

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie III
Biochemische Endokrinologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Hans-Joachim Seitz

**Untersuchungen der Genexpression kardialer
Schilddrüsenhormonrezeptoren am Schweinmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Niklas Sebastian Weber
aus Heidelberg
Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 27.04.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. H.J. Seitz

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Dr. K. Sultan/ PD Dr. U. Borgmeyer

Abkürzungen:

Ct-Wert =	<i>threshold cycle</i> "Schwellenwert-Zyklus", auch Cp-Wert = Crossing Point
DEPC =	<i>diethylene pyrocarbonate</i>
DMEM =	<i>dulbecco's modified eagle medium</i> (standardisiertes Nährmedium für Zellkultur)
DTT =	Dithiothreitol
FCS =	Kälberserum
GAPDH =	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gs α =	α -stimulierende Untereinheit des GTP-bindenden Proteins
LAT =	L-Typ-Aminosäuretransporter
MCT =	Monocarboxylat-Transporter
MyHC =	<i>myosin heavy chain</i>
rt-PCR =	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
RXR =	Retinsäure-X-Rezeptor
SERCA =	<i>sarcoplasmic reticulum calcium-activating ATPase</i>
SDH =	Schilddrüsenhormone
TAT =	T-Typ-Aminosäuretransporter
TR =	Schilddrüsenhormonrezeptor (-en)
T3R =	T3-Rezeptor (-en)
TRE =	Schilddrüsenhormon- responsives Element
TRH =	<i>thyrotropin releasing hormone</i>
TSH =	thyreoideastimulierendes Hormon

Anmerkungen:

Teile der Ergebnisse wurden auf folgenden Tagungen präsentiert

- European Thyroid Association (ETA), Istanbul, Türkei (2004)
- Arbeitstagung für experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), Berlin (2004)
- European Congress of Endocrinology (ECE), Göteborg, Schweden (2005)

Die Promotion wurde durch ein Stipendium des Graduiertenkolleg **GRK-336: „Molekulare Endokrinologie -Molekularer Stoffwechsel“** wesentlich gefördert.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	8
1.1 Schilddrüsenhormone – Aufbau und Funktion	8
1.1.1 Bedeutung	8
1.1.2 Regulierung	9
1.1.3 Synthese	10
1.1.4 Transport und zelluläre Aufnahme	11
1.1.5 Signalvermittlung durch T3R	12
1.1.6 Verteilung der T3R	15
1.2 Schilddrüsenhormone und das Herz	17
1.2.1 Expression der T3R am Herzen	17
1.2.2 Physiologie und Pathologie der Schilddrüsenhormone am Herzen	21
1.3 Schilddrüsenhormone und die Leber	23
2. Arbeitshypothese und Fragestellung	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Probengewinnung	25
3.1.1 Schlachthof	25
3.1.2 Präparation	25
3.1.3 Präparation des Reizleitungssystems des Herzens	25
3.2 RNA-Extraktion/ Quantifizierung	27
3.3 RNA-Gelelektrophorese	28
3.4 mRNA-cDNA Umschreibung	29
3.5 LC-Reaktionsaufbau	29
3.5.1 Theorie der Probenzusammenstellung	29
3.5.2 Technischer Ablauf der rt-PCR	30
3.5.3 Kalibrator	30
3.5.4 Duplikate und Verdünnungsreihen	31
3.6 LC-Reaktionskontrolle	32
3.6.1 Quantifizierungskurve	32
3.6.2 Schmelzkurve	33

	Seite
3.7 LC-Datengewinnung und -berechnung	34
3.7.1 Ct-Werte (crossing points) und delta-delta Methode	34
3.7.2 LinReg-Werte	35
3.7.3 PCR-Effizienz	36
3.7.4 Housekeeping-Gen	37
3.8 Testen auf T3R durch Western Blotten	39
3.9 Zelleexperimente mit Kardiomyocyten und -fibroblasten	39
3.9.1 Isolierung von Kardiomyocyten	39
3.9.2 Isolierung, Kultivierung und Behandlung von Kardiofibroblasten	40
3.10 Primer und Antikörper	41
3.10.1 Primer	41
3.10.2 Antikörper	42
3.11 Lösungen – Puffer – Reagenzien - Geräte	42
4. Resultate	47
4.1 Wahl des Analyseprogramms	47
4.2 Verwendung des Kalibrators	49
4.3 Optimale Verdünnungsstufe	49
4.4 Housekeeping-Gen	51
4.5 Quantifizierung der T3R am Herzen	52
4.6 Quantifizierung der T3R im Vergleich von Herz und Leber	54
4.7 Zelleexperimente zur Messung von T3R an Kardiomyocyten und -fibroblasten	55
4.8 Proteinanalyse der T3R	57
4.9 Quantifizierung der Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT10	59
4.10 Quantifizierung der Schilddrüsenhormonrezeptoren des Reizleitungssystems des Herzen	61

	Seite
5. Diskussion	62
5.1 Fazit zum Ablauf der quantitativen rt-PCR	62
5.2 Fazit zu den Ergebnissen der T3R-Daten	63
5.2.1 Fazit der Untersuchungen der T3R auf mRNA-Ebene	63
5.2.1.1 Fazit: T3R α2	63
5.2.1.2 Fazit: T3R α1	69
5.2.1.3 Fazit: T3R β1	70
5.2.2 Fazit der Untersuchungen der T3R auf Protein-Ebene	71
5.2.2.1 Fazit: T3R α2	71
5.2.2.2 Fazit: T3R α1	73
5.2.2.3 Fazit: T3R β1	73
5.3 Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT10	74
5.4 Klinischer Ausblick	76
6. Zusammenfassung	77
7. Literaturverzeichnis	79
8. Danksagung	82
9. Lebenslauf	83
10. Erklärung	84

1. Einleitung

1.1 Schilddrüsenhormone – Aufbau und Funktion

1.1.1 Bedeutung

Die Schilddrüsenhormone (SDH) haben eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung und die Funktionen des Körpers. Sie spielen während der körperlichen Entwicklung eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung, unter anderem im Gehirn des Neugeborenen und des Säuglings. Diese Differenzierung wird dabei zum Teil durch Stimulierung der Synthese von Wachstumshormon in der Hypophyse gefördert. SDH wirken über eine Regulierung der ATP-Produktion insbesondere auf die Mitochondrien und, damit verbunden, auf den Sauerstoffverbrauch sowie die Thermoregulation. Diese Funktionen werden möglicherweise über die Expression der zellmembranständigen Na^+/K^+ - oder Ca^{2+} -ATPase reguliert [12]. Schließlich stimulieren sie auch den Stoffwechsel über Erhöhung der Gluconeogenese, der Glycolyse und der Fettsäureoxidation. Erst jüngst konnten die Stoffwechselwege im Detail aufgeklärt werden, wobei neben Glukose und Fettsäuren auch Laktat eine besondere Rolle als Substrat zur Energiegewinnung spielt [23]. Dieses gilt insbesondere für den Stoffwechsel am Herzen.

Auf kardiovaskulärer Ebene sind die Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes, die Erhöhung des Blutvolumens und inotrope und chronotrope Wirkungen die bedeutsamsten Effekte. Sie führen in ihrer Gesamtheit zu einem erhöhten Auswurf des Herzens. Diese Effekte entstehen unter anderem durch die Regulation verschiedener herzspezifischer Proteine.

1.1.2 Regulierung

Die Ausschüttung der SDH wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse reguliert. Das vom Hypothalamus ausgeschüttete TRH führt zu einer Sekretion von TSH aus der Hypophyse, was wiederum eine Freisetzung der SDH aus der Schilddrüse nach sich zieht. Der Hypothalamus hat außerdem die Fähigkeit durch Freisetzung von Somatostatin die Sekretion von TSH aus der Hypophyse zu hemmen.

Die freigesetzten SDH in Form von T₄ und T₃ hemmen ihrerseits die Freisetzung von TRH und TSH aus Hypothalamus und Hypophyse und verhindert dadurch einen zu starken Anstieg des Spiegels der SDH im Blut (Abbildung 1). Dieser Regulationsmechanismus gewährleistet im Regelfall eine angemessene Sekretion dieser wichtigen Hormone.

