Dosis von Escherichia coli-Endotoxin führte jedoch bei Pavianen innerhalb von 90 Minuten zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von TNF- $\alpha$  auf 20 ng/ml. Sechs Stunden nach der Endotoxininjektion hatten sich diese Werte wieder normalisiert (64).

Weiterhin wurden diese Zytokine bereits in verschiedenen Zellkulturmodellen experimentell eingesetzt. Die Zytokinkonzentrationen lagen beispielsweise bei einer Untersuchung über die Beeinträchtigung des Wachstumshormonrezeptors durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  zwischen 1 und 300 ng/ml (145). In einem anderen experimentellen Modell reichten die In-Vitro-Konzentrationen von IL-1 zur Untersuchung des Sekretionsmuster menschlicher Thyreozyten bis 1 ng/ml (84).

## **4.2 Vergleich der Ergebnisse mit bisherigen wissenschaftlichen**

### **Untersuchungen**

#### **4.2.1 Dosisabhängigkeit**

In den hier dargestellten experimentellen Untersuchungen über die Regulation der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors durch den Einfluß von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  konnte bei HepG2-Zellen eine dosisabhängige Reduktion der mRNA-Konzentration beobachtet werden. Diese Beobachtung entsprach den Ergebnissen vorausgehender Studien über die Beeinträchtigung des Schilddrüsenhormonstoffwechsels durch Zytokine. Beispielsweise führte IL-1 $\beta$  bei Ratten in an-

steigender Konzentration zu einer verstärkten Reduktion des Schilddrüsenhormonspiegels im Serum (40).

In einem Zellkulturmodell (HepG2-Zellen) wurde die Beeinträchtigung der T<sub>3</sub>-Rezeptorbindungskapazität durch die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  untersucht (146). Die Ergebnisse unserer Studie bekräftigten die anhand dieser vorausgegangenen Studie geäußerte Vermutung, daß diese proinflammatorischen Zytokine an der Vermittlung einer verminderten T<sub>3</sub>-Rezeptorenzahl im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen beteiligt sind (146). Die Bindungskapazität des Rezeptors verringerte sich in der bereits genannten Studie mit ansteigender Zytokindosis (0,1; 1,0; 10 und 100 ng/ml IL-1 $\beta$ ). Bereits die Konzentration von 0,1 ng/ml führte in dieser Studie zu einer signifikanten Verminderung der Bindungskapazität der T<sub>3</sub>-Rezeptoren. Mit steigender Zytokinkonzentration nahm die Reduktion der Bindungskapazität im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellgruppen weiter zu. Auch bei der Inkubation der Zellen mit TNF- $\alpha$  konnte tendentiell eine Verminderung der Bindungskapazität beobachtet werden, die jedoch nicht in allen Versuchen signifikant war (146).

Veränderungen der Bindungskapazität nukleärer Schilddrüsenhormonrezeptoren wurden bisher im Rahmen unterschiedlicher Stoffwechsellustände wie beispielsweise bei schweren Infektionen, bei einem Low-T<sub>3</sub>-Syndrom oder auch postoperativ beobachtet. Nach partieller Hepatektomie wurde bei Ratten eine Reduktion der T<sub>3</sub>-Bindungskapazität des Rezeptors um 50 % beobachtet (33). Auch eine Nahrungskarenz führte bei Ratten zu einer Verminderung der T<sub>3</sub>-Bindungskapazität (um 30 %) (33). In einem weiteren Tiermodell mit Nagetieren führte eine *Pseudomonas aeruginosa* Infektion zu einem Low-T<sub>3</sub>-Syndrom und einer Senkung der Bindungskapazität des T<sub>3</sub>-Rezeptors um ungefähr 30 % (13). Bei Ratten mit *Streptococcus pneumoniae* Infektion, von denen 80 % innerhalb von fünf Tagen nach der Infektion starben, reduzierte sich die Bindungskapazität des Rezeptors um 33 % (90). Eine Urämie führte bei Ratten zu einer Reduktion der Bindungskapazität hepatischer T<sub>3</sub>-Rezeptoren um 37 % (131). Die Bindungsaffinität des Schilddrüsenhormonrezeptors blieb in den unterschiedlichen Studien jedoch unbeeinträchtigt (13, 33, 131).

In unseren Untersuchungen verminderte sich die mRNA-Konzentration des Rezeptors bei einer Konzentration von 10 und 50 ng IL-1 $\beta$ /ml auf 53 % im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Die Stimulation mit 100 ng/ml führte sogar zu einer Reduktion auf 29 % des mRNA-Gehaltes normaler HepG2-Zellen. TNF- $\alpha$  führte dagegen erst in Konzentrationen von

100 ng/ml zu einer signifikanten Verminderung der Rezeptor-mRNA. Der mRNA-Gehalt verminderte sich um 82 %. Anhand dieser Experimente wird erkennbar, daß in vitro hohe Zytokinkonzentrationen benötigt werden, um die Transkriptionsrate der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors zu beeinflussen. Die in unseren Experimenten eingesetzten und zu einer Reduktion der Rezeptor mRNA führenden Zytokinkonzentrationen lagen deutlich über den in vivo bisher gemessenen Zytokinspiegeln. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Zytokinkonzentrationen in vivo meist im Plasma oder Serum gemessen werden und daher vermutlich nicht repräsentativ für die lokal in der Leber vorkommenden Zytokinspiegel sind. Aufgrund des hohen Gehaltes an monozytären Zellen in der Leber können bei einem akuten Trauma oder einer Infektion die Zytokinspiegel lokal höher sein als im Serum, so daß diese Tatsache möglicherweise eine Erklärung für die erst bei relativ hohen Zytokinkonzentrationen zu beobachtenden Effekte auf hepatische T<sub>3</sub>-Rezeptoren sein kann.

Der Einfluß von IL-1 $\beta$  auf die Transkription wurde bereits in einer Studie über die Thyreoglobulinsekretion von Thyreozyten beobachtet, wobei der Einfluß von IL-1 $\beta$  zu einer verminderten Transkription der Thyreoglobulin-mRNA führte (84).

Die in unseren Untersuchungen durch Zytokineffekte zu beobachtende verminderte Transkriptionsrate der mRNA und eine dadurch bedingte reduzierte Synthese des Rezeptors steht vermutlich zumindest zu einem Teil in Zusammenhang mit den im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen beschriebenen verminderten T<sub>3</sub>-Rezeptorenzahlen. Zusätzlich sind wahrscheinlich weitere Zytokineffekte, unter anderem posttranslationale regulatorische Mechanismen, sowie eine beschleunigte Degradation des intakten Proteins an der Verminderung der T<sub>3</sub>-Rezeptorenzahl beteiligt.

#### **4.2.2 Zeitabhängigkeit**

In verschiedenen Studien wurde beobachtet, daß die im Rahmen schwerer Infektionen auftretenden erhöhten Zytokinkonzentrationen während des Krankheitsverlaufes zeitlichen Schwankungen unterlagen. Die experimentelle Endotoxininjektion führte beispielsweise bei gesunden Probanden innerhalb einer Stunde zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von IL-1. Die Zytokinkonzentration erreichte nach 2 Stunden ihr Maximum, um innerhalb von 6

bis 12 Stunden wieder auf Normalwerte abzusinken (60). Bei Untersuchungen der durch Zytokine vermittelten Akute-Phase-Reaktion konnte anhand von Zellkulturen die maximale Konzentration der Akute-Phase-Proteine nach einem Zeitraum von 18 bis 24 Stunden beobachtet werden (3, 4). Aus verschiedenen Untersuchungen über Veränderungen des Schilddrüsenhormonrezeptors gingen ebenfalls zeitlich bedingte Unterschiede in Bezug auf das Ausmaß der Rezeptorsuppression hervor. In einer In-Vitro-Studie mit hepatektomierten Ratten wurde beispielsweise innerhalb von 12 Stunden eine Reduktion der T<sub>3</sub>-Rezeptorkapazität beobachtet, die weitere 48 Stunden persistierte und am siebten Tag nach der Hepatektomie wieder Normalwerte erreichte (33). Schwere Infektionen führten bei Nagetieren innerhalb von 40 Stunden zu einer Verminderung der T<sub>3</sub>-Rezeptorkapazität (90). Bei einer experimentellen Studie über den Zusammenhang einer Änderung der T<sub>3</sub>-Rezeptorkapazität und dem Einfluß von Zytokinen wurde in Hepatozyten ein signifikanter Effekt auf den Rezeptor 12 bis 24 Stunden nach einer Zytokinstimulation beobachtet (146).

In den hier dargestellten Versuchen konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Zytokinwirkung auf die mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors und der Stimulationsdauer festgestellt werden. Nach einer Stimulationsdauer von 6 Stunden mit 100 ng/ml IL-1 $\beta$  deutete sich der inhibierende Effekt des Zytokins auf den  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor anhand einer um 22 % reduzierten mRNA-Konzentration des Rezeptors im Vergleich zu Kontrollzellen an. Nach 9 Stunden war dann eine deutliche Inhibition des Rezeptors um 51 % erkennbar. TNF- $\alpha$  führte in einer Konzentration von 100 ng/ml im Vergleich zu IL-1 $\beta$  sowohl nach 6 Stunden als auch nach 9 Stunden zu einer stärkeren Suppression des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors. Im Vergleich zu Kontrollzellen verminderte sich die mRNA-Konzentration des Rezeptors nach 6 Stunden um 53 % und nach 9 Stunden um 54 %. Nach einer Stimulationsdauer von 15 Stunden war für die mit IL-1 $\beta$  stimulierten Hepatozyten eine Erholung des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors anhand eines erneuten Anstieges der mRNA-Konzentration erkennbar, während die mRNA-Spiegel des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors der mit TNF- $\alpha$  stimulierten Zellen niedrig blieben. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß es sich bei dem inhibierenden Effekt von IL-1 $\beta$  auf den  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor um eine reversible und nicht um eine irreversible Wirkung handelt. Diese Regeneration der Zellfunktion und der Rezeptorfunktion nach Zytokineinfluß wurde bereits in verschiedenen vorausgegangenen experimentellen Modellen beobachtet (2, 42, 145, 146). In einer Zellkultur menschlicher Thyreozyten war der inhibierende Effekt von IL-1 auf die Thyreoglobulinsekretion der



Zellen ebenfalls reversibel, so daß eine zytotoxische Wirkung des IL-1 als Ursache für eine verminderte Sekretion von Thyreoglobulin nicht wahrscheinlich ist (84, 113).

### **4.3 Bedeutung der Untersuchungsergebnisse für das Verständnis der Pathophysiologie schwerer Allgemeinerkrankungen**

Trauma und Sepsis gehen mit charakteristischen Stoffwechselveränderungen des gesamten Organismus einher. Der Beginn einer sogenannten Akute-Phase-Reaktion ist durch den Anstieg endokriner und hormoneller Faktoren gekennzeichnet, die an der für diese Phase charakteristischen Mobilisation von Energiereserven beteiligt sind. Nach einer Dauer von 12 bis 24 Stunden geht diese Phase in die Flow-Phase über, die weitere 7 bis 10 Tage andauern kann. Die ausgeprägte Proteinkatabolie mit bevorzugtem Abbau von Muskelproteinen gehört klinisch zu den bedeutendsten metabolischen Reaktionen dieser Phase (50).

Der Schilddrüsenhormonstoffwechsel ist nach einem Trauma ebenfalls von Veränderungen betroffen. Der im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen auftretende erhöhte Grundumsatz sowie der Verlust körpereigener Proteine erinnern an das klinische Bild einer Hyperthyreose (50). Die Veränderungen des Schilddrüsenhormonhaushaltes entsprechen jedoch eher einem in der Literatur als Low-T<sub>3</sub>-Syndrom bezeichneten Zustand mit verminderten Serumspiegeln von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> sowie einer reduzierten Ansprechbarkeit von TSH auf die Stimulation durch TRH (52, 62, 107). Die Serumspiegel der freien Schilddrüsenhormonfraktion sowie die Konzentration von rT<sub>3</sub> sind jedoch in der Regel erhöht (40, 135).

Zu den Vermittlern der Akute-Phase-Reaktion und den damit einhergehenden Veränderungen des Schilddrüsenhormonhaushaltes sowie der Katabolie bei schweren Allgemeinerkrankungen gehören unter anderem die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (1, 7, 19, 26, 52, 107, 132, 135, 140). Anhand einer Patientenstudie konnte ein Zusammenhang zwischen Veränderungen im Schilddrüsenhormonhaushalt im Rahmen eines Low-T<sub>3</sub>-Syndroms und erhöhten Zytokinkonzentrationen festgestellt, und damit die klinische Relevanz der bisherigen Erkenntnisse aus In-Vitro Modellen bestätigt werden (97). Stoffwechselzustände, die mit einer verminderten T<sub>3</sub>-Konzentration im Serum entsprechend eines Low-T<sub>3</sub>-Syndroms einhergehen, konnten bisher bei den unterschiedlichsten Krankheitsbildern beobachtet werden (133).

Die Vermittlung der Schilddrüsenhormoneffekte auf den gesamten Organismus erfolgt über die Bindung von  $T_3$  an nukleäre Rezeptoren und den daraus resultierenden Veränderungen der mRNA-Synthese. Verschiedene Tierstudien gaben einen Hinweis darauf, daß diese Veränderungen im Schilddrüsenhormonhaushalt mit einer Reduktion des  $T_3$ -Rezeptorgehaltes und der Postrezeptor-Aktivitäten einhergingen (133). Bei Nagetieren wurde beispielsweise im Rahmen einer Urämie, bei Kachexie, septischen Krankheitsbildern, Neoplasien oder auch postoperativ eine reduzierte Anzahl hepatischer, nukleärer  $T_3$ -Rezeptoren beobachtet (13, 27, 33, 85, 125, 129, 131).

Bei diesen zu beobachtenden Effekten auf die  $T_3$ -Rezeptoren konnte eine zeitabhängige Veränderung der Rezeptorkonzentration beobachtet werden. Eine signifikante Reduktion der  $T_3$ -Rezeptoren zeichnete sich beispielsweise bei Nagetieren postoperativ innerhalb von 12 Stunden (33) und bei schweren Infektionen nach 40 Stunden (90) ab. Eine ähnliche Zeitkinetik konnte anhand einer Untersuchung mit HepG2-Zellen beobachtet werden. Eine signifikante Verminderung der  $T_3$ -Rezeptorenzahl nach Zytokinstimulation war dort bereits nach 6 bis 12 Stunden erkennbar und erreichte ein Maximum nach 12 bis 24 Stunden (146). Die in den von uns durchgeführten Untersuchungen zu beobachtende maximale Verminderung der mRNA-Konzentrationen des  $\beta_1$ - $T_3$ -Rezeptors lag bei 9 Stunden und entspricht ungefähr dem Zeitraum in dem die durch Zytokine hervorgerufenen Veränderungen des Sekretionsmusters der Leber mit Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen bei schweren Allgemeinerkrankungen beobachtet wurde (2).

In der Rekonvaleszenzphase schwerer Allgemeinerkrankungen konnte dann die Normalisierung der initial bestandenen Reduktion der  $T_3$ -Rezeptorkapazität beobachtet werden (33). Auch wurde anhand einer Zellkulturstudie (HepG2) die Reversibilität der verminderten  $T_3$ -Rezeptorenzahl nach Entzug des Zytokineinflusses beschrieben. Die Zeitspanne entsprach in diesen Studien dem Zeitpunkt der Rekonvaleszenzphase (2, 146). Auch in den hier vorgestellten Untersuchungen deutete sich nach einer Stimulationszeit von 15 Stunden anhand ansteigender mRNA-Konzentrationen des  $\beta_1$ - $T_3$ -Rezeptors eine Erholung der Zellen an. Diese Beobachtung galt jedoch nur für den Einfluß von IL-1 $\beta$  nicht aber für TNF- $\alpha$ , unter dessen Einfluß auch nach 15 Stunden die mRNA-Konzentrationen reduziert blieben.