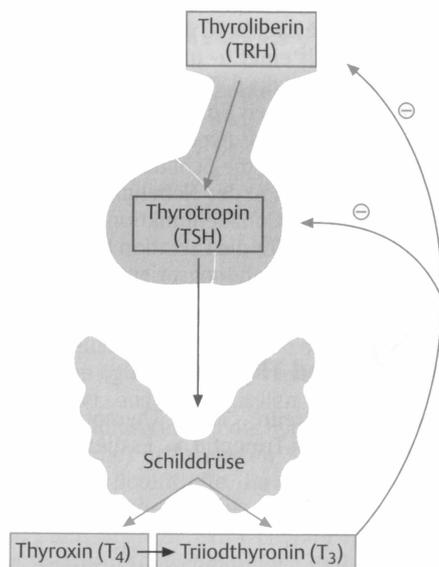
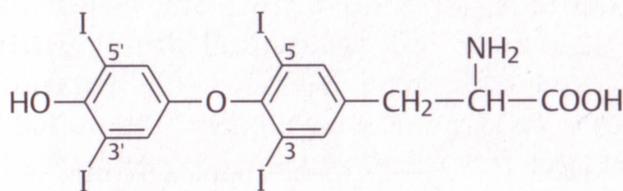


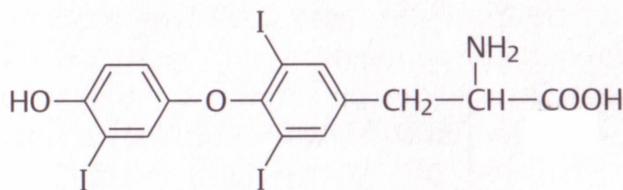
Abb.1 Hypothalamus–Hypophysen–Schilddrüsen–Achse (aus Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2003).

1.1.3 Synthese

Die SDH werden in der Schilddrüse aus Thyreoglobulin und Jodid hergestellt. Hierbei wird aus dem Blut Jodid über den Natrium-Jodid-Transporter aufgenommen, von der membranständigen Thyreoperoxidase in Iodonium-Ionen (I^+) oxidiert und in die Tyrosylreste des Thyreoglobulins eingebaut. Die wichtigsten dabei entstehenden biologisch aktiven Substanzen sind das Thyroxin (T4) und das Trijodthyronin (T3) (Abbildung 2).



Thyroxin (T4)



Trijodthyronin (T3)

Abb.2 Strukturformel der beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin (nach Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2003).

1915 gelang es Kendall mit seinem Forscherteam erstmals aus Schilddrüsenextrakten T4 zu kristallisieren. Obwohl kristallisiertes T4 die gleichen physiologischen Effekte wie die entsprechenden Rohextrakte der Schilddrüse hervorruft, konnte nicht die gesamte biologische Aktivität des Rohextraktes dem T4 zugeschrieben werden. Erst mit der Identifizierung des T3 konnte diese Unstimmigkeit geklärt werden. T3 induziert zwar qualitativ die gleichen biologischen Antworten wie T4, besitzt aber eine 10-fach höhere

biologische Aktivität als T4. Die Schilddrüse setzt vor allem T4 frei. Nur in sehr geringem Maße wird dort T3, Mono- und Dijodthyronin ausgeschüttet. T4 wird peripher neben lokaler Umwandlung, vor allem in der Leber, aber auch in den Nieren, mittels Typ I- oder Typ II-Jodthyronin-5'-Deiodinasen in aktives T3 umgewandelt. Dieses außerhalb der Schilddrüse umgewandelte T3 stellt 80% des frei zirkulierenden Plasma-T3 dar. Die Leber, wie auch die Nieren, haben somit eine bedeutende Stellung in der Wirkungsverstärkung und -regulierung von SDH. Diese Tatsache ist ursächlich für die Verwendung der Leber als Vergleichsorgan gegenüber dem Herzen.

1.1.4 Transport und zelluläre Aufnahme

T4 und T3 werden im Blut aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit an Trägerproteine wie das Thyroxin-bindende Globulin, das Präalbumin und das Albumin gebunden transportiert.

Die Aufnahme von SDH durch die Plasmamembran in die jeweilige Zielzelle erfolgt mittels passiver Diffusion [3] oder mittels energieabhängigen Transport-mechanismen über so genannte Schilddrüsenhormontransporter. Diese sind funktionell in zwei Gruppen eingeteilt: organische Anionentransporter und Aminosäuretransporter [1]. Die als Heterodimere vorliegende Gruppe der Aminosäuretransporter besteht jeweils aus einer schweren Kette und einer variablen leichten Kette, welche für die Unterscheidung zwischen dem LAT1 und dem LAT2 (L-Typ-Aminosäuretransporter) verantwortlich ist. Beide Formen sind zum Aminosäuretransport fähig, aber nur LAT1 ist zusätzlich dazu auch am Transport von Iodothyroninen beteiligt [6]. LAT1 wird allerdings nicht in der Leber exprimiert, obwohl die Leber den wichtigsten Umwandlungsort von T4 darstellt. Deshalb ging man von weiteren Transportproteinen für SDH aus.

Das Forscherteam um Samson [25] hatte früh gemutmaßt, dass möglicherweise ein Vertreter der T-Typ-Aminosäuretransporter (TAT) am Schilddrüsenhormontransport in die Zellen beteiligt sei. Unter anderen wurde vor einigen Jahren TAT1 (auch MCT10, SLC16A10) beschrieben, anfangs konnte allerdings nur der reine Aminosäuretransport für aromatische Aminosäuren wie Phe, Thyr und Tryp [14] nachgewiesen werden. Auf der Suche nach weiteren Kandidaten für den Schilddrüsenhormontransport zeigte der MCT8 (Monocarboxylat-Transporter 8, SLC16A2) in der Gruppe der MCT die größte Homologie (49%) zu dem MCT10. Dieser MCT8 wurde weitergehend getestet und stellte sich als sehr aktiver und spezifischer Transporter für Iodothyronine heraus [7]. Neue, jüngst publizierte Ergebnisse konnten zeigen, dass auch MCT10 einen bedeutenden Schilddrüsenhormontransporter darstellt und zwar insbesondere für T3, weniger für T4 [9]. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass der MCT8 wie auch der MCT10 nicht nur für den Einwärtstransport von SDH wichtig sind, sondern auch - mit OATP1C1 - die einzigen bisher bekannten, hochaffinen Auswärtstransporter für SDH darstellen [23]. Die klinische Bedeutung von MCT10 als Schilddrüsenhormontransporter ist bis heute unbekannt, es zeigte sich aber für den MCT8 in klinischen Studien, dass eine Mutation im MCT8-Gen in einer intrauterinen Hypothyreose endet [8]. Dieses führt insbesondere zu Veränderungen im Gehirn und dadurch zu schweren psychomotorischen Retardierungen.

1.1.5 Signalvermittlung durch T3R

Im Gegensatz zur Familie der Peptidhormone, die an membranständigen Rezeptoren binden, lagern sich die Steroid- und Schilddrüsenhormone an nukleären Rezeptoren an (Abbildung 4). T3 gelangt hierbei über das Cytosol in den Zellkern, wo es sich an T3-Hormonrezeptoren (T3R) anlagert. Deren Existenz wurde bereits in den 60er Jahren dieses Jahrhunderts postuliert. Tata und Windell und ihr Forscherteam beobachteten 1966 eine

veränderte RNA-Syntheserate nach Gabe von SDH [29]. Die hochraffinierten nukleären T3R konnten allerdings erst Jahre später biochemisch charakterisiert werden [26].

Es gibt mehrere Subtypen der T3R, wobei die Isoformen T3R α 1, T3R α 2 und T3R β 1 in Menge und Funktion am bedeutsamsten sind. Über insgesamt sieben T3R-Isoformen wird in Wirkung und Funktion spekuliert. Die α - und β - T3R entstehen dabei durch alternatives Spleißen aus den jeweiligen Vorstufen c-erbA α und c-erbA β (Abbildung 3).

Die Molekulargewichte der Isoformen T3R α 1, T3R α 2 und T3R β 1 der Ratte berechnen sich aufgrund ihrer cDNA-Sequenzen von 47 kDa, 55 kDa und 53 kDa [18]. Der einzige Unterschied zwischen dem T3R α 1 und dem T3R α 2 ist die Ligand-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (E/F) am C-Terminus (Abbildung 3). Die Unterschiede an dieser Stelle führen zur Unfähigkeit des T3R α 2, T3 zu binden. Die T3R β -Formen unterscheiden sich durch Modifikationen an der amino-terminalen Transaktivierungsdomäne (A/B).

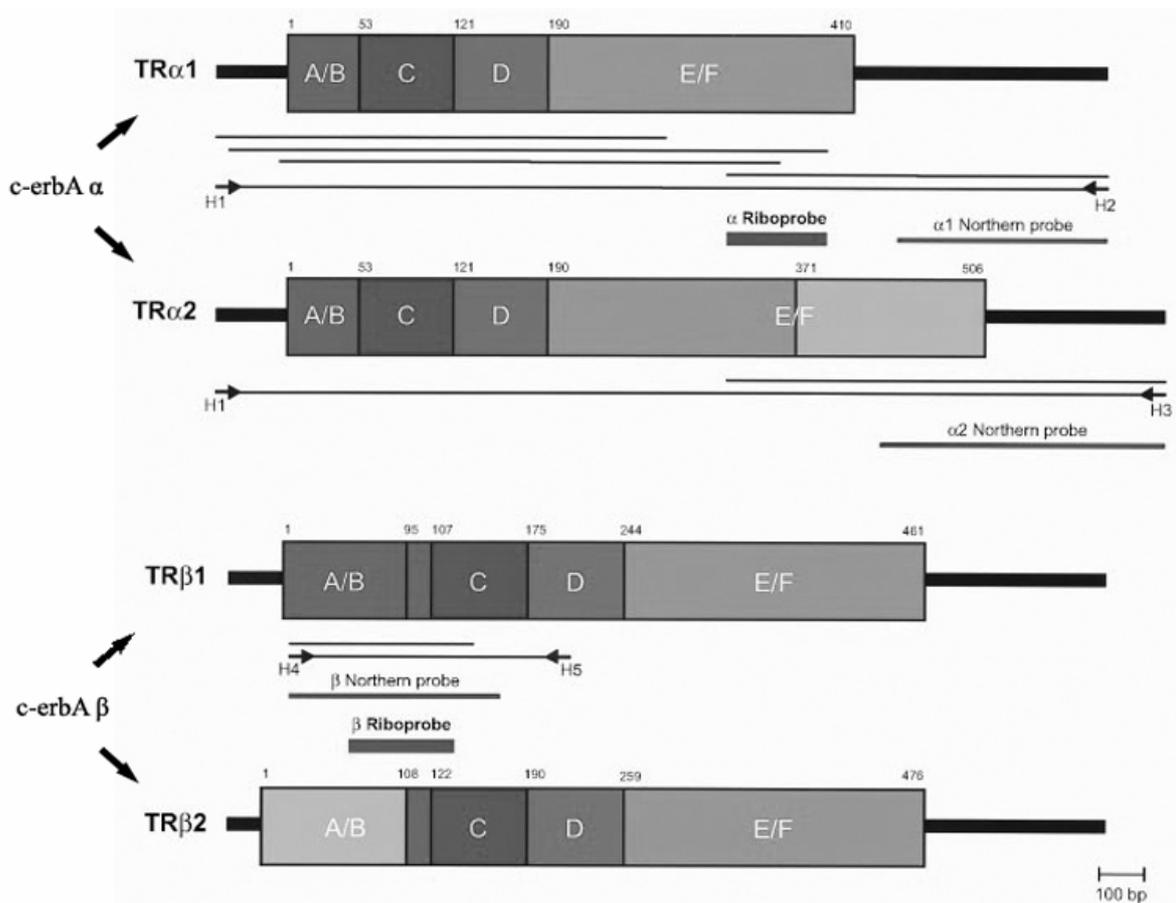


Abb.3 Aufbau der T3R α 1 und 2, sowie β 1 und 2; amino-terminale Transaktivierungsdomäne (A/B), DNA-Bindungsdomäne (C) und Ligand-Bindungsdomäne, bestehend aus Hinge-Region (D) und Carboxy-Ligand-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (E/F); T3R α und β werden aus den Vorformen c-erbA α und c-erbA β gespleißt; nach einer Abbildung aus [33].

Die T3R α 1 und β 1 wirken über ihre Bindung an spezifische TRE im Promotor T3-sensibler Gene. Diese Bindung führt zu einer Steigerung oder Senkung der Genexpression. Sie gehören damit zu der Familie der hormonempfindlichen Transkriptionsfaktoren. Der T3R α 2 kann, wie oben erwähnt, aufgrund seiner strukturellen Unterschiede in der Ligand-Bindungsdomäne T3 nicht binden. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass der T3R α 2 zwar mit den TRE auf der DNA reagiert, dabei aber nur die Bindungsstelle blockiert **ohne** eine Reaktion auszulösen. Hierdurch wirkt er als kompetitiver Hemmer dominant negativ [30]. In der DNA-Bindungsdomäne der T3R chelieren die dort vorhandenen Cysteinreste

mit zwei Zinkatomen und bilden dadurch zwei „Zinkfinger“, welche durch Bindung an der DNA die Transkription beeinflussen [34]. Die TR wirken dabei über Mono- und Dimerbildung (Abbildung 4).

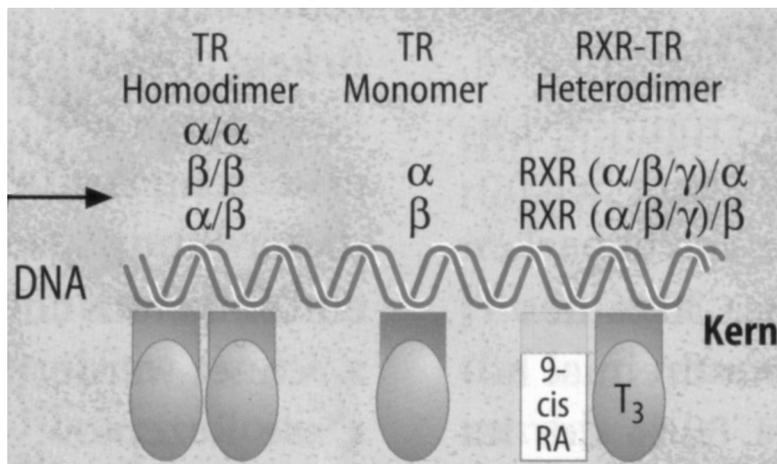


Abb.4 Intrazelluläre Wirkung der Schilddrüsenhormone; TR=Schilddrüsenhormonrezeptor (nach Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2003).

Während der Embryonalentwicklung treten die verschiedenen T3R-Isoformen in bestimmter zeitlicher Abfolge auf: Zunächst wird die nicht-hormonbindende T3R $\alpha 2$ -Isoform exprimiert. Die T3R $\alpha 1$ -Isoform tritt während der Entwicklung als nächstes auf, aber noch vor der vollständigen Ausreifung der Schilddrüse. Die T3R $\beta 1$ -Expression geht mit dem Beginn der Schilddrüsenhormonproduktion einher [13].

1.1.6 Verteilung der T3R

Die Verteilung der T3R im Körper wurde von einer Reihe von Forschern untersucht. Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse, ergeben sich eine Reihe von Schwierigkeiten bei der Auswertung und dem Vergleich der Daten miteinander.

Die meisten Versuche wurden und werden an der Ratte durchgeführt, da diese einfach und billig zu halten ist und sich schnell reproduziert. Es zeigten sich allerdings bei

Untersuchungen der Aminosäuresequenz des T3R $\alpha 1$ deutliche Unterschiede zwischen Ratte und Mensch, wodurch ein Vergleich zwischen den beiden Spezies erschwert wird. Andere Tiere zeigen hierbei deutlich geringere Unterschiede zum Menschen (Abbildung 5). Die geringsten Unterschiede bestehen im Vergleich zwischen Mensch und Schwein. Daher wurde in dieser Arbeit ein Schweinmodell verwendet.