Die in den vorgestellten Experimenten verwendeten Zytokinkonzentrationen lagen bei 10, 50 und 100 ng/ml. Bei der Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml wurde sowohl für IL-1 $\beta$  als

auch für TNF- $\alpha$  eine signifikante Verminderung der mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors gemessen. Bei IL-1 $\beta$  war tendentiell auch in geringeren Konzentrationen (10, 50 ng/ml) eine Verminderung der mRNA-Spiegel erkennbar, erreichte jedoch erst in höheren Konzentrationen die stärkste Suppression. Das Ausmaß der Reduktion der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen war vergleichbar mit der Reduktion der mRNA dieses in der Leber vorherrschenden Rezeptorsubtypen bei Ratten in einer katabolen Stoffwechselsituation (85). In weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen wurde bei verschiedenen zytokinassozierten Krankheitsbildern eine Reduktion der T<sub>3</sub>-Rezeptorbindungskapazität beobachtet, so daß die in unseren Versuchen beobachtete Verminderung der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors an der verminderten Rezeptorkapazität beteiligt sein könnte (13, 90, 129, 131). Bei der Untersuchung dieser zytokinassozierten Krankheitsbilder wurden die einzelnen Zytokinkonzentrationen jedoch nicht gemessen. Die in weiteren Patientenstudien im Rahmen schwerer septischer Krankheitsbilder im Serum gemessenen Zytokinspiegel lagen bei 0,1 bis 3 ng/ml für IL-1 $\beta$  und bis 5 ng/ml für TNF- $\alpha$  (16, 21, 26, 47, 59). Eine Konzentration oberhalb von 5 ng TNF/ml wurde in vivo lediglich bei Pavianen nach der Injektion einer letalen Dosis von Escherichia coli beobachtet (64). Anhand einer Zellkulturstudie (HepG2) über den Einfluß von Zytokinen auf die T<sub>3</sub>-Rezeptorenzahl wurde eine signifikante Verminderung der T<sub>3</sub>-Rezeptorenzahl bei Zytokinkonzentrationen von 0,1 ng/ml für IL-1 $\beta$  und 10 ng/ml für TNF- $\alpha$  festgestellt (146). Die Tatsache, daß erst relativ hohe Zytokinkonzentrationen zu einer Reduktion der Rezeptor-mRNA führen, liegt vermutlich unter anderem an dem hohen Gehalt monozytärer Zellen in der Leber und somit an einer im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen lokal höheren Zytokinkonzentrationen. Zusätzlich könnte man vermuten, daß Zytokineffekte auf den Organismus, die anhand verschiedener Studien festgestellt wurden, bereits in niedrigeren Konzentrationen auftreten, die Beeinträchtigung der Transkriptionsrate der Rezeptor-mRNA allerdings erst in höheren Konzentrationen erfolgt. Das Auftreten hoher Zytokinspiegel im Patientenserum wurde bisher nur bei schweren septischen Krankheitsbildern beobachtet und korrelierte mit einer schlechten Prognose und erhöhten Letalität der Patienten (16, 21, 26, 45, 59, 64). Insgesamt geben die Ergebnisse unserer Experimente einen Hinweis darauf, daß die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  über eine Hemmung der  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor-Synthese und einer entsprechend verminderten Transkriptionsrate, für die im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen zu beobachtende verminderte T<sub>3</sub>-

Rezeptorenzahl zumindest mitverantwortlich sind. Zusätzlich spielen wahrscheinlich Zytokineffekte auf posttranslationaler Ebene sowie auf die Degradation des intakten Proteins eine Rolle. Inwieweit die in unseren Untersuchungen zu beobachtende Reduktion der Transkriptionsrate der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors die Prognose schwerer Allgemeinerkrankungen beeinflusst bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Neben den bereits erwähnten Einflüssen von Zytokinen auf nukleäre Schilddrüsenhormonrezeptoren weisen verschiedene Studien mit Nagetieren auf die Existenz weiterer, die Bindungskapazität der T<sub>3</sub>-Rezeptoren beeinträchtigender, Faktoren hin. Hierzu zählen beispielsweise die Hormone Glukagon oder auch T<sub>3</sub> selbst (31, 65). Die Verabreichung von T<sub>3</sub> führte in einer Studie mit Nagetieren zu einem Anstieg seines eigenen Rezeptors in der Leber (65). In höherer Dosis und nach länger andauernder Stimulationszeit konnte in Zellkulturen jedoch eine Verminderung der T<sub>3</sub>-Rezeptorenzahl beobachtet werden (61, 112, 118).

Burman et al. beobachtete nach der Gabe von Glukagon eine verminderte Bindungskapazität des T<sub>3</sub>-Rezeptors (31). Da bei schweren Allgemeinerkrankungen oder auch während eines Fastenzustandes erhöhte Glukagonkonzentrationen im Serum gemessen wurden, könnte Glukagon zumindest teilweise als Vermittler an den Veränderungen des T<sub>3</sub>-Rezeptors sowie weiteren Stoffwechselveränderungen beteiligt sein (31, 50, 136). Ein Zusammenhang mit den durch Zytokinen festgestellten Effekten für den T<sub>3</sub>-Rezeptor wurde in diesen Studien jedoch nicht untersucht. Weitere experimentelle Modelle über die Regulation der T<sub>3</sub>-Rezeptoren gaben einen Hinweis darauf, daß die einzelnen Rezeptorsubtypen auf gleiche Stimuli unterschiedlich reagieren (72, 143). TRH führte beispielsweise zu einer Reduktion des  $\beta_2$ - und  $\alpha_2$ -Rezeptors. Die Rezeptorsubtypen  $\beta_1$  und  $\alpha_1$  blieben unbeeinträchtigt (72). Anhand dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, inwieweit die Rezeptorsubtypen durch proinflammatorische Zytokine unterschiedlich beeinträchtigt werden, und welche Funktion diese im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen übernehmen. Die Klärung und Analyse dieser Sachverhalte bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen.

#### **4.4 Effekte von Trijodthyronin auf die Synthese von Wachstumshormon**

Neben der Bedeutung von Schilddrüsenhormonen für die Regulation von Wachstum, Entwicklung und verschiedenen Stoffwechselfvorgängen des Organismus besitzt T<sub>3</sub> zusätzlich

einen Einfluß auf die Expression des Wachstumshormogens. Diese Wirkung ist abhängig von der Transkriptionsrate der mRNA des  $T_3$ -Rezeptors und dessen Bindung an die Promotorregion des Zielgens (118, 133, 148). Wachstumshormon stimuliert die Synthese von Somatomedinen, die eine bedeutende anabole Stoffwechselwirkung besitzen und daher von großer Bedeutung für die Genesung bei schweren Erkrankungen wie beispielsweise Trauma und Sepsis sind (50, 145). In einer Studie mit Rattenhepatozyten wurde eine verminderte Synthese der Wachstumshormon-mRNA und der durch Wachstumshormon stimulierten Synthese von Somatomedinen durch den Einfluß proinflammatorischer Zytokine beobachtet (145). Die in unseren Versuchen zu beobachtende verminderte Transkriptionsrate des  $\beta_1$ - $T_3$ -Rezeptors durch Zytokine könnte zumindest teilweise an einer verminderten anabolen Wirkung der durch Wachstumshormon stimulierten Synthese von Somatomedinen beteiligt sein. Einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Anzahl von Schilddrüsenhormonrezeptoren und einer gleichzeitig auftretenden geringeren Synthese von Wachstumshormon ließ sich bereits anhand früherer experimenteller Untersuchungen mit hypophysärer Zellen  $GH_1$ -Zellen erkennen (72, 118).

Eine reduzierte Plasmakonzentration von Somatomedin wurde bereits von Frayn et al. in der Ebb-Phase (den ersten 12 bis 24 Stunden) bei schweren Allgemeinerkrankungen beobachtet (51). Auch die in unseren Untersuchungen beobachteten Zytokineffekte auf die mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ - $T_3$ -Rezeptors lagen in einem der Ebb-Phase entsprechenden Zeitraum. Diese zeitliche Korrelation bestärkt die Vermutung, daß die Reduktion der  $T_3$ -Rezeptoren im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen mit einer Hemmung der Wachstumshormoneffekte einhergeht.

#### **4.5 Therapieansätze**

Der bei schweren Allgemeinerkrankungen zu beobachtende gesteigerte Proteinabbau in der Muskulatur gehört auf der einen Seite zu einer physiologischen Reaktion des Organismus zur Bereitstellung wichtiger Stoffe für die Gluconeogenese und die Synthese von Immunglobulinen (1). Auf der anderen Seite ist die in der Flow-Phase zu beobachtende exzessive Katabolie für die Patienten und die Prognose des Krankheitsverlaufes jedoch von Nachteil. Bisher wurden verschiedene therapeutische Ansätze unternommen den Stoffwechselveränderungen nach

Trauma und bei schweren Allgemeinerkrankungen zu entgegen. Der Versuch die Katabolie und die Mortalitätsrate mit Hilfe parenteraler Ernährung zu begrenzen blieb ohne Erfolg (50). Aufgrund der in unseren Untersuchungen zu beobachtenden verminderten mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ - $T_3$ -Rezeptors durch den Einfluß proinflammatorischer Zytokine, sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse bisheriger wissenschaftlicher Untersuchungen stellt sich die Frage, inwieweit eine verminderte Rezeptorenzahl für den Organismus bei schweren Allgemeinerkrankungen von Nutzen sein kann. Die in verschiedenen Experimenten und den hier dargestellten Untersuchungen zu beobachtende verminderte Anzahl der Schilddrüsenhormonrezeptoren ist mit einer verminderten Wirksamkeit von  $T_3$  auf den Organismus assoziiert. Die exogene Zufuhr von Schilddrüsenhormonen führte in bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen über schwere Allgemeinerkrankungen mit Low- $T_3$ -Syndrom zu unterschiedlichen Wirkungen. In einer klinischen Studie mit Patienten nach einer koronaren Bypassoperation führte die  $T_3$ -Gabe zu einer Verbesserung des Schlagvolumens sowie einer Senkung der peripheren Widerstände. Der klinische Verlauf blieb durch die  $T_3$ -Gabe jedoch unbeeinträchtigt (80). In anderen Studien an Patienten mit schweren Allgemeinerkrankungen führte die exogene Zufuhr von Schilddrüsenhormon häufig zu einer Verstärkung der Katabolie in der initialen Krankheitsphase, und schien aufgrund der zu beobachtenden inhibierenden Wirkung auf TSH die Rekonvaleszenz zu verzögern (10, 89). Eine Reduktion der hepatischen Schilddrüsenhormonrezeptoren durch eine verminderte Transkriptionsrate stellt somit vermutlich einen Mechanismus dar, die Wirkung von  $T_3$  zu begrenzen und dem Organismus zu helfen seine Energiereserven aufrechtzuerhalten und die Mortalität zu verringern (89). Trotz dieses wünschenswerten Effektes stellt sich dennoch die Frage, inwieweit ein anhaltender  $T_3$ -Defizit sich letztendlich ungünstig auf das Überleben der Patienten auswirken kann (54). Anhand verschiedener Untersuchungen wurde der Einfluß der Schilddrüsenhormone auf die durch Wachstumshormon stimulierte Synthese und Sekretion von Somatomedinen beobachtet.  $T_3$  ist demnach indirekt an der Stimulation anaboler Stoffwechselprozesse durch Somatomedine beteiligt (145, 147). Eine andauernde verminderte  $T_3$ -Wirkung könnte aufgrund dieser Befunde für die Rekonvaleszenz der Patienten und den Verlauf der Erkrankung von Nachteil sein.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen kommt es zu charakteristischen neuroendokrinen Umstellungen. Bei den Patienten wird ein sogenanntes Low-T<sub>3</sub>-Syndrom mit erniedrigten T<sub>3</sub>- und teilweise auch T<sub>4</sub>-Konzentrationen sowie erhöhten rT<sub>3</sub>-Spiegeln beobachtet. An der Entstehung dieses Low-T<sub>3</sub>-Syndroms und anderen metabolischen Veränderungen sind unter anderem die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  beteiligt. Diese Zytokine führen außerdem zu einer Beeinträchtigung der Bindungskapazität nukleärer T<sub>3</sub>-Rezeptoren.

Anhand der hier dargestellten Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Veränderungen der T<sub>3</sub>-Rezeptorkapazität durch Zytokineinfluß auf eine Beeinträchtigung des Rezeptors auf der Ebene der Transkription zurückzuführen sind.

Die Untersuchungen erfolgten anhand einer Zellkultur mit HepG2-Zellen. Sie stellen anhand ihres kontinuierlichen und homogenen Wachstums sowie einer den menschlicher Hepatozyten entsprechenden Funktion ein geeignetes Untersuchungsmodell für die Untersuchung der Zytokineffekte auf T<sub>3</sub>-Rezeptoren dar. In den Experimenten wurde die  $\beta_1$ -Form des Schilddrüsenhormonrezeptors untersucht, da dieser quantitativ in der Leber überwiegt. Unter standardisierten Versuchsbedingungen wurden die HepG2-Zellen mit bekannten unterschiedlichen Zytokinkonzentrationen und zu verschiedenen Zeiten stimuliert. Bei der Auswahl der Zytokinmengen richteten wir uns nach den aus der Literatur bereits bekannten Konzentrationen, die zu einer Beeinträchtigung des Sekretionsmusters der Leber im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen und der Synthese von Akute-Phase-Proteinen führten. Zur Untersuchung der mRNA erfolgte zunächst die Isolierung der RNA aus den HepG2-Zellen. Die Quantifizierung der für den  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor spezifischen mRNA erfolgte mit Hilfe einer quantitativen kompetitiven PCR. Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen konnte nach der Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen eine dosis- sowie zeitabhängige Verminderung der  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptor mRNA beobachtet werden. IL-1 $\beta$  führte im Vergleich zu TNF- $\alpha$  bereits in niedrigeren Konzentrationen zu einer Verminderung der mRNA-Konzentration des Rezeptors. Nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  in Konzentrationen von 100ng/ml lagen die gemessenen mRNA-Werte jeweils unterhalb der für IL-1 $\beta$  gemessenen Konzentrationen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die im Rahmen schwerer Allgemeinerkrankungen auftretende Reduktion der  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptorkapazität durch Zytokine vermittelt wird, und eine

dadurch verminderte Transkriptionsrate der mRNA des Rezeptors zu den Ursachen der reduzierten Rezeptorenzahl gezählt werden kann. Weitere Zytokineffekte beispielsweise, auf posttranslationaler Ebene, sind ebenfalls möglich. Aufgrund der Tatsache, daß die Effekte der Schilddrüsenhormone auf das Gewebe über ihre nukleären Rezeptoren vermittelt werden, stellt eine verminderte Transkriptionsrate der mRNA des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors wahrscheinlich eine Schutzmaßnahme für den Organismus in der katabolen Stoffwechselphase schwerer Allgemeinerkrankungen dar. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, inwieweit die unterschiedliche Verteilung und Regulation der T<sub>3</sub>-Rezeptorsubtypen an diesen Adaptationsmechanismen des Körpers beteiligt sind, beziehungsweise diese beeinflussen können.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Baracos V, Rodemann HP, Dinarello CA, Goldberg AL (1983) Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). *N Engl J Med* 308:553-558.
2. Bartalena L, Farsetti A, Flink IL, Robbins J (1992) Effects of interleukin-6 on the expression of thyroid hormone-binding protein genes in cultured human hepatoblastoma-derived (HepG<sub>2</sub>) cells. *Mol Endocrinol* 6:935-942.
3. Baumann H, Onorato V, Gauldie J, Jahreis GP (1987) Distinct sets of acute phase plasma proteins are stimulated by separate human hepatocyte-stimulating factors and monokines in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 262:9756-9768.
4. Baumann H, Richards C, Gauldie J (1987) Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG<sub>2</sub>) cells. *J Immunol* 139:4122-4128.
5. Besedovsky H, Del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA (1986) Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233:652-654.
6. Beutler B (1993) Cytokines in shock: 1992. In: Lamy M, This LG (Eds.). *Mediators of Sepsis*. Springer Berlin, Heidelberg, New York 1993, 51-67.
7. Beutler B, Cerami A (1987) Cachectin: More than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 316:379-385.
8. Beutler B, Mahoney J, Trang NL, Pekala P, Cerami A (1985) Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 161:984-995.
9. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A (1986) Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232:977-980.
10. Brent GA, Hershman JM (1986) Thyroxine therapy in patients with severe nonthyroidal illness and low serum thyroxine concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1-8.