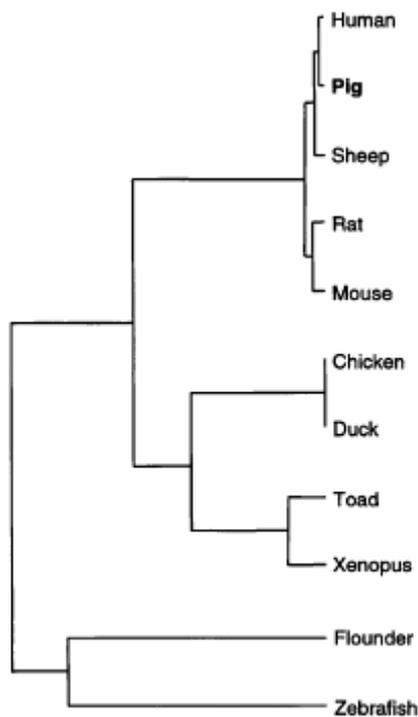


Abb.5 Phylogenetischer Baum für die bekannten Homologien des T3R $\alpha 1$ [33].

Auf Proteinebene lassen sich die bisher veröffentlichten Ergebnisse schlecht vergleichen, da außer für den T3R $\beta 1$ keine einheitlichen Antikörper erhältlich sind. Dazu kommt, dass der T3R $\alpha 2$ wegen seiner mangelnden T3-Bindungsfähigkeit früher oft als funktionell unwichtig verkannt wurde und deshalb oft nicht in die quantitativen Untersuchungen der T3R mit eingeflossen ist. Jüngst wurden neuere, deutlich sensitivere Messmethoden für die Messung von mRNA entwickelt, die die bisherigen Aussagen über mögliche Unterschiede

in den Mengenverhältnissen der mRNA erst bestätigen müssen. Eine dieser Meßmethoden ist die quantitative rt-PCR.

Man geht im adulten Organismus bei den Isoformen T3R α 1, α 2 und β 1 von einer ubiquitären Verteilung aus, wobei einzelne Isoformen in bestimmten Organen stärker oder weniger stark exprimiert werden. Der T3R β 2 wurde früher als gewebespezifisch für Hypophyse und Hypothalamus angesehen [18]. Untersuchungen von White und Dauncey und ihr Forscherteam [33] zeigten aber auch hier eine fast ubiquitäre Verteilung im Körper, wenn auch auf einem sehr niedrigen Niveau.

Neben den T3R im Nukleus wurden in neueren Untersuchungen auch verschiedene T3R in den Mitochondrien nachgewiesen. Dabei wurde eine normale und eine verkürzte Form des T3R α 1 und mehrere Isoformen des T3R α 2 gefunden. Ebenfalls neu ist der Nachweis einer ausgeprägten gegenseitigen Regulation der mitochondrialen und nukleären Transkription und Proteinsynthese [12, 23].

1.2 Schilddrüsenhormone und das Herz

1.2.1 Expression der T3R am Herzen

Die T3R α 1, α 2 und β 1 sind die am bedeutsamsten beschriebenen T3R am Herzen und werden dort in den höchsten Quantitäten exprimiert. Im weiteren Verlauf sollen nun kurz die bereits durchgeführten Experimente zur Quantifizierung dieser Rezeptoren beschrieben werden und auf die Vorteile beziehungsweise die damit verbundenen Probleme bei Durchführung und Auswertung dieser Versuche eingegangen werden.

Schwartz / Oppenheimer mit ihrer Forschungsgruppe [27], wie auch später die Forschungsgruppe um Haddad [10], entwickelten so genannte T3-Bindungsassays. Dabei wurde durch polyvalente Antiseren spezifisch für einzelne Peptidsequenzen in den

unterschiedlichen Rezeptoren die Bindung von T3 verhindert. Durch diese Methode konnten gezielt die SDH-bindenden Rezeptorstufen gemessen werden. Die Versuche wurden bisher nur an Ratten durchgeführt. Nur der Forschergruppe um Oppenheimer gelang es bisher ansatzweise selektiv einzelne Isoformen zu hemmen. Das größte Problem bei diesem Ansatz ist aber, dass er keine Möglichkeit bietet, ebenfalls den nicht-T3-bindenden Rezeptor $\alpha 2$ zu untersuchen.

	T3R $\alpha 1$	T3R $\beta 1$
Leber	80%	20%
Herz	45%	55%
Niere	43%	57%
Hirn	28%	72%

Tab.1 Verhältnis der Bindungsfähigkeit von T3R $\alpha 1$ und $\beta 1$ in verschiedenen Organen; gemessen wurde mittels T3-Bindungsassay; angezeigt wird dabei gezielt nur die zur Bindung von SDH befähigten Rezeptoren T3R $\alpha 1$ und $\beta 1$ und zwar durch Blockierung einzelner Peptidsequenzen durch polyvalente Antikörper [27].

Die Forschungsgruppe um Vennström [19] machte Versuche mit T3R-Knock-Out-Mäusen. Sie untersuchte dabei drei verschiedene Mäusegruppen, bei denen sie die Expression von einer oder mehreren Rezeptorisoformen eliminiert hatten. Die gewonnenen Proben wurden mittels Northern Blot und elektrophoretischer Separierung aufgetrennt und dann mit dem Phospho-Imager und der Densitometrie gemessen. Vennström nahm an, dass dabei T3R $\alpha 1$ die zentrale Rolle in der Regulation der herzspezifischen Proteine, insbesondere bei der Repression des herzspezifischen β -MyHC-Proteins, darstellt. Die Rezeptoren T3R $\beta 1$ und $\beta 2$ wirkten nach seiner Annahme ähnlich, aber weniger stark. In Herzventrikeln von Nagetieren wird fast ausschließlich α -MyHC exprimiert, im menschlichen Herz aber vor allem β -MyHC [34]. Durch diesen Unterschied in den Expressionsmustern der

Herzproteine kann man zu der Schlussfolgerung kommen, dass sich die Ergebnisse dieser Knock-Out-Mäuseversuche nicht wirklich auf den Menschen übertragen lassen.

Das Laborteam um White und Dauncey [32, 33] verwendete in seinen mRNA-Messungen die damals sensitivsten Messmethoden, den mRNA-Protection-Assay und den Northern Blot. Die darauf angefärbten mRNA-Mengen wurden mittels Densitometrie quantitativ bestimmt. Dies war damals die einzige Möglichkeit einer annähernd quantitativen Messung. Als Versuchstier wurde das Schwein verwendet. White und Dauncey verglichen dabei das Herz mit der Leber und anderen Muskeltypen. In ihren Ergebnissen zeigte sich, dass die T3R α 2-mRNA im Herzen deutlich mehr exprimiert wird als die T3R α 1-mRNA und zwar im Gegensatz zu anderen Muskeltypen, Leber und Hirn. Außerdem wurde T3R α 2 im Herzen verglichen mit den anderen Organen relativ am meisten exprimiert. Postnatal zeigte sich das Verhältnis $T3R\alpha 2/ T3R\alpha 1 > 2$ im Herzen konstant. Der T3R β 1 zeigte sich verglichen mit der Leber und anderen Muskeln postnatal ebenfalls vorherrschend im Herzen, wobei aber der T3R β 1 im Herzen deutlich niedriger exprimiert war als die T3R α 1 und α 2. Auf diese Ergebnisse soll im weiteren Verlauf noch eingegangen werden.