11. Brent GE, Hershman JM, Reed AW, Sastre A, Lieberman J (1984) Serum angiotensin-converting enzyme in severe nonthyroidal illnesses associated with low serum thyroxine concentration. *Ann Intern Med* 100:680-683.
12. Brodsky IG, Devlin JT. Hormone and Nutrient Interactions. In: *Nutrients in integrated biologic systems*. Chapter 40:603-622.
13. Burgi U, Feller C, Gerber AU (1986) Effects of an acute bacterial infection on serum thyroid hormones and nuclear triiodothyronine receptors in mice. *Endocrinology* 119:515-521.
14. Burmann KD, Lukes YG, Wright FD, Wartofsky L (1977) Reduction in hepatic triiodothyronine binding capacity induced by fasting. *Endocrinology* 101:1331-1334.
15. Burmann KD, Wartofsky L, Dinterman RE, Kesler P, Wannemacher RW (1979) The Effect of T3 and reverse T3 administration on muscle protein catabolism during fasting as measured by 3-methylhistidine excretion. *Metabolism* 28:805-813.
16. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, Wu MM, Lambert PH, Schellekens J, Verhoef J, Glauser MP, and the Swiss-Dutch J5 Immunglobulin Study Group (1990) Prognostic Values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$  in the serum of patients with septic shock. *J Infect Dis* 161:982-987.
17. Campos SP, Baumann H (1992) Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase protein genes. *Mol Cell Biol* 12:1789-1797.
18. Cannon JG, Friedberg JS, Gelfand JA, Tompkins RG, Burke JF, Dinarello CA (1992) Circulating interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations after burn injury in humans. *Crit Care Med* 20:1414-1419.
19. Chopra IJ, Sakane S, Chua Teco GN (1991) A study of the serum concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  in thyroidal and nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1113-1116.
20. Clontech Methods & Applications Book 3 1993. Quantitative RT-PCR.
21. Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P (1989) Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med* 17:975-978.
22. Danforth E (1983) The role of thyroid hormones and insulin in the regulation of energy metabolism. *Am J Clin Nutr* 38:1006-1017.

23. Danforth JrE (1986) Effects of fasting and altered nutrition on thyroid hormone metabolism in man. In: Hennemann G (ed). Thyroid hormone metabolism. M.Dekker, Inc.,New York p335.
24. Darby IA, Bouhnik J, Coezy ED, Corvol P (1991) Thyroid hormone receptors and stimulation of angiotensinogen production in HepG2 cells. *In Vitro Cell Develop Biol* 27:21-24.
25. Darlington GJ, Wilson DR, Lachmann LB (1986) Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. *J Cell Biol* 103:787-793.
26. Debets JMH, Kampmeijer R, van der Linden MPMH, Buurman WA, van der Linden CJ (1989) Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med* 17:489-494.
27. DeGroot LJ, Coleoni AH, Rue PA, Seo H, Martino E, Refetoff S (1977) Reduced nuclear triiodothyronine receptors in starvation-induced hypothyroidism. *Biochem Biophys Res Commun* 79:173-178.
28. DeGroot LJ, Nakai A, Sakurai A, Macchia E (1989) The molecular basis of thyroid hormone action - review article. *J Endocrinol Invest* 12:834-861.
29. DeGroot LJ, Refetoff S, Strausser JL, Barsano C (1974) Nuclear triiodothyronine binding protein: partial characterization and binding to chromatin. *Proc Natl Acad Sci* 72:4042.
30. DeGroot LJ, Rue PA (1983) Pathophysiologic control of nuclear triiodothyronine receptor capacity. *Acta Endocrinologica* 104:57-63.
31. Dillmann WH, Bonner RA, Oppenheimer JH (1978) Glucagon administration decreases hepatic nuclear triiodothyronine binding capacity. *Endocrinology* 102:1633-1636.
32. Dillmann WH, Oppenheimer JH (1979) Glucagon influences the expression of thyroid hormone action: discrepancy of nuclear triiodothyronine receptor number and enzyme response. *Endocrinology* 105:74-79.
33. Dillmann WH, Schwartz HL, Oppenheimer JH (1978) Selective alterations in hepatic enzyme response after reduction of nuclear triiodothyronine receptor sites by partial hepatectomy and starvation. *Biochem Biophys Res Commun* 80:259-266.
34. Dinarello CA (1984) Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* 311:1413-1418.
35. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, et al (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Experiment Med* 163:1433-1450.

36. Dinarello CA, Thompson RC (1991) Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 12:404-410.
37. Dinarello CA, Wolff SM (1993) The role of Interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 328:106-113.
38. Diviacco S, Norio P, Zentilin L, Menzo S, Clementi M, Biamonti G, Riva S, Falaschi A, Giacca M (1992) A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* 122;313-320.
39. Dominioni L, Dionigi R, Zanella M, Monico R, Cremaschi R, Dionigi R, Ballabio A, Massa M, Comelli M, DalRi P, Pisata P (1987) Sepsis score and acute-phase protein response as predictors of outcome in septic surgical patients. *Arch. Surg.* 122:141-146.
40. Dubuis JM, Dayer JM, Siegrist-Kaiser CA, Burger AG (1988) Human recombinant interleukin-1 $\beta$  decreases plasma thyroid hormone and thyroid stimulating hormone levels in rats. *Endocrinology* 123:2175-2181.
41. Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW (1988) Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2:706-709.
42. Elias JA, Gustilo K, Baeder W, Freundlich B (1987) Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 138:3812-3816.
43. Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
44. Faber J, Kirkegaard C, Rasmussen B, Westh H, Busch-Sørensen M, Jensen IW (1987) Pituitary-thyroid axis in critical illness. *J Clin Endocrinol Metab* 65:315-320.
45. Flores EA, Bistran BR, Pomposelli JJ, Dinarello CA, Blackburn GL, Istfan NW (1989) Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. *J Clin Invest* 83:1614-1622.

46. Fong Y, Moldawer LL, Marano M, Wei H, Barber A, Manogue K, Tracey KJ, Kuo G, Fischman DA, Cerami A, Lowry SF (1989) Cachectin/TNF or IL-1 $\alpha$  induces cachexia with redistribution of body proteins. *Am J Physiol* 256:R659-R665.
47. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, Cerami A (1989) Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 $\beta$  and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Experiment Med* 170:1627-1633.
48. Franklyn JA, Ramsden DB, Sheppard MC (1985) Down-regulation of nuclear T3 receptors by thyroid hormones in the rat anterior pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 40:145-148.
49. Frayn KN (1985) Substrate turnover after injury. *British Medical Bulletin* 41:232-239.
50. Frayn KN (1986) Hormonal control of metabolism in trauma and sepsis. *Clin. Endocrinology* 24:577-599.
51. Frayn KN, Little RA, Stoner HB, Galasko CSB (1980) Metabolic control in non-septic patients with musculo-skeletal injuries. *Injury* 16:73-79.
52. Fujii T, Sato K, Ozawa M, Kasono K, Imamura H, Kanaji Y, Tsushima T, Shizume K (1989) Effect of interleukin-1 (IL-1) on thyroid hormone metabolism in mice: stimulation by IL-1 of iodothyronine 5'-deiodinating activity (type I) in the liver. *Endocrinology* 124:167-174.
53. Ganapathi MK, Schultz D, Mackiewicz A, Samols D, HU SI, Brabenec A, Macintyre SS, Kushner I (1988) Heterogeneous nature of the acute phase response. Differential regulation of human serum amyloid A, C-reactive protein, and other acute phase proteins by cytokines in Hep 3B cells. *J Immunol* 141:564-569.
54. Gardner DF, Kaplan MM, Stanley CA, Utiger RD (1979) Effect of tri-iodothyronine replacement on the metabolic and pituitary responses to starvation. *N Engl J Med* 300:579-584.
55. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H (1987) Interferon  $\beta$ 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7251-7255.
56. Gelfand RA, Defranzo RA, Gusberg R (1983) Metabolic alterations associated with major injury or infection. In: *New Aspects of Clinical Nutrition*. Kleinberger G, Deutsch E (eds): Basel:Karger 211-239.
57. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn F (1990) Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2725-2729.

58. Gilliland G, Perrin S, Bunn F (1990) In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols. A guide to methods and applications. San Diego 1990: Academic Press;60-69.
59. Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, The J5 Study Group, Lambert PH (1988) Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* 319:397-400.
60. Granowitz EV, Santos AA, Poutsika DD, Cannon JG, Wilmore DW, Wolff SM, Dinarello CA (1991) Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *Lancet* 338:1423-1424.
61. Halperin Y, Surks MI, Shapiro LE (1990) L-Triiodothyronine (T3) regulates cellular growth rate, growth hormone production, and levels of nuclear T3 receptors via distinct dose-response ranges in cultured GC cells. *Endocrinology* 126:2321-2326.
62. Hermus ARMM, Sweep CGJ, van der Meer MJM, Ross HA, Smals AGH, Benraad TJ, Kloppenborg PWC (1992) Continuous infusion of interleukin-1 $\beta$  induces a nonthyroidal illness syndrome in the rat. *Endocrinology* 131:2139-2146.
63. Hesch RD, Hüscher M, Ködding R, Höffken B, Meyer T (1981) Treatment of dopamine-dependent shock with triiodothyronine. *Endocr Res Commun* 8:229-237.
64. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA, Cerami A, Shires GT, Lowry SF (1988) Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 166:147-153.
65. Higuieret P, Pallet V, Coustaut M, Audouin I, Begueret J, Garcin H (1992) Retinoic acid decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor expression in the liver of hyperthyroidic rats. *FEBS* 310:101-105.
66. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW (1989) Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244:76-79.
67. Hu RM, Sakurai A, Miyamoto T, DeGroot LJ (1992) Expression and function of a human thyroid hormone receptor-derived DNA-binding domain protein. *Mol Cell Endocrinol* 84:209-217.
68. Ichikawa K, DeGroot LJ (1987) Thyroid hormone receptors in a human hepatoma cell line: multiple receptor forms on isoelectric focusing. *Mol Cell Endocrinol* 51:135-143.
69. Imura H, Fukata J, Mori T (1991) Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *Clin Endocrinol* 35:107-115.

70. Innis MA, Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols. A guide to methods and applications. San Diego 1990: Academic Press;3-12.
71. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci USA 85:9436-9440.
72. Jones KE, Chin WW (1990) Differential regulation of thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by thyrotropin-releasing hormone. Endocrinology 128:1763-1768.
73. Kaji H, Hinkle PM (1987) Epidermal growth factor decreases thyroid hormone receptors and attenuates thyroid hormone responses in GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells. Endocrinology 120:537-543.
74. Kaptein EM (1986) Thyroid hormone metabolism in illness. In: Hennemann G (ed). Thyroid Hormone Metabolism. Marcel Dekker, New York 297-333.
75. Kaptein EM, Robinson WJ, Grieb DA, Nicoloff JT (1982) Peripheral serum thyroxine, triiodothyronine and reverse triiodothyronine kinetics in the low thyroxine state of acute non-thyroidal illness. A noncompartmental analysis. J Clin Invest 69:526-535.
76. Katz D, Lazar MA (1993) Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant ( $\alpha_2$ ) is due to competition for binding sites on target genes. J Biol Chem 268:20904-20910.
77. Kennedy RL, Jones TH (1991) Cytokines in endocrinology: their roles in health and in disease. J Endocrinol 129:167-178.
78. Kinlaw WB, Schwartz HL, Oppenheimer JH (1985) Decreased serum triiodothyronine in starvin rats is due primarily to diminished thyroidal secretion of thyroxine. J Clin Invest 75:1238-1241.

79. Klann RC, Torres B, Menke JB, Holbrook CT, Bercu BB, Usala SJ (1993) Competitive polymerase chain reaction quantitation of c-erbA $\beta$ 1, c-erbA $\alpha$ 1, and c-erbA $\alpha$ 2 messenger ribonucleic acid levels in normal, heterozygous, and homozygous fibroblasts of kindred S with thyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 77:969-975.
80. Klemperer JD, Klein I, Gomez M, Helm RE, Ojamaa K, Thomas SJ, Isom OW, Krieger K (1995) Thyroid hormone treatment after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 333:1522-1527.
81. Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209:497-499.
82. Koenig RJ, Lazar MA, Hodin RA, Brent GA, Larsen PR, Chin WW, Moore DD (1989) Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337:659-661.
83. Koj A (1985) Biological function of acute-phase proteins. In: *The acute-phase response to injury and infection*. Gordon AH, Koj A (eds). Elsevier, Amsterdam p145.
84. Kung AW, Lau KS (1990) Interleukin-1 $\beta$  modulates thyrotropin-induced thyroglobulin mRNA transkription through 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* 127:1369-1374.
85. Lane JT, Godbole M, Strait KA, Schwartz HI, Oppenheimer JH (1991) Prolonged fasting reduces rat hepatic  $\beta$ 1 thyroid hormone receptor protein without changing the level of its messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 129:2881-2885.
86. Latham KR, Ring JC, Baxter JD (1976) Solubilized nuclear „receptors“ for thyroid hormones - physical characteristics and binding properties, evidence for multiple forms. *J Bio Chem* 251:7388-7397.
87. Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW (1988) Identification of a rat c-erbA $\alpha$ -related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 2:893-901.
88. Lim VS, Passo C, Murata Y, Ferrari E, Nakamura H, Refetoff S (1984) Reduced triiodothyronine content in liver but not pituitary of the uremic rat model: Demonstration of changes compatible with thyroid hormone deficiency in liver only. *Endocrinology* 114:280.



89. Little JS (1985) Effect of thyroid hormone supplementation on survival after bacterial infection. *Endocrinology* 117:1431-1435.
90. Little JS (1985) The effect of streptococcus pneumoniae infection on the binding of triiodothyronine to nuclei isolated from rat liver. *Endocrinology* 117:180-186.
91. Macchia E, Nakai A, Janiga A, Sakurai A, Fisfalen ME, Gardner P, Soltani K, DeGroot LJ (1990) Characterization of site-specific polyclonal antibodies to c-erbA peptides recognizing human thyroid hormone receptors  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\beta$  and native 3,5,3'-triiodothyronine receptor, and study of tissue distribution of the antigen. *Endocrinology* 126:3232-3239.
92. Maturlo SJ, Rosenbaum RL, Pan C, Surks MI (1980) Variable thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone after small decreases in plasma free thyroid hormone concentrations in patients with nonthyroidal diseases. *J Clin Invest* 66:451-456.
93. Maury CPJ (1989) Monitoring the acute phase response: comparison of tumor necrosis factor (cachectin) and C-reactive protein responses in inflammatory and infectious diseases. *J Clin Pathol* 43:1078-1082.
94. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW (1988) Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 318:1481-1486.
95. Migliori S, Cerra FB (1993) Secondary hepatic dysfunction: clinical epidemiology, pathogenesis and current therapeutic approaches. In: Lamy M, Thijs LG (Hrsg.) *Mediators of sepsis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1993, 238-254.
96. Milenkovic L, Rettori V, Snyder GD, Beutler B, McCann SM (1989) Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2418-2422.
97. Mooradian AD, Reed RL, Osterweil D, Schiffman R, Scuderi P (1990) Decreased serum triiodothyronine is associated with increased concentrations of tumor necrosis factor. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1239-1242.
98. Munoz A, Höppner W, Sap J, Brady G, Nordström C, Seitz HJ, Vennström B (1990) The chicken c-erbA  $\alpha$ -product induces expression of thyroid hormone-responsive genes in 3,5,3'-triiodothyronine receptor-deficient rat hepatoma cells. *Mol Endocrinol* 4:312-320.

99. Murata Y, Sarne DH, Horwitz AL, Lecocq R, Aden DP, Knowles BB, Refetoff S (1985) Characterization of thyroxine-binding globulin secreted by human hepatoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 60:472-478.
100. Murray MB, Zilz ND, McCreary NL, MacDonald MJ, Towle HC (1988) Isolation and characterization of rat cDNA clones for two distinct thyroid hormone receptors. *J Biol Chem* 263:12270-12277.
101. Nakai A, Sakurai A, Bell GI, DeGroot LJ (1988) Characterization of a third human thyroid hormone receptor coexpressed with other thyroid hormone receptors in several tissues. *Mol Endocrinol* 2:1087-1092.
102. Nawroth PP, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess L, Stern D (1986) Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Experiment Med* 163:1363-1375.
103. Nawroth PP, Stern DM (1986) Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Experiment Med* 163:740-745.
104. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Conolly RJ, Dinarello CA (1988) Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits: synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 81:1162-1172.
105. Oppenheimer JH, Koerner D, Schwartz HL, Surks MI Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney (1972) *J Clin Endocrinol Metab* 35:330-333.
106. factor in the sera of patients with nonthyroidal disease which inhibits iodothyronine binding by solid matrices, serum proteins, and rat hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 54:757-766. Oppenheimer JH
107. Ozawa M, Sato K, Han DC, Kawakami M, Tsushima T, Shizume K (1988) Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ /cachectin on thyroid hormone metabolism in mice. *Endocrinology* 123:1461-1467.
108. Pailler-Rodde I, Garcin H, Higuieret P (1991) Effect of retinoids on protein kinase C activity and on the binding characteristics of the tri-iodothyronine nuclear receptor. *J Endocrinol* 128:245-251.
109. Pailler-Rodde I, Garcin H, Higuieret P, Begueret J (1991) c-erb-A mRNA content and triiodothyronine nuclear receptor binding capacity in rat liver according to vitamin A status. *FEBS Letters* 289:33-36.

110. carboxykinase gene transcription by thyroid hormone involves two distinct binding sites in the promoter. *Biochem J* 309:913-919. Park EA, Jerden
111. and function in FRTL5 cells. *Surgery* 110:972-977. Patwardhan NA
112. tor levels in GH<sub>1</sub> cells by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J Bio Chem* 256:6883-6889. Raaka BM, Sam
113. Rasmussen AK, Bech K, Feldt-Rasmussen U, Poulsen S, Holten I, Ryberg M, Dinarello CA, Siersbaek-Nielsen K, Friis T, Bendtzen (1988) Interleukin-1 affects the function of cultured human thyroid cells. *Allergy* 43:435-441.
114. predicts outcome in critical illness. *Anaesthesia* 48:373-376. Rothwell PM, U
115. Saiki RK. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) (1990) *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. San Diego 1990: Academic Press;13-20.
116. hormone receptor  $\beta$  gene. *Mol Cell Endocrinol* 71:83-91. Sakurai A, Naka
117. S, DeGroot LJ (1989) Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor  $\beta$ . *Med Science* 86:8977-8981. Sakurai A, Take
118. Samuels HH, Stanley F, Shapiro LE (1976) Dose-dependent depletion of nuclear receptors by L-triiodothyronine: evidence for a role in induction of growth hormone synthesis in cultured GH<sub>1</sub> cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:3877-3881.
119. stration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3488-3492. Samuels HH, Ts
120. vitro characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH<sub>1</sub> cells. *J Clin Invest* 54:853-865. Samuels HH, Ts

121. Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennström B (1986) The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324:635-640.
122. Sarne DH, Refet  
cultured human hepatocytes as an index of thyroid status: reduced thyroxine uptake from serum of patients with nonthyroidal illness. *J Endocrinol Metab* 61:1046-1052.
123. Sato K, Sato HT, Shizume K, Ozawa M, Han DC, Imamura H, Tsushima T, Demura H, Kanaji Y, Ito Y, Obara T, Fujimoto Y, Kanaji Y (1990) Inhibition of 125-I organification and thyroid hormone release by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human thyrocytes in suspension culture. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1735-1743.
124. Sato N, Goto T, Haranaka K, et al (1986) Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition and cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 76:1113-1121.
125. Schussler GC, Orlando J (1978) Fasting decreases triiodothyronine receptor capacity. *Science* 199:686-688.
126. Schwartz HL, St  
tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J Biol Chem* 11794-11799.
127. Siebert PD, Larrick JW (1993) PCR MIMICS: Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *BioTechniques* 14:244-249.
128. Slag MF, Morle  
Hypothyroxinemia in critically ill patients as a predictor of high mortality. *J Am Med Assoc* 245:43-45.
129. Surks MI, Grajower MM, Tai M, DeFesi CR (1978) Decreased hepatic nuclear L-triiodothyronine receptors in rats and mice bearing transplantable neoplasms. *Endocrinology* 103:2234-2239.
130. Tagami T, Naka  
the protein content of thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  in rat tissues by western blotting. *Endocrinology* 132:275-279.
131. Thompson P, Bu  
Wartofsky L (1980) Uremia decreases nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptors in rats. *Endocrinology* 107:1081-1084.

132. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234:470-474.
133. Utiger RD (1987) The thyroid: physiology, hyperthyroidism, hypothyroidism, and painful thyroid. In: Felig P, Baxter JD, Frohman LA (eds.) *J Clin Endocrinol Metab*, 2. Aufl. New York; McGraw-Hill 389-415.
134. van den Berghe euthyroid syndrome in critical illness. *Clin Endocrinol* 41:731-735.
135. van der Poll T, F necrosis factor: a putative mediator of the sick euthyroid syndrome in man. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1567-1572.
136. Vaughan GM, E BA, Mason AD (1985) Nonthyroidal control of metabolism after burn injury: possible role of glucagon. *Metabolism* 34:637-641.
137. Voerman HJ, St Nauta JP, Thijs LG (1992) Pulsatile hormone secretion during severe sepsis: accuracy of different blood sampling regimens. *Metabolism* 41:934-940.
138. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T (1989) The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Experiment Med* 169:333-338.
139. Wang AM, Doyle MV, Mark DF (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9717-9721.
140. Wartofsky L, Burmann KD (1982) Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the „euthyroid sick syndrome“. *Endocrine Rev* 3:164-217.
141. Weinberger C, Thompson C, Ong ES., Lebo R, Gruol DJ, Evans RM (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324:641-646.
142. Wiersinga WM, Frank HJL, Chopra IJ, Solomon DH (1982) Alterations in hepatic nuclear binding of triiodothyronine in experimental diabetes mellitus. *Acta Endocrinol* 99:79.
143. Williams GR, F1 hormone receptor expression in the ‘sick euthyroid’ syndrome. *The Lancet* 2:1477-1481.

144. Wilmore DW (1991) Catabolic illness - strategies for enhancing recovery - review article. *N Engl J Med* 325:695-702.
145. Wolf M, Böhm  
interleukin 1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibit growth hormone stimulation of insulin-like growth factor I synthesis and growth hormone receptor mRNA levels in cultured rat liver cells. *Eur J Endocrinol* 135:729-737.
146. Wolf M, Hansen N, Greten H (1994) Interleukin 1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 6 decrease nuclear thyroid hormone receptor capacity in a liver cell line. *Eur J Endocrinol* 131:307-312.
147. Wolf M, Ingbar  
interact to regulate insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid and circulating levels in the rat. *Endocrinology* 125: 2905-2914.
148. Yen PM, Darlin  
Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) decreases binding to DNA by T<sub>3</sub>-receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. *J Biol Chem* 263:3565-3568.
149. Yen PM, Sunda  
hormone receptor antibodies detect multiple thyroid hormone receptors in rat and human pituitaries. *Endocrinology* 130:1539-1546.

## 7. Wertetabellen

### 7.1 RNA

In der folgenden Tabelle werden die photometrisch gemessenen Werte der optischen Dichte der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm dargestellt. Zur Berechnung der RNA-Konzentration diente der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$ , woraus sich die in der letzten Spalte angegebenen Werte ergaben. Für die Synthese der c-DNA wurde jeweils 1  $\mu\text{g}$  RNA eingesetzt.

<u>Nr.</u>	<u>Stimulation</u>	<u>OD 260</u>	<u>OD 280</u>	<u>OD260/OD280</u>	<u><math>\mu\text{g}/\mu\text{mol}</math></u>
1	6h unstimuliert	0,419	0,213	1,99	1,68
2		0,488	0,246	1,98	1,95
3		0,615	0,313	1,96	2,46
4	6h IL 1 $\beta$ 100	0,663	0,335	1,98	2,65
5		0,607	0,305	1,99	2,43
6		0,466	0,251	1,85	1,864
7	6h TNFa 100	0,43	0,217	1,98	1,72
8		0,522	0,267	1,96	2,09
9		0,464	0,232	2	1,86
10	9h unstimuliert	0,539	0,274	1,97	2,16
11		0,321	0,164	1,96	1,28
12		0,625	0,315	1,98	2,5
13	9h IL 1 $\beta$ 10	0,694	0,356	1,95	2,78
14		0,431	0,212	2,03	1,72
15		0,437	0,217	2,01	1,75
16	9h IL 1 $\beta$ 50	0,18	0,088	2,05	0,72
17		0,774	0,399	1,94	3,096
18		0,55	0,267	2,06	2,2
19	9h IL 1 $\beta$ 100	0,59	0,345	1,71	2,36
20		0,36	0,182	1,98	1,44
21		0,086	0,047	1,83	0,34
22	9h TNFa 10	0,444	0,221	2,01	1,78
23		0,689	0,343	2,01	2,76
24		0,264	0,128	2,06	1,06
25	9h TNFa 50	0,657	0,327	2,01	2,63
26		0,354	0,173	2,05	1,42
27		0,659	0,324	2,03	2,64
28	9h TNFa 100	0,426	0,215	1,98	1,7

29		0,531	0,267	1,99	2,12
30		0,555	0,281	1,98	2,22
31	15h unstimuliert	0,345	0,177	1,95	1,38
32		0,357	0,181	1,97	1,43
33		0,516	0,282	1,83	2,06
34	15h IL 1 $\beta$ 100	0,634	0,319	1,99	2,54
35		0,578	0,32	1,81	2,31
36		0,372	0,19	1,958	1,49
37	15h TNFa 100	0,356	0,181	1,97	1,42
38		0,06	0,033	1,82	0,24
39		0,737	0,368	2	2,95

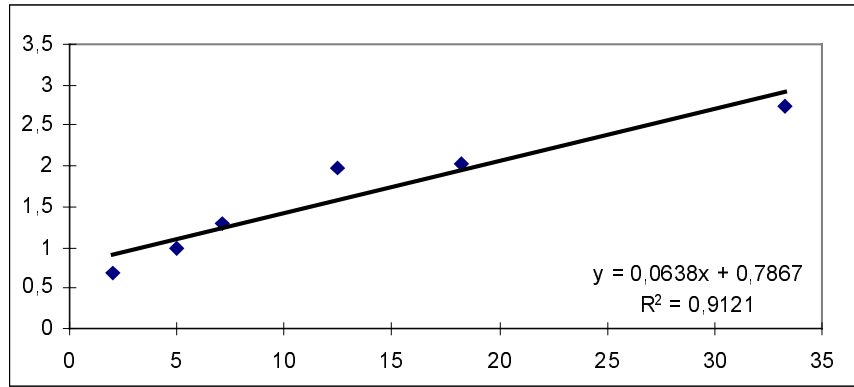
## 7.2 PCR-Essays

Im folgenden Abschnitt werden die Essays der quantitativen kompetitiven PCR dargestellt. Die ersten drei Kästchen einer Seite zeigen die gemessenen radioaktiven Werte der c-DNA und der korrespondierenden MIMICs. In den Diagrammen wurde das Verhältnis von c-DNA zu MIMIC gegen den reziproken Wert der MIMIC-Konzentration aufgetragen. Die Berechnung der mRNA-Konzentration des  $\beta_1$ -T<sub>3</sub>-Rezeptors aus der Geradengleichung erfolgte mit Hilfe der linearen Regression. Im vierten Kasten erfolgte die Berechnung der linearen Regression sowie der mRNA-Konzentration anhand der Mittelwerte der gemessenen radioaktiven Werte der c-DNA und des korrespondierenden MIMICs.



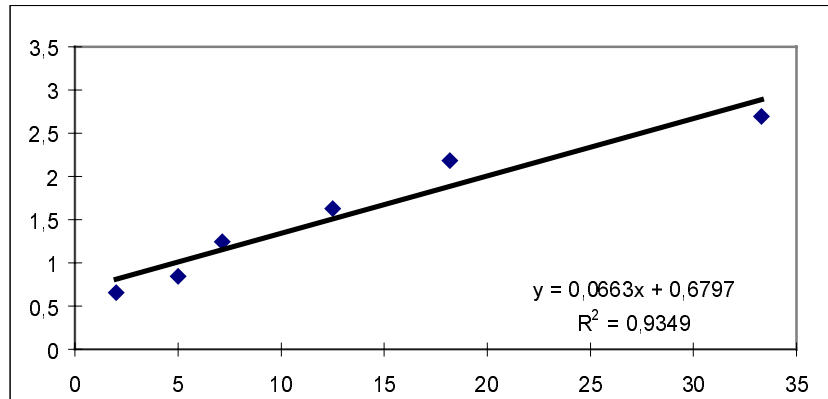
cDNA1	MIMIC1
1379	2025
1726	1753
1935	1494
2708	1374
2293	1127
2817	1028

Konzentr.	Quotient
2	0,680987654
5	0,984597832
7,14	1,295180723
12,5	1,970887918
18,18	2,03460515
33,3	2,740272374



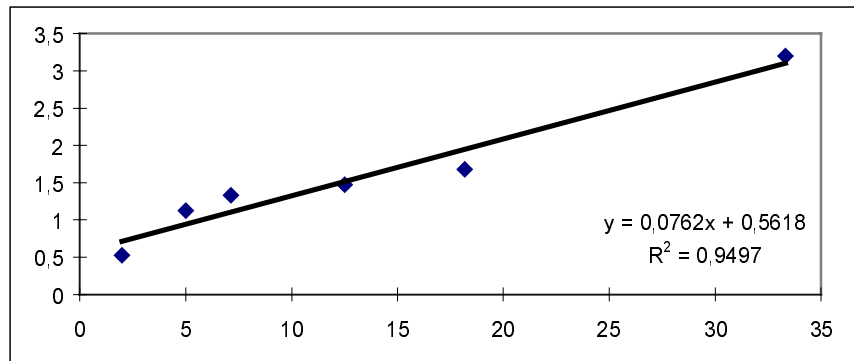
cDNA2	MIMIC2
1521	2312
2008	2365
2071	1664
2209	1357
2357	1078
2472	918

Konzentr.	Quotient
2	0,657871972
5	0,849048626
7,14	1,244591346
12,5	1,62785556
18,18	2,1864564
33,3	2,692810458



cDNA3	MIMIC3
969	1844
1500	1339
2499	1878
2551	1734
3180	1896
3690	1153

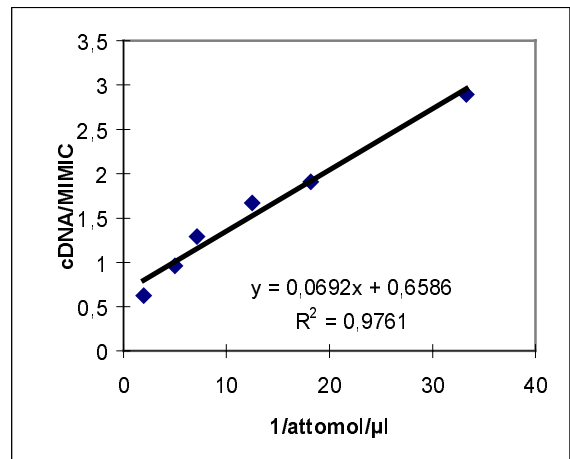
Konzentr.	Quotient
2	0,525488069
5	1,120238984
7,14	1,330670927
12,5	1,471164937
18,18	1,67721519
33,3	3,200346921



cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
1379	1521	969	1289,666667	0,625950493	2
1726	2008	1500	1744,666667	0,959135056	5
1935	2071	2499	2168,333333	1,291699762	7,14
2708	2209	2551	3734	1,67256439	12,5
2293	2357	3180	3915	1,909290417	18,18
2817	2472	3690	2993	2,897386254	33,3