Das Forschungsteam um Timmer und Bakker [30] arbeitete in ihren Experimenten an kultivierten Leberzellen, die mit Seren von hypo- und hyperthyreoten Menschen behandelt wurden. Sie konnten zeigen, dass T3 in diesen Zellen dazu führt, dass sich das Verhältnis $T3R\alpha 1/ T3R\alpha 2$ verändert. Untersucht wurde die mRNA mittels quantitativer rt-PCR (real-time-PCR). Diese Methode ist aktuell eine der bedeutendsten Messmethoden für mRNA und ist deutlich sensitiver als der bisher fast ausschließlich angewandte Ansatz der mRNA-Quantifizierung über Densitometrie. Die rt-PCR wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Die teilweise gegensätzlichen, ebenfalls mit der rt-PCR-Methode gewonnenen Ergebnisse von Kinugawa [16] und d'Amati [4] und ihre Forschungsteams zeigen aber, dass gerade bei sehr sensitiven Methoden die Ergebnisse im besonderen Maße kontrolliert werden müssen, da schon kleine Fehler große Auswirkungen haben können. Bakker und sein Forschungsteam konnten in ihren Rattenversuchen zeigen, dass schon ein Unterschied von Faktor 2 auf mRNA- oder Proteinebene biologisch für die Wirksamkeit entscheidend sein kann. Abweichungen, die auf Messungenauigkeiten beruhen und über diesen Faktor 2 hinausgehen, müssen deshalb um jeden Preis verhindert werden, wenn man die Ergebnisse später für realistische Theorien über die klinische Bedeutung verwenden will.

Die Quantifizierungen der Proteine wurden in den Versuchen von Bakker mit Hilfe von selbst entwickelten Antikörpern im Western Blot vorgenommen. Die Antikörper stellten in ihrer Spezifität gegenüber den T3R wie auch in ihrer Verfügbarkeit in früheren Untersuchungen immer das Problem einer reproduzierbaren Quantifizierung dar.

Die existierenden Antikörper sind:

- **kommerziell erhältliche Antikörper:**

- ABR (Affinity Bioreagents, MA1-125): für **T3R spezifisch, aber: Kreuzreaktionen zwischen T3R α 1 und β 1 sind beschrieben** [15].
Deshalb wurden diese Antikörper in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.
- Santa Cruz Biotechnology (J52/SC-738): **für T3R β 1** spezifischer AK [16].

- **sonstige Antikörper:**

- Antikörper für **T3R α 1** und für **T3R α 2**, entwickelt von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Bakker [35].

1.2.2 Physiologie und Pathologie der Schilddrüsenhormone am Herzen

Die SDH sind wichtig für die Entwicklung wie auch die Funktion verschiedener Organe. Pränatal induzieren sie Skelettmuskelmeyoblasten dazu, den Teilungszyklus zu verlassen, sich zu differenzieren und den muskelspezifischen Phänotyp zu exprimieren [21].

Die SDH regulieren außerdem die Expression einer Reihe wichtiger Proteine. Zu nennen sind hier vor allem einige für das Herz bedeutsame Proteine: die α - und β -myosin heavy chain (MyHC), die sarcoplasmic reticulum calcium-activating ATPase (SERCA), das Phospholamban, die α - und β adrenerge Rezeptoren, die Adenylatcyclase, die Proteinkinase C und eine Reihe von Ionenkanälen. Die SDH haben dadurch Einfluss auf Herzfrequenz, Kontraktilität und Muskelmasse. Betrachtet man im Speziellen die α - und β -MyHC, sowie die SERCA, so werden diese insbesondere in zwei gegensätzlichen Proteinmustern exprimiert (Abbildung 6) [16, 28].

Das erste Expressionsmuster zeigt sich bei der sogenannten „physiologischen“ Hypertrophie, experimentell hervorgerufen durch körperliche Belastung oder durch Behandlung mit SDH. Das β -MyHC ist hierbei nach unten reguliert, α -MyHC und die SERCA nach oben. Gleiches wird auch in Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Vennström beschrieben [19]. Das zweite Expressionsmuster zeigt sich bei der sogenannten „pathologischen“ Hypertrophie, experimentell hervorgerufen durch Überdruckbelastung des linken Ventrikels oder durch Phenylephrine in Kultur. Die drei beschriebenen Proteine weisen unter diesen Bedingungen eine zum ersten Expressionsmuster exakt gegensätzliche Ausprägung auf, welche sich so auch beim Herzversagen zeigt. Eine andere Studie bestätigt diese Ergebnisse, indem sie einen Anstieg von α -MyHC auf mRNA- und Proteinebene als Reaktion auf einen Anstieg von T3 im Blut beschreibt [10]. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem, dass eine Überexpression von T3R α 1 zu einer erhöhten Expression von α -MyHC, eine Überexpression von T3R β 1 aber zu einer

Repression von β -MyHC führt [16]. Die verschiedenen charakteristischen Expressionsmuster der T3R bei „physiologischer“ und „pathologischer“ Hypertrophie, sowie Herzversagen (Abbildung 6) sollen im Diskussionsteil in ihren Bedeutungen näher besprochen werden.

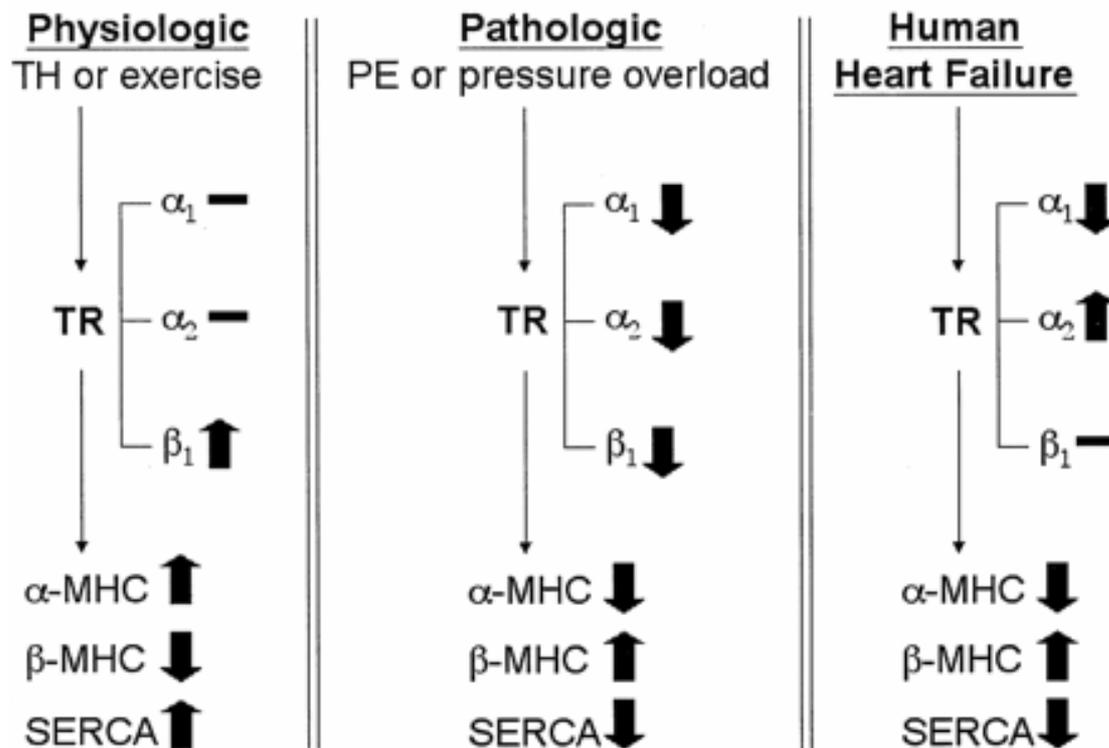


Abb.6 Effekte durch Hypertrophie (physiologisch oder pathologisch) verglichen mit den Effekten durch Herzversagen (heart failure); „physiologische“ Hypertrophie wurde hierbei hervorgerufen durch Schilddrüsenhormonbehandlung (TH) oder körperlicher Arbeit (exercise), „pathologische“ Hypertrophie wurde hervorgerufen durch Überdruckbelastung des linken Ventrikels (pressure overload) oder durch Phenylephrine (PE) in Kultur; Expressionsmuster der T3R α_1 , α_2 und β_1 auf mRNA-Ebene (mittlere Reihe) und Expressionsmuster bedeutender SDH-responsiver Herzproteine (untere Reihe) zeigen charakteristische Anstiege (Pfeil nach oben), Abfälle (Pfeil nach unten) oder keine Veränderungen (Strich) [28].