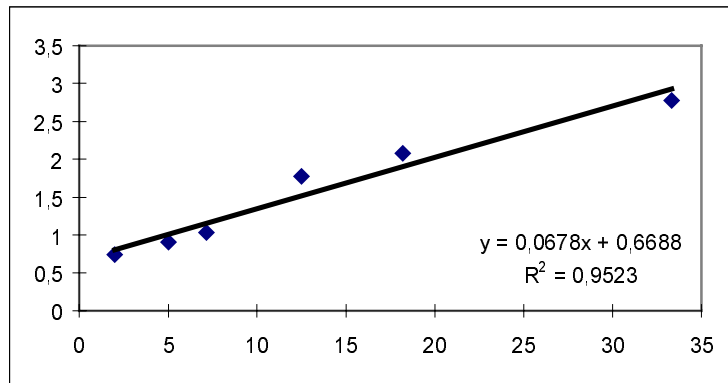
MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
2025	2312	1844	2060,333333
1753	2365	1339	1819
1494	1664	1878	1678,666667
1374	1357	1734	2232,5
1127	1078	1896	2050,5
1028	918	1153	1033
result1	result2	result3	Mittelwert
0,29922949	0,207037647	0,173943409	0,226736849

Konzentr.	Quotient
2	0,625950493
5	0,959135056
7,14	1,291699762
12,5	1,67256439
18,18	1,909290417
33,3	2,897386254



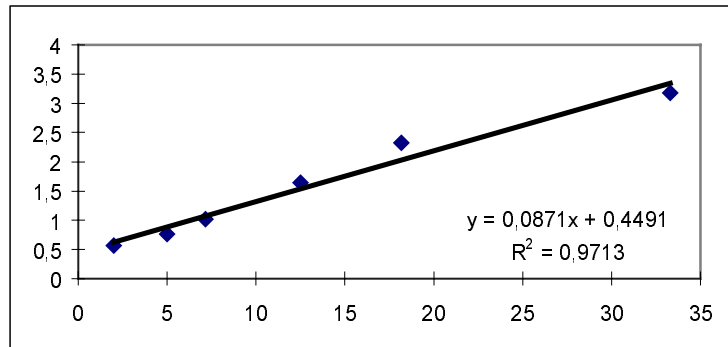
cDNA1	MIMIC1
2832	3820
3476	3881
3985	3856
4116	2315
6218	2990
5923	2132

Konzentr.	Quotient
2	0,74136125
5	0,90145228
7,14	1,03345435
12,5	1,77796976
18,18	2,07959866
33,3	2,77814258



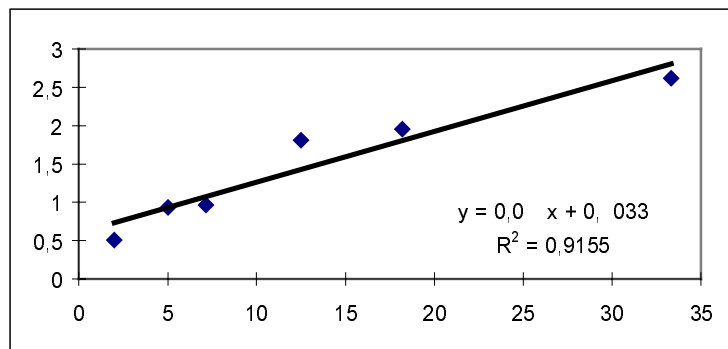
cDNA2	MIMIC2
5037	8887
5134	6745
4903	4826
5240	3183
7313	3143
5874	1846

Konzentr.	Quotient
2	0,56678294
5	0,76115641
7,14	1,01595524
12,5	1,64624568
18,18	2,32675787
33,3	3,18201516



cDNA3	MIMIC3
4570	9063
4699	5034
4785	4959
6399	3541
6937	3555
6555	2505

Konzentr.	Quotient
2	0,50424804
5	0,93345252
7,14	0,96491228
12,5	1,80711663
18,18	1,95133614
33,3	2,61676646

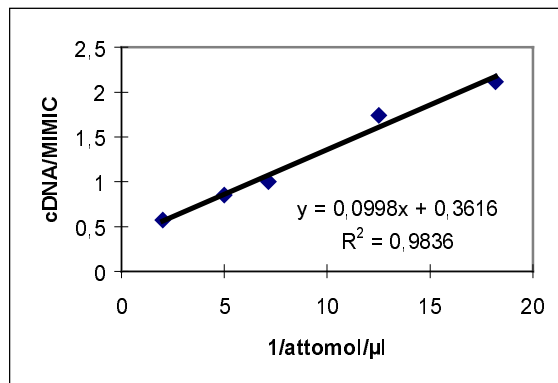


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
2832	5037	4570	4146,33333	0,57138263	2
3476	5134	4699	4436,33333	0,84987228	5
3985	4903	4785	4557,66666	1,00234586	7,14
4116	5240	6399	5251,66666	1,74300254	12,5
6218	7313	6937	6822,66666	2,11271676	18,18

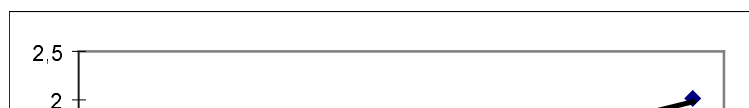
MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
3820	8887	9063	7256,66666
3881	6745	5034	5220
3856	4826	4959	4547
2315	3183	3541	3013
2990	3143	3555	3229,33333

result1	result2	result3	Mittelwert
0,20503282	0,15810730	0,16644453	0,17652822

Konzentr.	Quotient
2	0,57138263
5	0,84987229
7,14	1,00234586
12,5	1,74300254
18,18	2,11271676



cDNA1	MIMIC1
-------	--------

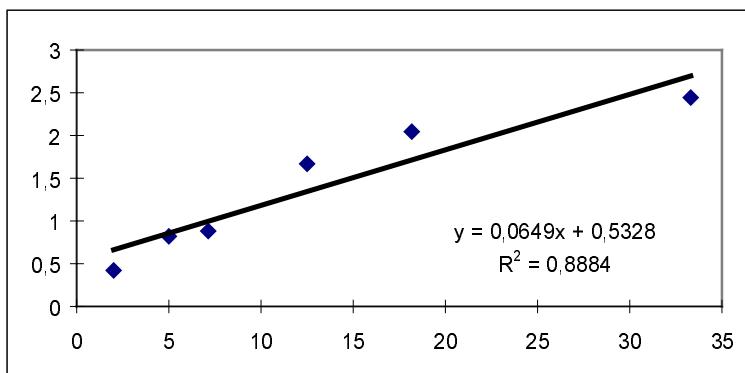


2704	5183
2244	3832
2840	3427
2436	2354
2457	2106
3666	1821

Konzentr.	Quotient
2	0,52170557
5	0,58559499
7,14	0,82871316
12,5	1,03483432
18,18	1,16666666
33,3	2,01317957

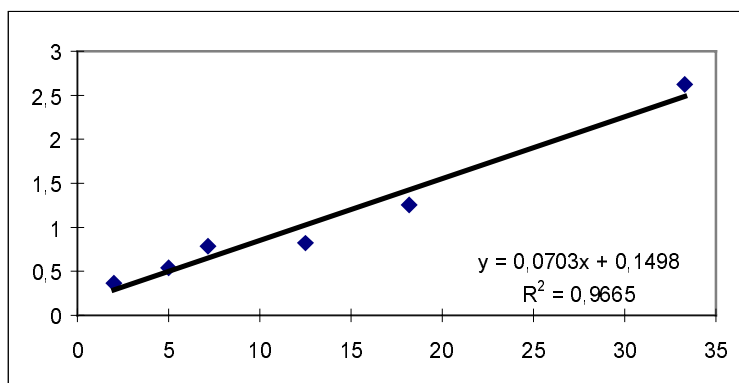
cDNA2	MIMIC2
2942	7032
4597	5614
4472	5049
830	498
6215	3047
5322	2181

Konzentr.	Quotient
2	0,41837315
5	0,81884574
7,14	0,88571994
12,5	1,66666666
18,18	2,03971119
33,3	2,44016506



cDNA3	MIMIC3
2659	7257
3816	7113
4301	5489
5907	7189
5767	4583
8360	3190

Konzentr.	Quotient
2	0,36640485
5	0,53648249
7,14	0,78356713
12,5	0,82167199
18,18	1,25834606
33,3	2,62068965

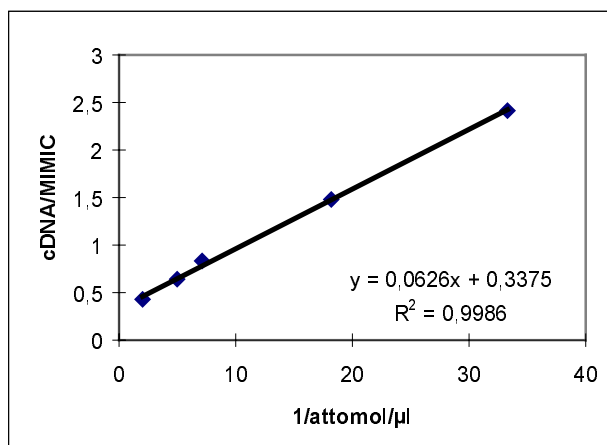


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
2704	2942	2659	2768,33333	0,42650986	2
2244	4597	3816	3552,33333	0,64357751	5
2840	4472	4301	3871	0,83157894	7,14
2457	6215	5767	4813	1,48305258	18,18
3666	5322	8360	5782,66666	2,41212458	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
5183	7032	7257	6490,66666
3832	5614	7113	5519,66666
3427	5049	5489	4655
2106	3047	4583	3245,33333
1821	2181	3190	2397,33333

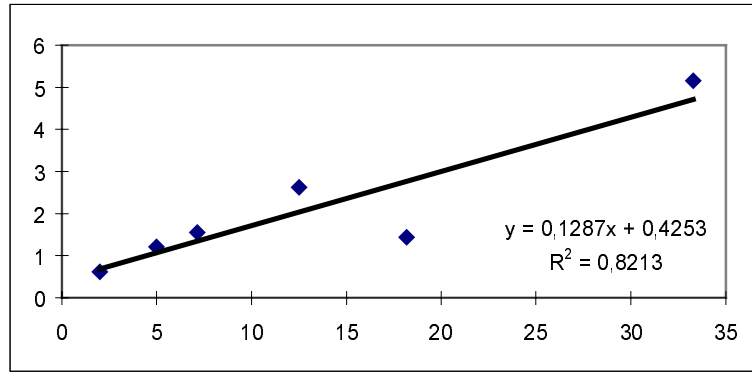
result1	result2	result3	Mittelwert
0,08009161	0,13898375	0,08263715	0,10057083

Konzentr.	Quotient
2	0,42650986
5	0,64357751
7,14	0,83157894
18,18	1,48305258
33,3	2,41212458



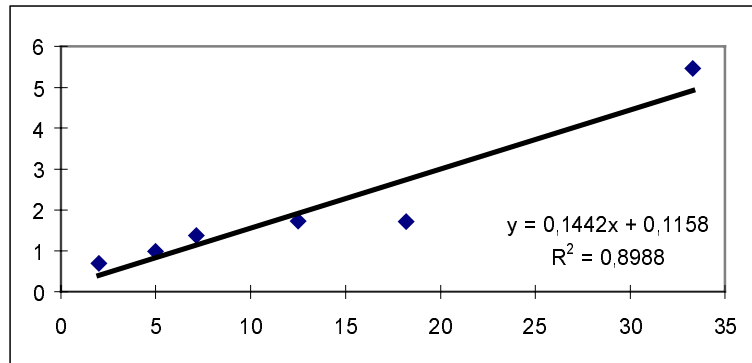
cDNA1	MIMIC1
2548	4086
2529	2093
2851	1833
4650	1767
3220	2237
2708	526

Konzentr.	Quotient
2	0,62359275
5	1,20831342
7,14	1,55537370
12,5	2,63157894
18,18	1,43942780
33,3	5,14828897



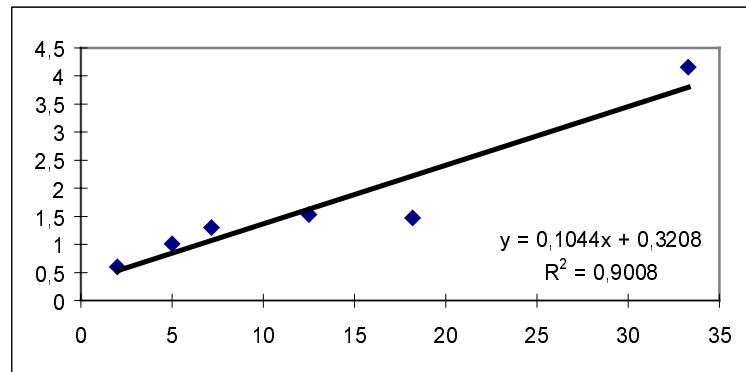
cDNA2	MIMIC2
2817	4024
2717	2747
3160	2299
3017	1754
3258	1900
2211	405

Konzentr.	Quotient
2	0,70004970
5	0,98907899
7,14	1,37451065
12,5	1,72006841
18,18	1,71473684
33,3	5,45925925



cDNA3	MIMIC3
2280	3811
1983	1960
3467	2653
2693	1757
4345	2955
4574	1100

Konzentr.	Quotient
2	0,59826817
5	1,01173469
7,14	1,30682246
12,5	1,53272623
18,18	1,47038917
33,3	4,15818181

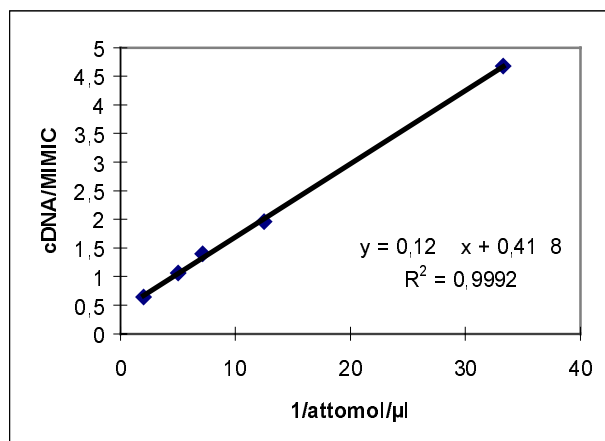


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
2548	2817	2280	2548,33333	0,64130526	2
2529	2717	1983	2409,66666	1,06308823	5
2851	3160	3467	3159,33333	1,39690493	7,14
4650	3017	2693	3453,33333	1,96286472	12,5
2708	2211	4574	3164,33333	4,67405219	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
4086	4024	3811	3973,66666
2093	2747	1960	2266,66666
1833	2299	2653	2261,66666
1767	1754	1757	1759,33333
526	405	1100	677

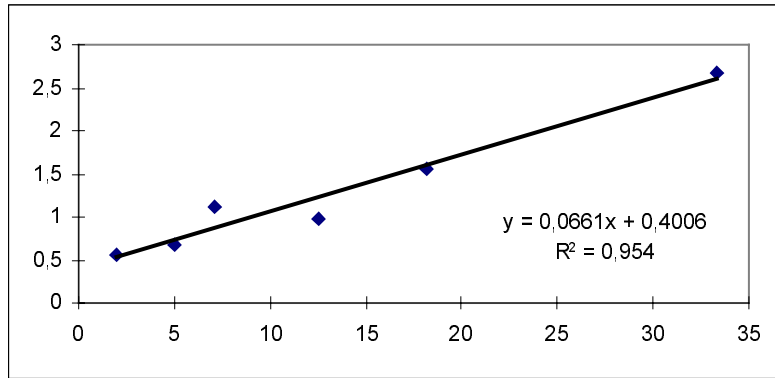
result1	result2	result3	Mittelwert
0,22396374	0,16305301	0,15366233	0,18022636