Für eine quantitative Fehlfunktion der Schilddrüse gibt es eine Reihe von stoffwechselbedingten, autoimmunen, neoplastischen und angeborenen Ursachen.

Bei Hypothyreosen, vor allem bei der Extremform der Athyreose, können bei der Substitutionstherapie Probleme auftreten. Das Herz zeigt sich im Vergleich zum restlichen Körper empfindlicher für T₃, dieses kann bei einer Übertherapie mit Vorhofflimmern und Tachykardie reagieren. Der Rest des Körpers zeigt sich im Vergleich hierzu unempfindlicher und kann auf Unterversorgung mit Müdigkeit, Schwäche, Gewichtszunahme, Konzentrationsschwierigkeiten und im schlimmsten Fall mit einem Myxödem reagieren. Es wird deshalb empfohlen, sich langsam an die richtige Dosis heranzutasten. Meist kommt es aber trotzdem zu einer Überdosierung auf Seiten des Herzens und eine gewisse Unterdosierung auf Seiten des restlichen Körpers. Ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von SDH könnte zu einer spezifischeren Therapie führen und die Behandlung optimieren.

1.3 Schilddrüsenhormone und die Leber

Um eine noch breiter gefächerte Aussage über die Expression von T₃R zu erhalten, wurde in dieser Doktorarbeit ebenfalls die Leber untersucht. Neben dem Herzen stellt auch die Leber ein bedeutendes Target für SDH dar. Die Leber ist das bedeutendste Thyroxin-umwandelnde Organ. Es schien deshalb interessant, ihr T₃R Expressionsmuster zu untersuchen und dieses mit dem Muster im Herzen zu vergleichen um ein besseres Verständnis über die Wirkung von SDH zu erhalten. Die Leber wurde neben gestreiften und glatten Muskelfasern bereits häufig in anderen T₃R-Studien als Vergleichsorgan verwendet.

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Fragen, die sich stellten und die in dieser Doktorarbeit untersucht wurden, ergaben sich aus der Sichtung der Literatur zu diesem Thema. Diese sind:

- Lassen sich mit der rt-PCR Methode, einer sehr sensitiven Methode der mRNA-Messung, neue Erkenntnisse über die Wirkung von T3 am Herzen gewinnen? Lassen sich bereits von anderen Forschungsgruppen mittels anderer Untersuchungsmethoden gewonnene Ergebnisse bestätigen? Ergeben die parallel durchgeführten Untersuchungen an den Herzproteinen Ergebnisse, die denen der Untersuchungen an der mRNA entsprechen?
- Welche Schlussfolgerungen ergeben sich aus der Menge an T3R in verschiedenen kardialen Gewebetypen, deren Lokalisationen in verschiedenen Bereichen des Herzen und dem Verhältnis deren Expression im Herzen im Vergleich zum Organ Leber? Wie lässt sich dieses mit der Funktion der Typen oder Bereiche vereinbaren?
- Wie sind der neu entdeckte MCT8 ebenso wie der MCT10, als in beiden Fällen bedeutsame SDH-Transporter, in Herz und Leber verteilt? Welche Aussage über ihre individuelle Bedeutung lässt sich dadurch treffen?
- Lassen sich mit dem Modell am Schwein, das genetisch deutlich näher am Menschen steht, die bisher meistens am Rattenmodell durchgeführten Experimente bestätigen oder sind die in früheren Experimenten gewonnen Ergebnisse in Frage zu stellen?

3. Material und Methoden

3.1 Probengewinnung

3.1.1 Schlachthof

Die adulten Schweineherzproben wurden in einem Schlachthof, eine halbe Stunde vom Labor entfernt, gewonnen. Die Herzen wurden maximal 2-3 Minuten nach dem Tod aus dem Schwein herausgeschnitten, um dem Infarktstadium des Herzens möglichst zuvorzukommen. Danach wurden sie schnellst möglich mit Sauerstoff und Heparin (Liquemin®N 25.000, Hoffmann-La-Roche) angereichertem, kardioplegem Tyrode-Puffer bei 4°C perfundiert. Der Zugang war hierbei die noch überstehende Aorta und die davon abgehenden Herzkranzgefäße. Danach wurden die Herzen in Celsior-Lösung (4°C) auf Eis gelegt, um den Stoffwechsel auf ein Minimum zu reduzieren.

Die Schweine waren durch den standardisierten Schlachtbetrieb alle männlich, vom Typ deutsche Landrasse, 6-8 Monate alt, 70-100 kg schwer. Durch einen Veterinärmediziner wurden innere und äußere Krankheiten ausgeschlossen.

3.1.2 Präparation

Die betreffenden Proben wurden immer möglichst in der Mitte des betreffenden Herzkompartmentes entnommen und in Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden sie in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser pulverisiert und weiter unter flüssigem Stickstoff verwahrt.

3.1.3 Präparation des Reizleitungssystems des Herzens

Diese spezielle Form der Präparation wurde ermöglicht durch die freundliche Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Davidoff, Professor für Anatomie im Universitätsklinikum

Hamburg-Eppendorf. Mit seiner Hilfe konnten die einzelnen Stufen des Reizleitungssystems des Herzens lokalisiert und präpariert werden.

Lokalisation der einzelnen Abschnitte:

- **Sinus-Knoten**: vom rechten Herzohr zwischen rechtem Atrium und Aorta, dem so genannten Sulcus terminalis, ausgehend:
 - Lokalisierung der A. coronaria dextra und dem sich anschließenden R. sinuatrialis;
 - an der Verankerung des Ramus im Atrium, durch den Widerstand zu spüren, ist der Sinus-Knoten lokalisiert;(der Sinus-Knoten ist außerdem gelegentlich von außen durch seine helle, wolken- oder sternförmige Struktur zu erkennen).
- **AV-Knoten**: nach dem Aufschneiden des rechten Ventrikels an der Vorderseite entlang des Septums befindet sich der AV-Knoten als helle Fläche im Dreieck durch die nachfolgenden drei Strukturen begrenzt:
 - a. V. cava inferior;
 - b. Sinus coronarius (als Sonderform sind Struktur a. und b. miteinander verwachsen und bilden eine große Öffnung);
 - c. der hintere Flügel der Trikuspidalklappe Richtung Herzinneres.
- **His-Bündel**: unmittelbar unterhalb des AV-Knotens, aber schlecht abgrenzbar.
- **Tawara-Schenkel**: direkt unter der Aortenöffnung im linken Ventrikel befindliche weiß-gelbliche, sich aufteilende, „den Muskel betretende“ Stränge, am linken Ventrikel deutlicher.
- **Purkinje-Fasern**: zu weitläufig, nicht präparierbar.

- **Negativkontrolle:** die Negativkontrolle wurde an einer festgelegten Stelle klar außerhalb des Reizleitungssystems entnommen, die Schichtzusammensetzung entsprach aber der der Entnahmestellen aus dem Reizleitungssystems.

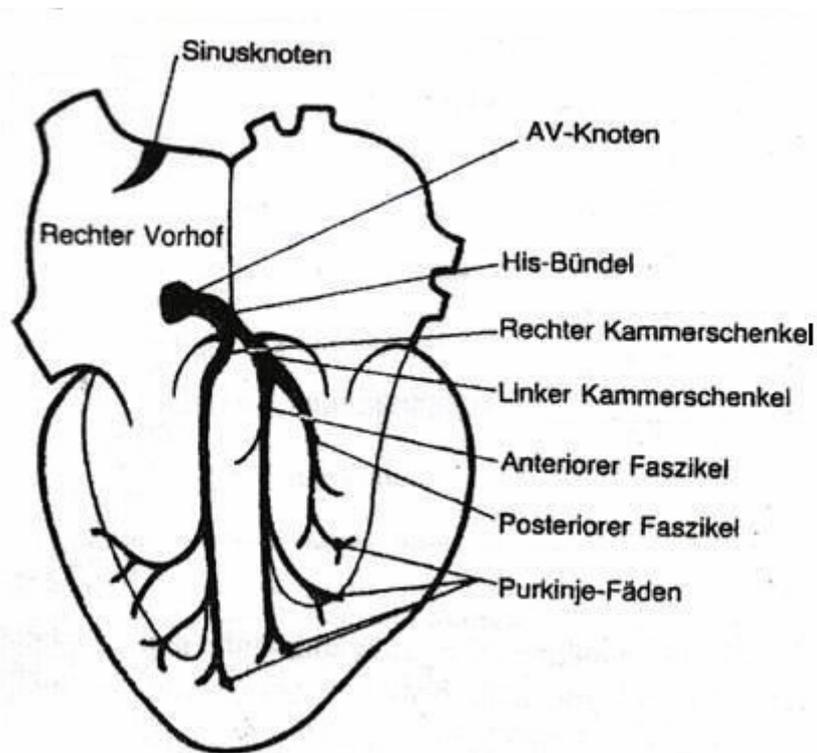


Abb.7 Aufbau des Reizleitungssystems am Herzen.