Konzentr.	Quotient
2	0,64130526
5	1,06308823
7,14	1,39690493
12,5	1,96286472
33,3	4,67405219



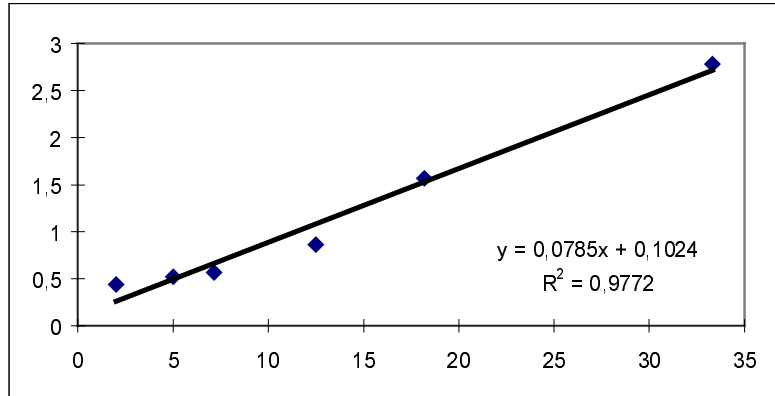
cDNA1	MIMIC1
4833	8642
4511	6683
7963	7066
5198	5328
7243	4653
7052	2639

Konzentr.	Quotient
2	0,55924554
5	0,67499625
7,14	1,12694593
12,5	0,97560060
18,18	1,55663013
33,3	2,67222432



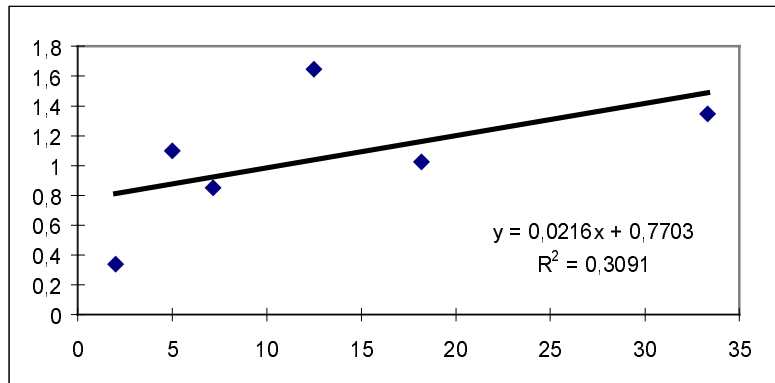
cDNA2	MIMIC2
2490	5681
4690	8986
4332	7608
4003	4621
8129	5174
9737	3500

Konzentr.	Quotient
2	0,43830311
5	0,52192299
7,14	0,56940063
12,5	0,86626271
18,18	1,57112485
33,3	2,782



cDNA3	MIMIC3
3083	9113
3791	3448
5206	6108
7933	4821
5128	5006
6355	4714

Konzentr.	Quotient
2	0,33830791
5	1,09947795
7,14	0,85232482
12,5	1,64550923
18,18	1,02437075
33,3	1,34811200

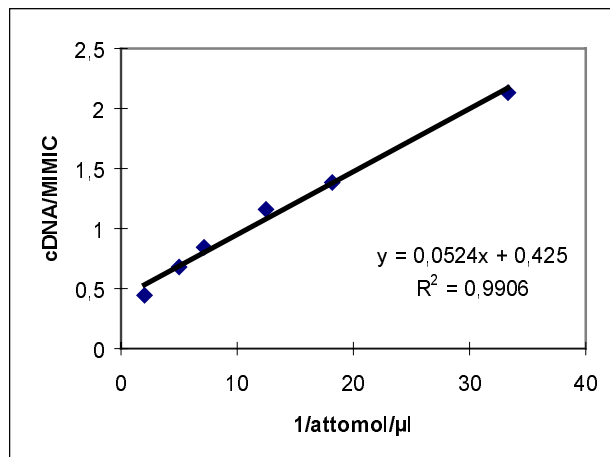


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
4833	2490	3083	3468,66666	0,44401775	2
4511	4690	3791	4330,66666	0,67960454	5
7963	4332	5206	5833,66666	0,84212299	7,14
5198	4003	7933	5711,33333	1,16005416	12,5
7243	8129	5128	6833,33333	1,38205352	18,18
7052	9737	6355	7714,66666	2,13249792	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
8642	5681	9113	7812
6683	8986	3448	6372,33333
7066	7608	6108	6927,33333
5328	4621	4821	4923,33333
4653	5174	5006	4944,33333
2639	3500	4714	3617,66666

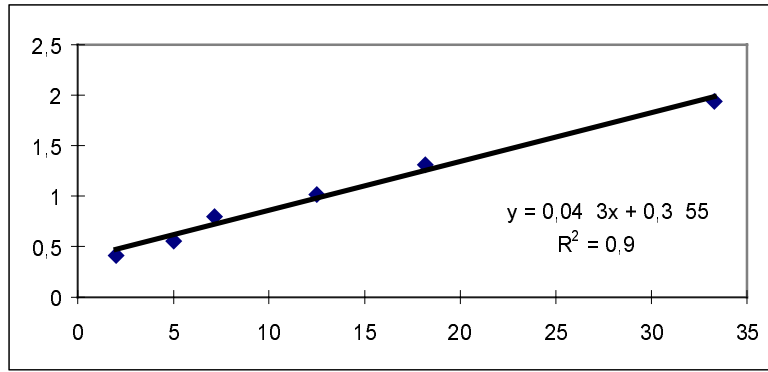
result1	result2	result3	Mittelwert
0,11024483	0,08748674	0,09395871	0,09723009

Konzentr.	Quotient
2	0,44401775
5	0,67960454
7,14	0,84212299
12,5	1,16005416
18,18	1,38205352
33,3	2,13249792



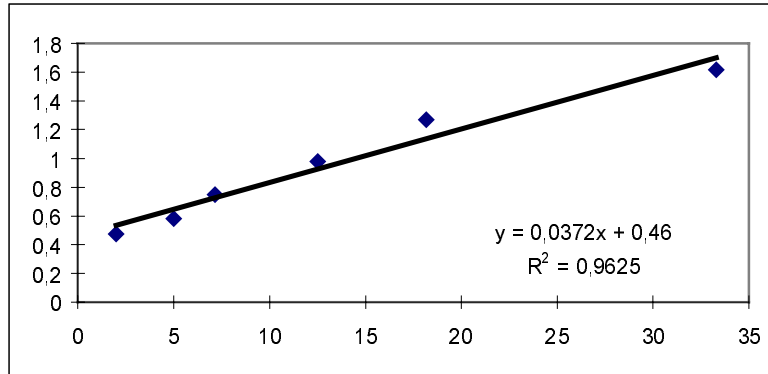
cDNA1	MIMIC1
5832	14151
6922	12456
6235	7831
7689	7567
8689	6616
10005	5167

Konzentr.	Quotient
2	0,41212635
5	0,55571612
7,14	0,79619461
12,5	1,01612264
18,18	1,31333131
33,3	1,93632668



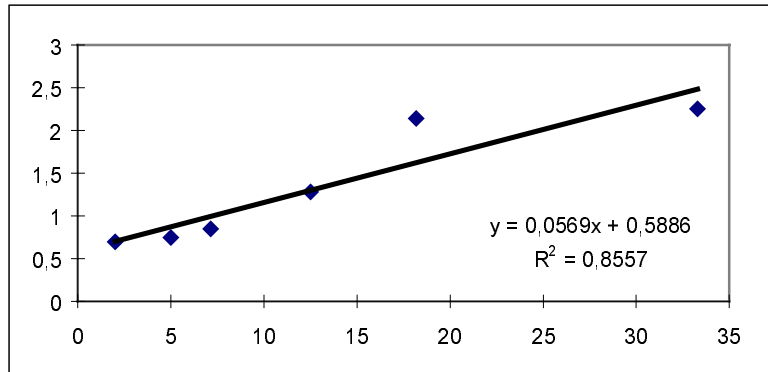
cDNA2	MIMIC2
5056	10668
4496	7727
6882	9204
6943	7076
6930	5467
7234	4477

Konzentr.	Quotient
2	0,47394075
5	0,58185583
7,14	0,74771838
12,5	0,98120407
18,18	1,26760563
33,3	1,61581416



cDNA3	MIMIC3
7428	10668
7436	9952
7828	9204
9080	7076
9967	4652
10095	4477

Konzentr.	Quotient
2	0,69628796
5	0,7471865
7,14	0,85049978
12,5	1,28321085
18,18	2,14251935
33,3	2,25485816

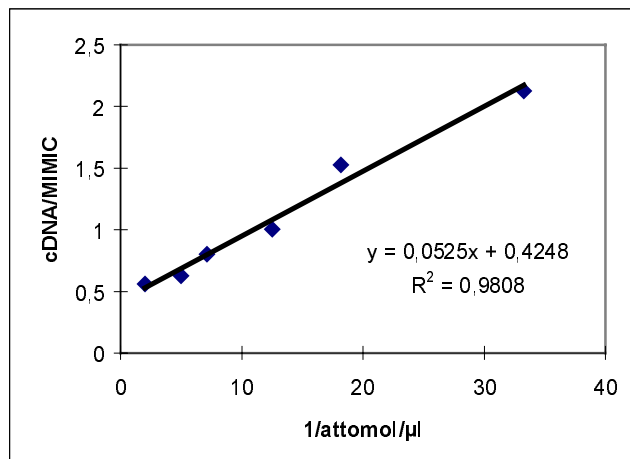


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
5832	5056	9050	6646	0,56183954	2
6922	4496	7436	6284,66666	0,62565123	5
6235	6882	7910	7009	0,80136438	7,14
7689	6943	7076	7236	1,00411674	12,5
8689	6930	9967	8528,66666	1,52889154	18,18
10005	6930	13075	10003,3333	2,12520359	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
14151	10668	10668	11829
12456	7727	9952	10045
7831	9204	9204	8746,33333
7467	7076	7076	7206,33333
6616	5467	4652	5578,33333
5167	4477	4477	4707

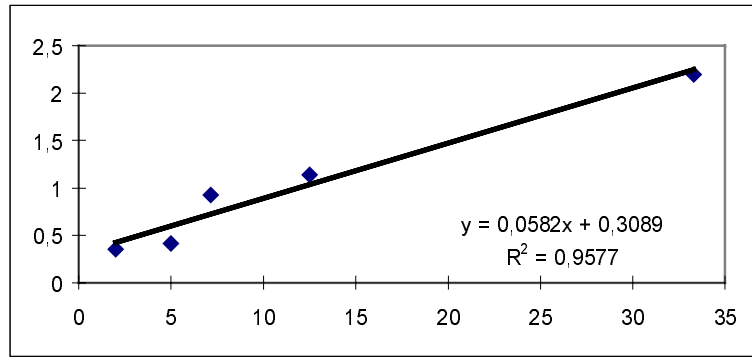
result1	result2	result3	Mittelwert
0,07741724	0,06893635	0,13823804	0,09486388

Konzentr.	Quotient
2	0,56183954
5	0,62565123
7,14	0,80136438
12,5	1,00411675
18,18	1,52889154
33,3	2,12520359



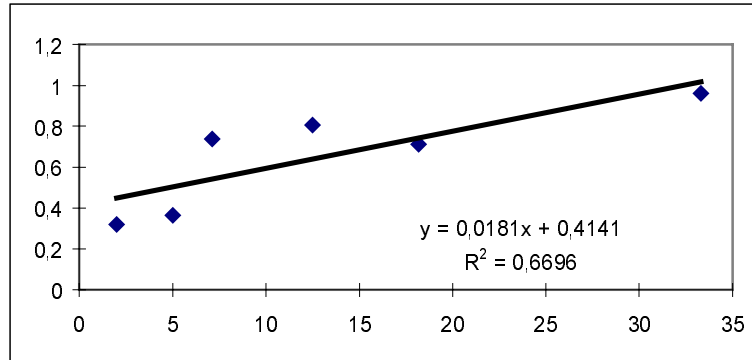
cDNA1	MIMIC1
1770	5031
2499	5999
3788	4087
4452	3902
5090	2319

Konzentr.	Quotient
2	0,35181872
5	0,41656942
7,14	0,9268412
12,5	1,14095335
33,3	2,1949116



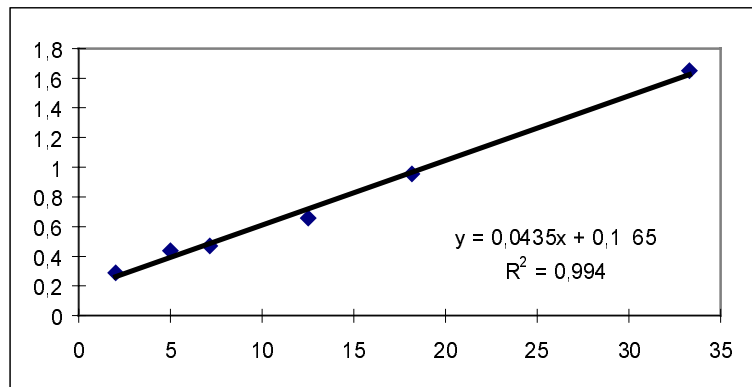
cDNA2	MIMIC2
2408	7527
2543	6984
3261	4420
2583	3200
3073	4322
3390	3532

Konzentr.	Quotient
2	0,31991497
5	0,36411798
7,14	0,73778280
12,5	0,8071875
18,18	0,71101342
33,3	0,95979614



cDNA3	MIMIC3
3266	11351
2887	6627
2465	5245
2157	3284
4980	5218
1824	1105

Konzentr.	Quotient
2	0,28772795
5	0,43564207
7,14	0,46997140
12,5	0,65682095
18,18	0,95438865
33,3	1,65067873

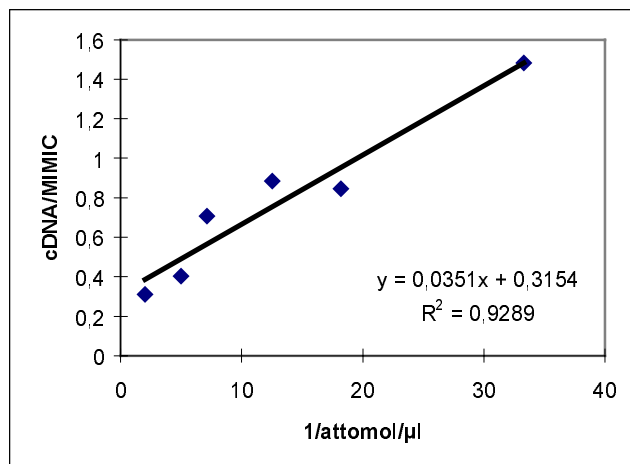


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
1770	2408	3266	2481,33333	0,31134719	2
2499	2543	2887	2643	0,40433452	5
3788	3261	2465	3171,33333	0,70720285	7,14
4452	2583	2157	3064	0,88503755	12,5
	3073	4980	4026,5	0,84412997	18,18
5090	3390	1824	3434,66666	1,48131109	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
5031	7527	11351	7969,66666
5999	6984	6627	6536,66666
3788	4420	5245	4484,33333
3902	3200	3284	3462
	4322	5218	4770
2319	3532	1105	2318,66666

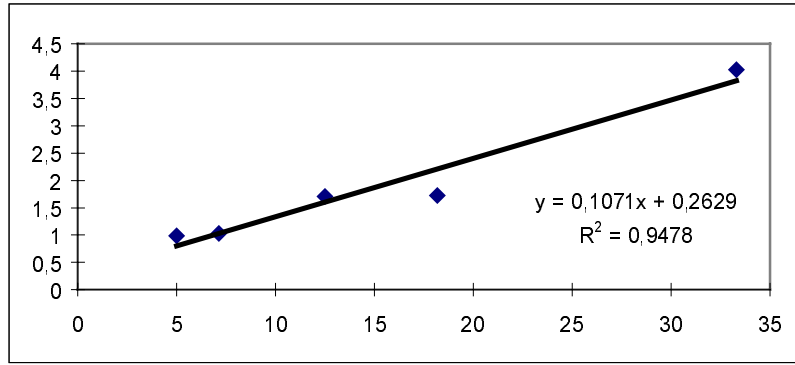
result1	result2	result3	Mittelwert
0,08416304	0,03092084	0,05279685	0,05596024