3.2 RNA-Extraktion/ Quantifizierung

Zur Gewinnung der RNA aus dem Gewebepulver wurde das TriZol® (Invitrogen)-Reagenz verwendet.

Durchführung (auf Eis) nach Angaben des Herstellers:

- 100 mg Gewebepulver in 2 ml TriZol® auflösen;
- Gemisch 2x20 Sekunden im Ultra-Turrax®, einem „Mikropürierstab“, zerkleinern;
- durch 15 faches Verwenden einer Spritze mit gauge 9 µm Nadelspitze (einsaugen und ausspritzen) den Zerkleinerungsprozess fortsetzen;

- mit 400 µl Chloroform 15 Sekunden aufschütteln;
- 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren;
- abzentrifugieren (12000g, 15 Minuten, 4°C);
- den Überstand mit 1 ml Isopropylalkohol vermischen;
- 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren;
- abzentrifugieren (12000g, 15 Minuten, 4°C);
- die RNA setzt sich als Pellet am Grund ab;
- Pellet mit 75% Ethanol waschen;
- abzentrifugieren (7500g, 5 Minuten, 4°C);
- Pellet circa 5 Minuten lufttrocknen;
- in DEPC-Wasser auflösen.

Die Messung der Gesamt-RNA wurde mit dem „Eppendorf Photometer“ durchgeführt. Es wurde in einem Verhältnis von 1:99 verdünnt und bei 260 nm gemessen. Es konnten für jede Probe zwischen 10-60 µg RNA je nach Gewebe isoliert werden.

3.3 RNA-Gelelektrophorese

Um RNA-Degradation oder Kontamination auszuschließen, wurde eine RNA-Gelelektrophorese als Qualitätskontrolle durchgeführt. Das RNA-Elektrophorese-Gel (siehe „Lösungen“) wurde in den Schlitten eingebracht und die Kammern mit jeweils 21 µl Probengemisch bestückt. Das Gel wurde 60 Minuten unter 100V Spannung gestellt und anschließend unter UV-Licht mit Hilfe von Ethidiumbromid dokumentiert.

Bei guter RNA-Qualität waren zwei Banden zu sehen, die 28s-Bande und die 18s-Bande der rRNA, wobei die 28s-Bande doppelt so hell erschien. mRNA und tRNA verstecken sich hinter der rRNA, weil sie eine deutlich geringere Menge aufweisen.

3.4 mRNA-cDNA Umschreibung

Durchführung:

- 1 µg gelöste RNA je nach bestimmter Konzentration der Lösung mit H₂O auf insgesamt 17µl auffüllen;
- 1 µl dN6- und 1 µl dT-Primer dazugeben;
- inkubieren für 10 Minuten bei 70°C;
- abkühlen auf Eis, wodurch ein vorzeitiger Beginn der Reaktion verhindert wird;
- 5x first strand buffer, 0,1 M DTT, reverse Transkriptase aus einem Kit von Invitrogen und einen dNTP-Mix aller vier Nukleinsäuren zugeben;
- unter Inkubation (42°C) in 60 Minuten umschreiben.

3.5 LC-Reaktionsaufbau

3.5.1 Theorie der Probenzusammenstellung

In dieser Studie wurden alle Gewebe als Block Primerpaar für Primerpaar durchgemessen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben beziehungsweise Kompartimenten innerhalb eines Primerpaars am ehesten vergleichbar bleiben und nicht durch äußere Einflüsse verändert werden. Durch chemische oder gerätetechnische Variationen bei fortlaufenden Messungen können leichte Schwankungen auftreten, die aber durch dieses Verfahren der Zusammenstellung minimiert werden. Außerdem sollten deshalb zur weiteren Optimierung des Messvorgangs, die Messungen direkt nacheinander durchgeführt werden.

Weiterhin wurden in den Experimenten als zusätzliche Kontrollmaßnahme Negativproben verwendet. Diese sind Kapillaren mit Reaktionsgemisch ohne die zu vervielfältigende cDNA.

3.5.2 Technischer Ablauf der rt-PCR

Die quantitative rt-PCR am Roche LightCycler besteht aus mehreren Phasen.

In der **ersten Phase** wird das Reaktionsgemisch initial auf 95°C erhitzt. Dabei zerfallen sämtliche Primer- oder DNA-Dimere und die Primer können sich an jeden DNA-Einzelstrang anlagern.

Anschließend wird in der **zweiten Phase** in mehreren Wiederholungen die PCR durchgeführt. Die drei sich wiederholenden Temperaturschritte sind im Prinzip die der klassischen PCR. Die Anlagerungs-(Annealing-)Temperaturen wurden allerdings leicht abgewandelt, um dem jeweiligen Temperaturoptimum der verwendeten Primer gerecht zu werden. Die verwendeten Temperaturen sind für das Annealing mehr oder weniger 57°C, für die Polymeration 72°C und für die Denaturierung 95°C.

In **Phase drei** wird das Reaktionsgemisch kontinuierlich auf 95°C erhitzt. Dabei wird durchgehend die Fluoreszenz gemessen. Diese ist abhängig von dem verwendeten SybrGreen, welches nur im am DNA-Doppel-Strang gebundenen Zustand fluoreszierend ist. Durch die Denaturierung der DNA-Doppelstränge in Folge der hohen Temperaturen kommt es zu einem kontinuierlichen Fluoreszenzabfall durch die fortlaufende Entkoppelung von SybrGreen von der DNA. Dieser Fluoreszenzabfall wird als sogenannte Schmelzkurve aufgezeichnet.

Anschließend folgt in **Phase vier** die Abkühlung auf Raumtemperatur.

3.5.3 Kalibrator

Ein Kalibrator wurde in jeden Messungsablauf integriert, um mögliche Unterschiede in den Reaktionsbedingungen zwischen den einzelnen LightCycler-Messungen aufzuzeigen. Die Crossing Points (siehe unten) waren dabei der Maßstab für jede einzelne Messung. Für die anschließende Normierung gab es zwei Ansätze. Eine Möglichkeit bestand darin, eine

Normierung jedes Wertes eines Laufes mit der Differenz zwischen dem laufspezifischen Kalibrator und dem Durchschnitt der Kalibratoren durchzuführen. Alternativ dazu wurde eine Normierung jedes Werte des jeweiligen Laufes mit dem laufspezifischen Kalibrator dividiert durch die Summe sämtlicher Kalibratoren versucht. Diese Normierung wurde durchgeführt um klarere Werte zu erhalten, die nicht durch untersuchungsmethodenabhängige Unregelmäßigkeiten beeinflusst waren. Der Kalibrator besteht aus der Vervielfältigung des GAPDH-Gens eines einzelnen Ventrikels, 1:100 verdünnt und in Heringssperma stabilisiert.

3.5.4 Duplikate und Verdünnungsreihen

In dieser Studie wurden außerdem Verdünnungsreihen verwendet. Sie haben gegenüber den sonst verwendeten Duplikaten einen entscheidenden Vorteil. Mit Duplikaten kann man beweisen, dass die Werte, die man erhalten hat, reproduzierbar und deshalb als glaubhaft einzustufen sind. Dies ist ebenso mit Verdünnungsreihen zu erreichen, da die Stufen sich auf einander beziehen und somit vergleichbar sind. Außerdem aber lässt sich mit Verdünnungen auch eine wesentlich höhere Reaktionseffizienz erreichen, da durch die Verdünnung die reaktionshemmenden Faktoren in der Lösung minimiert werden. Aufgrund der großen Anzahl der zu messenden Proben und aus Kostengründen konnte keine vollständige Wiederholung in Erwägung gezogen werden. Die große Anzahl der verschiedenen Herzen sollte aber eine ausreichende Validität der Ergebnisse garantieren.