Konzentr.	Quotient
2	0,31134719
5	0,40433452
7,14	0,70720285
12,5	0,88503755
18,18	0,84412997
33,3	1,48131109



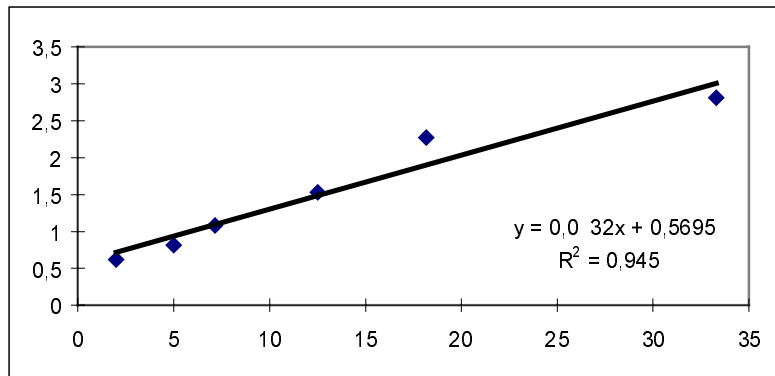
cDNA1	MIMIC1
5621	5713
3709	3610
4839	2841
7758	4509
7839	1946

Konzentr.	Quotient
5	0,98389637
7,14	1,02742382
12,5	1,70327349
18,18	1,72055888
33,3	4,02826310



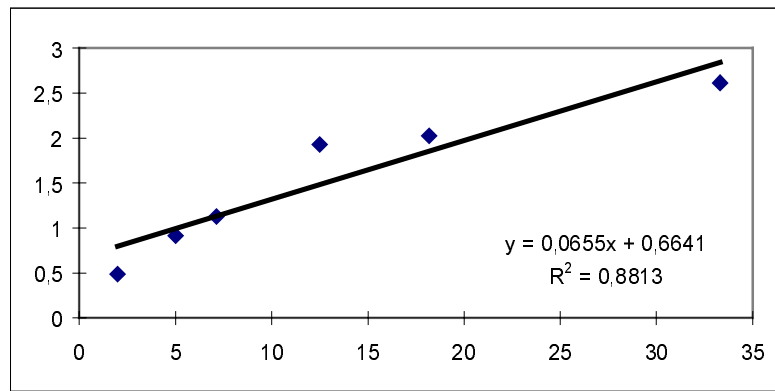
cDNA2	MIMIC2
5714	9186
6659	8156
7262	6724
8045	5253
8699	3827
8322	2960

Konzentr.	Quotient
2	0,62203352
5	0,81645414
7,14	1,08001189
12,5	1,53150580
18,18	2,27305983
33,3	2,81148648



cDNA3	MIMIC3
6336	12968
7326	8007
6197	5496
6994	3630
6490	3200
7235	2768

Konzentr.	Quotient
2	0,48858729
5	0,91494941
7,14	1,12754730
12,5	1,92672176
18,18	2,028125
33,3	2,61380057

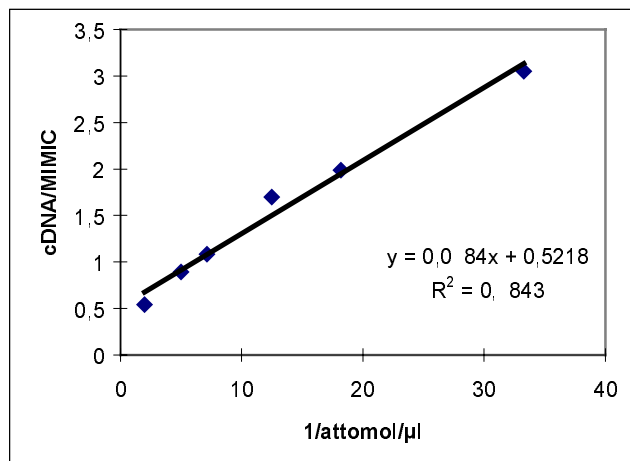


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
5621	5714	6336	6025	0,54391983	2
3709	6659	7326	6535,33333	0,89623331	5
4839	7262	6197	5722,66666	1,08452305	7,14
7758	8045	6994	6626	1,69549641	12,5
7839	8699	6490	7649	1,98916435	18,18
	8322	7235	7798,66666	3,04873599	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
5713	9186	12968	11077
3610	8156	8007	7292
2841	6724	5496	5276,66666
4509	5253	3630	3908
1946	3827	3200	3845,33333
	2960	2768	2558

result1	result2	result3	Mittelwert
0,14523890	0,17001158	0,19493803	0,17006284

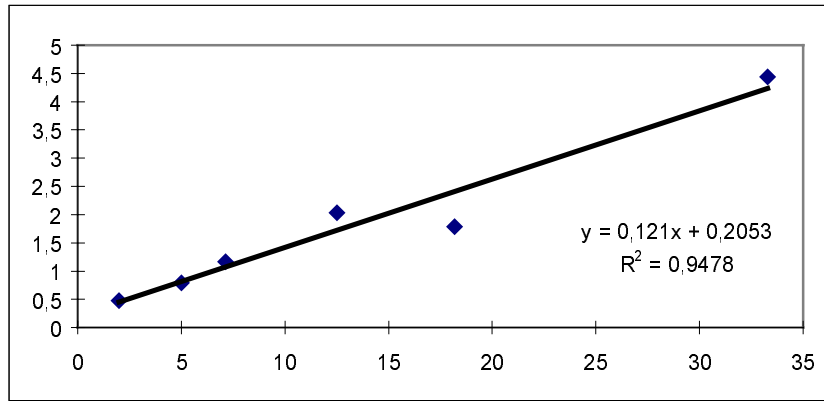
Konzentr.	Quotient
2	0,54391983
5	0,89623331
7,14	1,08452305
12,5	1,69549641
18,18	1,98916435
33,3	3,04873599





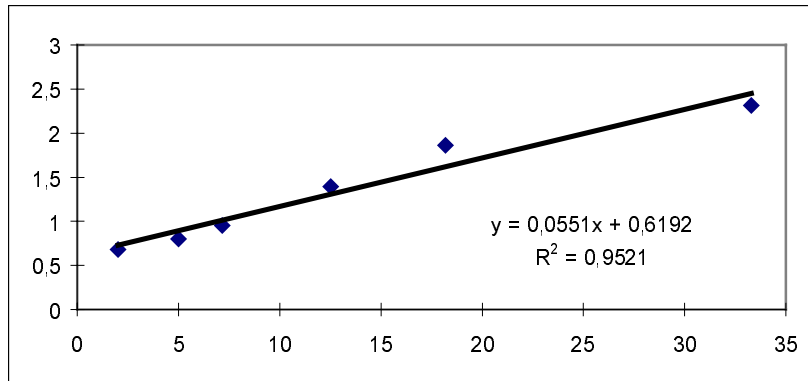
cDNA1	MIMIC1
2455	5138
3863	4891
4363	3747
6410	3158
6018	3368
6907	1557

Konzentr.	Quotient
2	0,47781237
5	0,78981803
7,14	1,16439818
12,5	2,02976567
18,18	1,78681710
33,3	4,43609505



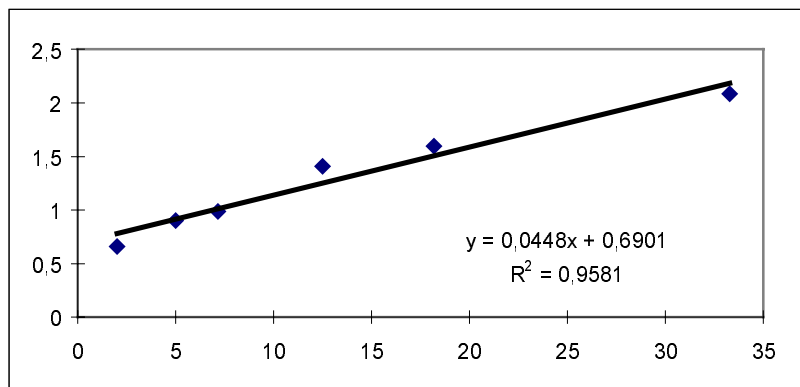
cDNA2	MIMIC2
3866	5662
4244	5287
5231	5477
6908	4944
7035	3774
8528	3684

Konzentr.	Quotient
2	0,68279759
5	0,80272366
7,14	0,9550849
12,5	1,39724919
18,18	1,86406995
33,3	2,31487513



cDNA3	MIMIC3
5682	8623
7600	8436
7865	7945
9778	6950
10136	6342
10421	4997

Konzentr.	Quotient
2	0,65893540
5	0,90090090
7,14	0,98993077
12,5	1,40690647
18,18	1,59823399
33,3	2,08545127

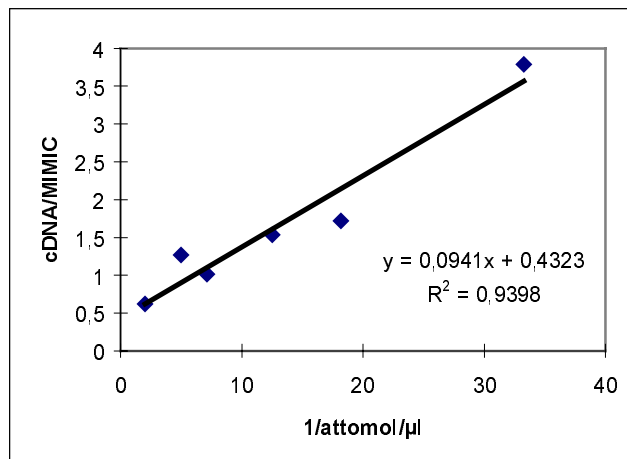


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
2455	3866	5682	4001	0,61797868	2
3863	4244	7600	7853,5	1,26574084	5
4363	5231	7865	5819,66666	1,01689090	7,14
6410	6908	9778	7698,66666	1,53441403	12,5
6018	7035	10136	7729,66666	1,71974191	18,18
6907	8523	10421	12925,5	3,78750732	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
5138	5662	8623	6474,33333
4891	5287	8436	6204,66666
3747	5477	7945	5723
3158	4944	6950	5017,33333
3368	3774	6342	4494,66666
1557	3684	4997	3412,66666

result1	result2	result3	Mittelwert
0,15226320	0,14459826	0,14456046	0,14714064

Konzentr.	Quotient
2	0,61797868
5	1,26574084
7,14	1,01689090
12,5	1,53441403
18,18	1,71974192
33,3	3,78750732



MIMIC1

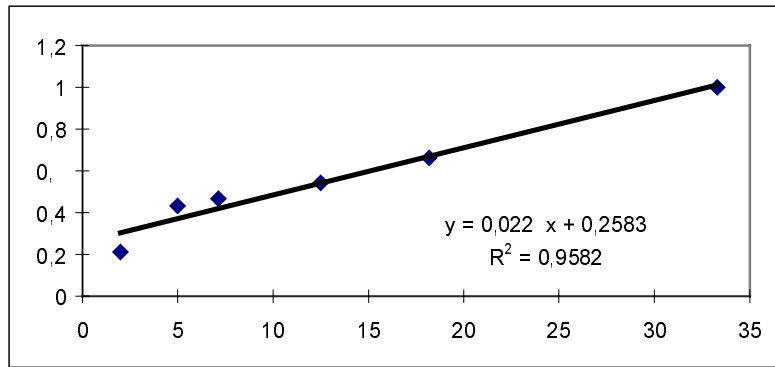


1681	8204
1719	7054
2630	5498
2571	4590
3813	3724
4093	3544

Konzentr.	Quotient
2	0,20490004
5	0,24369152
7,14	0,47835576
12,5	0,56013071
18,18	1,02389903
33,3	1,15490971

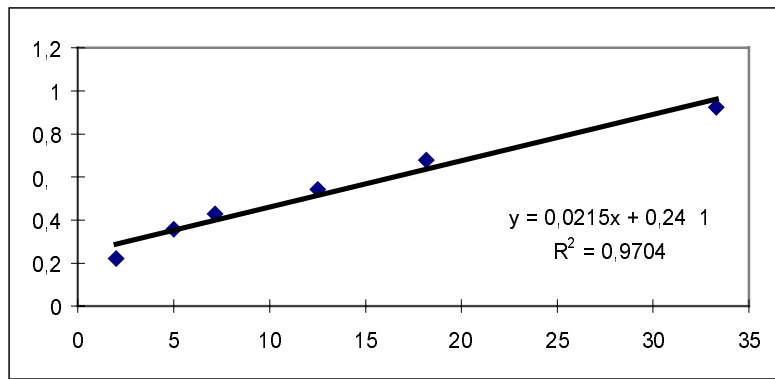
cDNA2	MIMIC2
1821	8623
2421	5600
2698	5770
2709	4996
2623	3961
3671	3667

Konzentr.	Quotient
2	0,21117940
5	0,43232142
7,14	0,46759098
12,5	0,54223379
18,18	0,66220651
33,3	1,00109081



cDNA3	MIMIC3
1709	7698
3102	8694
3434	7995
3535	6509
3398	5009
3026	3271

Konzentr.	Quotient
2	0,22200571
5	0,35679779
7,14	0,42951845
12,5	0,54309417
18,18	0,67837891
33,3	0,92509935



cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
1681	1821	1709	1737	0,21247706	2
1719	2421	3102	2414	0,33923552	5
2630	2698	3434	2920,66666	0,45486165	7,14
2571	2709	3535	2938,33333	0,54768561	12,5
3813	2623	3398	3278	0,77469670	18,18
4093	3671	3026	3596,66666	1,02938370	33,3

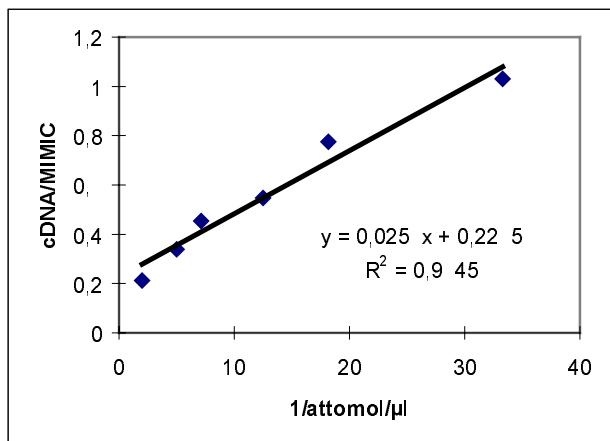
MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
8204	8623	7698	8175
7054	5600	8694	7116
5498	5770	7995	6421
4590	4996	6509	5365
3724	3961	5009	4231,33333
3544	3667	3271	3494

result1	result2	result3	Mittelwert
0,06085722	0,03049301	0,02849318	0,03994781

Konzentr.	Quotient
2	0,21247706
5	0,33923552
7,14	0,45486165
12,5	0,54768561
18,18	0,77469671
33,3	1,02938370

cDNA1	MIMIC1
5934	6147

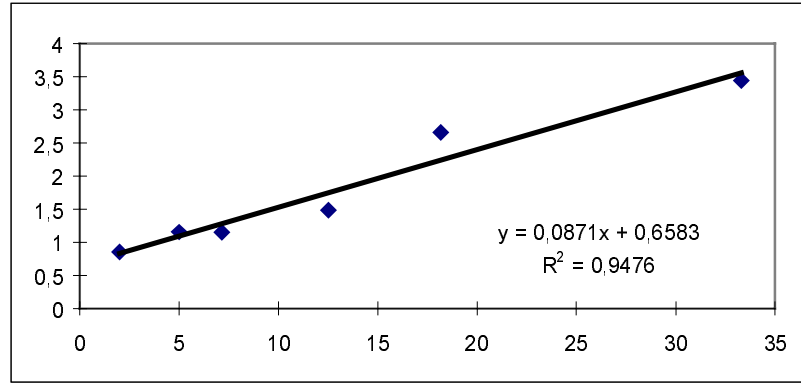


5149	5190
5519	4569
7273	3502
7862	3444
6328	1569

Konzentr.	Quotient
2	0,96534895
5	0,99210019
7,14	1,20792295
12,5	2,07681325
18,18	2,28281068
33,3	4,03314212

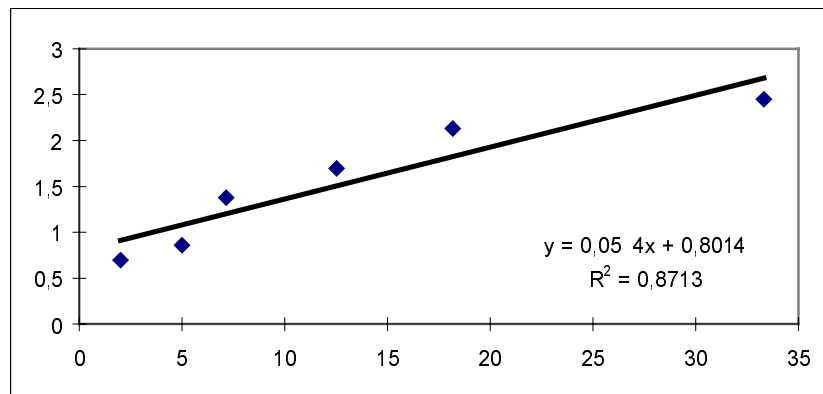
cDNA2	MIMIC2
5657	6621
5317	4597
6008	5218
5440	3659
7914	2976
6959	2020

Konzentr.	Quotient
2	0,85440265
5	1,15662388
7,14	1,15139900
12,5	1,48674501
18,18	2,65927419
33,3	3,44504950



cDNA3	MIMIC3
4327	6196
4691	5467
5342	3876
5961	3512
7645	3585
6236	2544

Konzentr.	Quotient
2	0,69835377
5	0,85805743
7,14	1,37822497
12,5	1,69732346
18,18	2,13249651
33,3	2,45125786



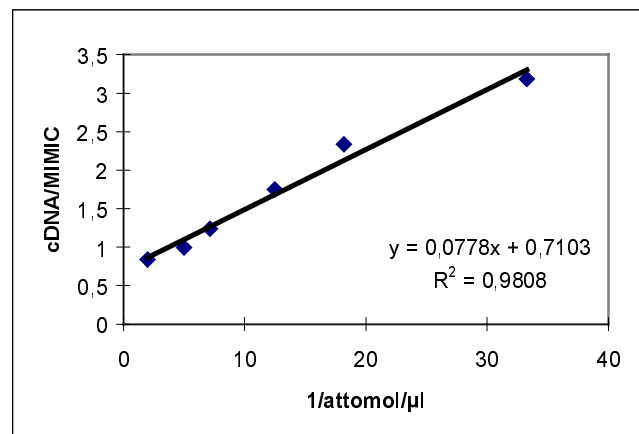
cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
5934	5657	4327	5306	0,83937987	2
5149	5317	4691	5052,33333	0,99364101	5
5519	6008	5342	5623	1,23464832	7,14
7273	5440	5961	6224,66666	1,74964864	12,5
7862	7914	7645	7807	2,34092953	18,18
6328	6959	6236	6507,66666	3,18327083	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
6147	6621	6196	6321,33333
5190	4597	5467	5084,66666
4569	5218	3876	4554,33333
3502	3659	3512	3557,66666
3444	2976	3585	3335
1569	2020	2544	2044,33333

result1	result2	result3	Mittelwert
0,25724637	0,25488550	0,28407355	0,26540181

Konzentr.	Quotient
2	0,83937987
5	0,99364101
7,14	1,23464832
12,5	1,74964864
18,18	2,34092953
33,3	3,18327083

cDNA1	MIMIC1
1818	3354
3602	3467

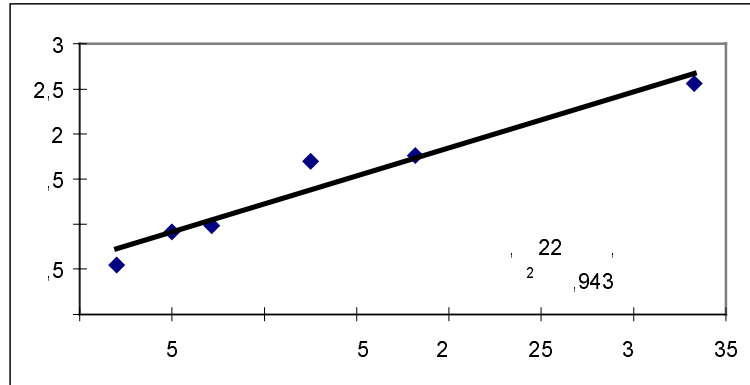


4086	4058
2939	2614
4476	3083
4421	1074

Konzentr.	Quotient
2	0,54203935
5	1,03893856
7,14	1,00689995
12,5	1,12433052
18,18	1,45183263
33,3	4,11638733

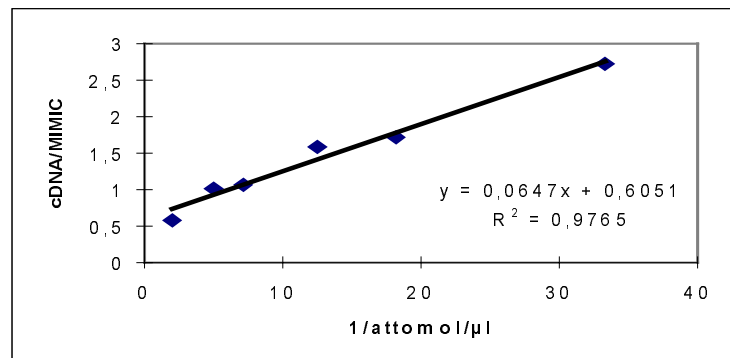
cDNA2	MIMIC2
3872	6134
3708	3305
5755	4692
6519	3645
5318	2723
4653	2114

Konzentr.	Quotient
2	0,63123573
5	1,12193646
7,14	1,22655584
12,5	1,78847736
18,18	1,95299302
33,3	2,20104068



cDNA3	MIMIC3
3558	6531
4289	4690
6115	6228
6865	4038
6640	3766
5779	2259

Konzentr.	Quotient
2	0,54478640
5	0,91449893
7,14	0,98185613
12,5	1,70009905
18,18	1,76314391
33,3	2,55821159



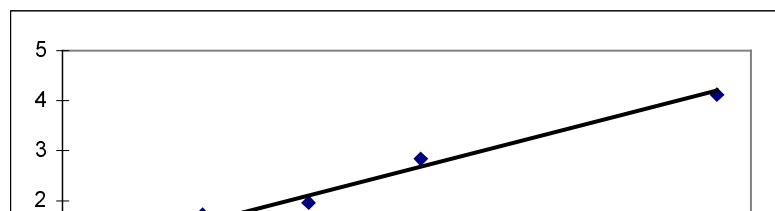
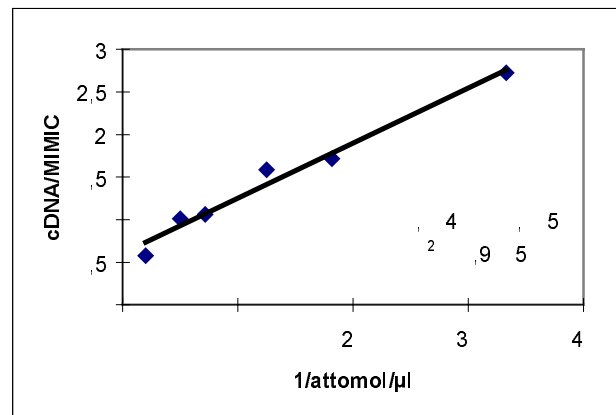
cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
1818	3872	3558	3082,66666	0,57731443	2
3602	3708	4289	3866,33333	1,01195253	5
4086	5755	6115	5318,66666	1,06529576	7,14
2939	6519	6865	5441	1,58521899	12,5
4476	5318	6640	5478	1,71688257	18,18
4421	4653	5779	4951	2,72682210	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
3354	6134	6531	5339,66666
3467	3305	4690	3820,66666
4058	4692	6228	4992,66666
2614	3645	4038	3432,33333
3083	2723	3766	3190,66666
1074	2114	2259	1815,66666

result1	result2	result3	Mittelwert
0,12676401	0,39303699	0,15562950	0,22514350

Konzentr.	Quotient
2	0,57731443
5	1,01195253
7,14	1,06529576
12,5	1,58521899
18,18	1,71688257
33,3	2,72682210

cDNA1	MIMIC1
6147	7251
7162	5152
6879	3980

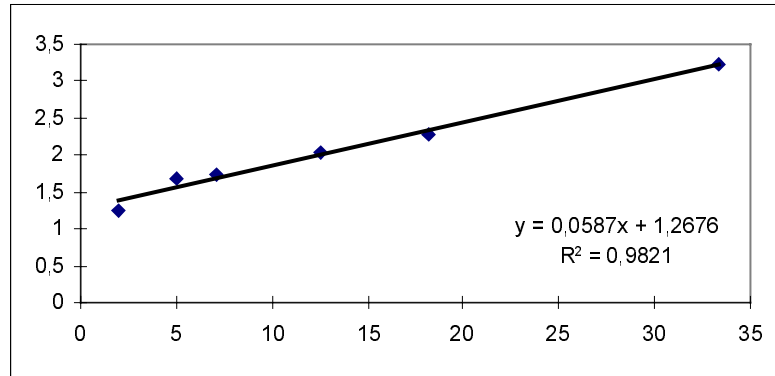


7058	3574
6491	2271
8709	2118

Konzentr.	Quotient
2	0,84774513
5	1,39013975
7,14	1,72839196
12,5	1,97481813
18,18	2,85821224
33,3	4,11189801

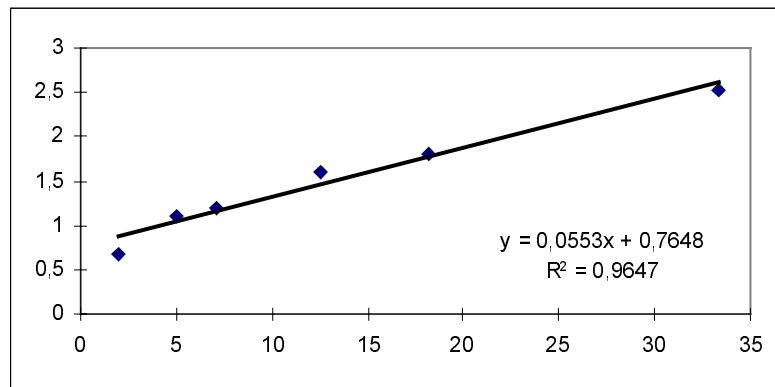
cDNA2	MIMIC2
4625	3717
5443	3237
5556	3194
6783	3348
8793	3866
9714	3013

Konzentr.	Quotient
2	1,24428302
5	1,68149521
7,14	1,73951158
12,5	2,02598566
18,18	2,27444387
33,3	3,22402920



cDNA3	MIMIC3
6779	10071
9301	8343
8943	7509
9967	6252
9791	5420
9649	3816

Konzentr.	Quotient
2	0,67312084
5	1,11482680
7,14	1,19097083
12,5	1,59420985
18,18	1,80645756
33,3	2,52856394

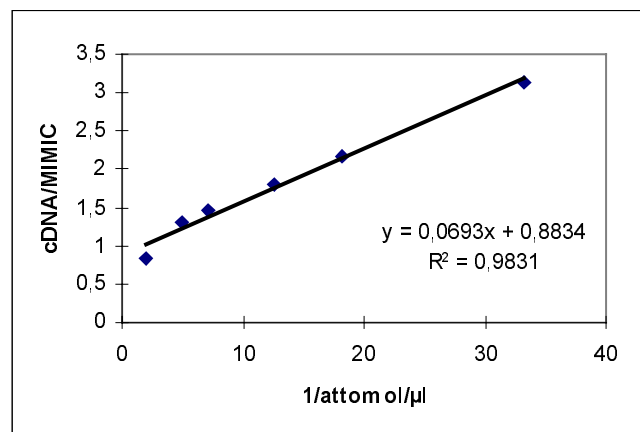


cDNA1	cDNA2	cDNA3	Mittelwert	Quotient	Konzentr.
6147	4625	6779	5850,33333	0,83421265	2
7162	5443	9301	7302	1,30922782	5
6879	5556	8943	7126	1,45596948	7,14
7058	6783	9967	7936	1,80719599	12,5
6491	8793	9791	8358,33333	2,16968071	18,18
8709	9714	9649	9357,33333	3,13758801	33,3

MIMIC1	MIMIC2	MIMIC3	Mittelwert
7251	3717	10071	7013
5152	3237	8343	5577,33333
3980	3194	7509	4894,33333
3574	3348	6252	4391,33333
2271	3866	5420	3852,33333
2118	3013	3816	2982,33333

result1	result2	result3	Mittelwert
0,62257824	0,02587668	0,23508299	0,29451264

Konzentr.	Quotient
2	0,83421265
5	1,30922782
7,14	1,45596948
12,5	1,80719599
18,18	2,16968071
33,3	3,13758801



## 8. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr.med. Matthias Wolf für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe unter sehr guter Betreuung mitarbeiten zu dürfen.

Weiterhin danke ich Frau Marion Priefer für Ihre Assistenz und geduldige Anleitung bei den Laborarbeiten.

## 9. Lebenslauf

Name: Claudia Brinkmann

Geburtsdatum: 17. August 1971

Geburtsort: Hamburg

Anschrift: Sudeckstr. 4  
20249 Hamburg  
Tel: 040/460 60 93

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulbildung: 1977-1981 Grundschule Ohkamp in Hamburg  
1981-1991 Gymnasium Hummelsbüttel in Hamburg  
1987-1988 Austausch-Schülerin an einer High School in  
Minnesota, USA  
1991 Abitur, Gymnasium Hummelsbüttel in Hamburg

Studium: seit 1991 Medizinstudium an der Universität Hamburg  
Aug. 1993 ärztliche Vorprüfung  
Aug. 1994 1. Staatsexamen  
März 1997 2. Staatsexamen  
Nov. 1998 3. Staatsexamen

Famulaturen: März 1994 Praxis Dr. Dörner und Prof. Bützow, Fachärzte für  
Innere Medizin und Gastroenterologie in Hamburg  
Juli-Sept. 1995 Guangxi Medical University in Nanning, China,  
in den Abteilungen für Chirurgie, für Pädiatrie und  
traditionelle chinesische Medizin  
März 1996 Abteilung für Innere Medizin an der Uni-  
versitätsklinik Eppendorf in Hamburg

Nebentätigkeiten: 1993-1995 studentische Aushilfe auf der Unfallchirurgie des  
Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE)  
1995-1996 studentische Aushilfe auf der Intensivstation der

		Neurochirurgie im UKE
	1996-1997	studentische Aushilfe auf der Intensivstation der Inneren Medizin im UKE
	seit 1995	Mitglied der „ Akademie für Akupunktur und Aurikulomedizin“
Dissertation:	seit 1994	experimentelle Doktorarbeit betreut von PD Dr. med. Matthias Wolf, Medizinische Kern- und Poliklinik Hamburg Eppendorf; Thema: „Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ reduzieren die mRNA für $\beta_1$ -Schilddrüsenhormonrezeptoren in kultivierten HepG2-Zellen“
Praktisches Jahr:	Okt. 1997-1998	1. Tertial: Abteilung für Neurologie Klinikum Nord, Betriebsteil Ochsenzoll 2. Tertial: Abteilung für Chirurgie University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA 3. Tertial: Abteilung für Innere Medizin Klinikum Nord, Betriebsteil Ochsenzoll
Berufsausbildung:	seit Feb. 1999	Ärztin im Praktikum in der 1. med. Abteilung des Albertinen Krankenhauses bei Dr. Kremer