Anzahl der LightCycler Kapillaren

Probenanzahl	Targetgene	Verdünnungen	Negativproben	Kalibratoren	Wiederholungen	Gesamt
27	x5	x3	36	19	38	498
6x Leber	T3R α 1	(unverdünnt)	für jeden neuen	für jeden	von durch	
9x linke Ventrikel	T3R α 2 T3R β 1	(1:10) (1:100)	Rezeptor im LightCycler	LightCycler Lauf	LC-Kriterien nicht verwertbare	
6x rechte Ventrikel	Gs α GAPDH		Lauf eine neue	einen Kalibrator	Proben	
6x Atrium			H ₂ O-Probe			

Tab.2 Vergleich der verschiedenen Herzkammern im Verhältnis zur Leber.

Probenanzahl	Targetgene	Verdünnungen	Negativproben	Kalibratoren	Wiederholungen	Gesamt
9	x5	x3	7	5	2	149
2x Sinusknoten	T3R α 1	(1:5)	für jeden neuen	für jeden	von durch	
2x AV-Knoten	T3R α 2	(1:10)	Rezeptor im	LightCycler	LC-Kriterien	
1x HIS-Bündel	T3R β 1	(1:20)	LightCycler	Lauf	nicht verwertbare	
2x Tawara-Schenkel	Gs α GAPDH		Lauf eine neue	einen Kalibrator	Proben	
2x Negativprobe			H ₂ O-Probe			

Tab.3 Vergleich der verschiedenen Bereiche des Reizleitungsystems des Herzens.

3.6 LC-Reaktionskontrolle

3.6.1 Quantifizierungskurve

Hier ist im Besonderen der Crossing Point zu nennen, der in Phase drei, also in der PCR-Phase, entsteht. Es ist der Punkt, an dem die Fluoreszenz, als Maß für die vorhandenen Kopien, eindeutig messbar ist, da die Fluoreszenz erstmals oberhalb dem „Hintergrundsrauschen“ liegt. Durch eine Leerwertmessung wird dieses „Hintergrundsrauschen“ definiert. Dadurch können Schwankungen zum Beispiel durch Wasser- oder Primerdimer relativiert werden. Auf dem Bildschirm zeigt sich die Quantifizierungskurve flach bis zum logarithmischen Anstieg am Crossing-Point. Der Crossing Point wird in der Anzahl der bis dahin abgelaufenen LightCycler-rt-PCR-Durchgänge angegeben.

3.6.2 Schmelzkurve

In der Schmelzkurve zeigt sich unter ansteigenden Temperaturen bei wie viel Grad Celsius wie viele der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge zerfallen und dabei den gespeicherten SybrGreen-Farbstoff freisetzen. Die Position der Kurve, das heißt der Beginn und das Maximum des Zerfallsprozesses, auch Schmelzpunkt genannt, sagt etwas über die Größe des DNA-Strangs aus. Mehr Produkt, in diesem Fall DNA-Doppelstränge, führt zu einer stärkeren Bindung von CybrGreen und dadurch zu einer stärkeren Fluoreszenz in der Lösung. Zerfall von Produkt führt zu Fluoreszenzabfall durch vermehrte CybrGreenfreisetzung. Je höher also die Kurve ist, die in ihrer vertikalen Ausprägung etwas über den Fluoreszenzabfall aussagt, desto mehr Produkt ist vorhanden.

Besonders zu beachten ist außerdem die H₂O-Kontrolle. Hat sie einen Schmelzpunkt und liegt er an derselben Stelle, wie die der zu vervielfältigenden DNA so muss der Messungslauf verworfen werden, da davon ausgegangen werden muss, dass ein Kontamination der H₂O-Kontrolle und damit möglicherweise der gesamten Messung vorliegt. Messungsläufe wurden außerdem verworfen, wenn Primerdimere in inakzeptabler Menge auftraten. Dies ist der Fall, wenn die vertikale Ausprägung der Schmelzkurven der Primerdimere mehr als die Hälfte der vertikalen Ausprägung der Schmelzkurven der zu vervielfältigenden DNA ausmacht.

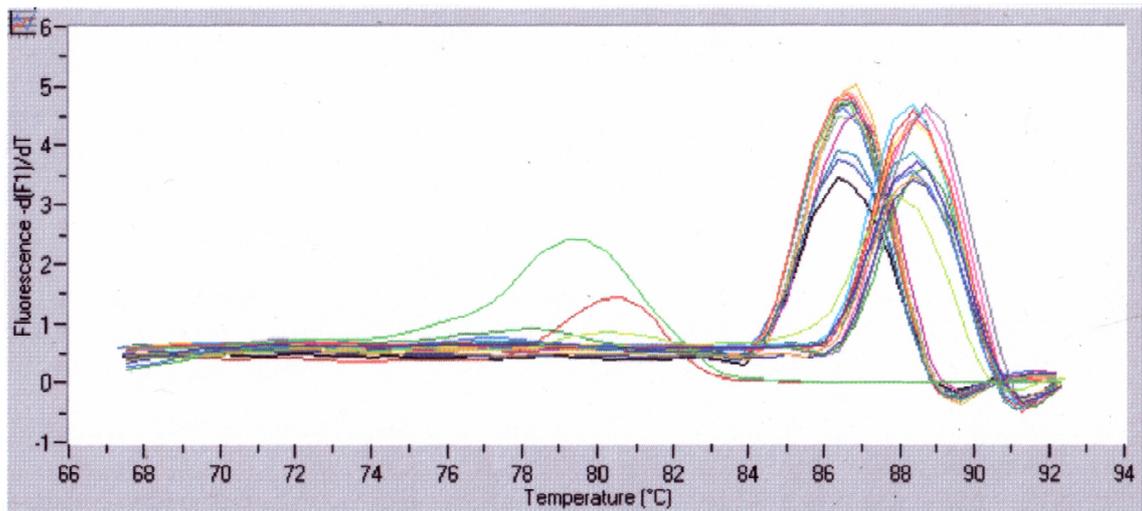


Abb.8 Schmelzkurve einer Messung mit Proben von Herz und Leber; mRNA, jeweils zur Hälfte von T3R $\alpha 2$ und $\beta 1$, wurde mittels quantitativer rt-PCR (LightCycler) gemessen; die beiden gewünschten Hauptpeaks für die T3R $\alpha 2$ und $\beta 1$ sind bei 84-92°C bei den unterschiedlichen Temperaturmaxima der Primer zu sehen, zwei kleine Peaks bei 74-82°C mit fehlenden Peaks bei 84-92°C stehen für die beiden negativen Wasserproben.

3.7 LC-Datengewinnung und -berechnung

3.7.1 Ct-Werte (crossing points) und delta-delta Methode

Der Crossing Point ist der Punkt ab dem es zu einem messbaren Fluoreszenzanstieg kommt. Er wird in der Anzahl der bereits abgelaufenen LightCycler-PCR-Durchgänge angegeben, ist aus der Kurve zu entnehmen und wird beim Sichern der Daten als Textdatei abgespeichert.

Danach kann die weitere Analyse mittels der **delta-delta Methode** durchgeführt werden.

Im **1.Schritt** wird hierbei der entsprechende T3R auf das Housekeeping-Gen normiert.

Dabei wird der Ct-Wert des Housekeeping-Gens von dem des Rezeptors abgezogen.

Im **2.Schritt** wird auf einen der Rezeptoren normiert. Dieser wird mit dem festen Wert 1 definiert. Davon abgezogen wird jeweils das Ergebnis aus dem 1.Schritt für diesen

Rezeptor von den Ergebnissen der anderen Rezeptoren. Dadurch sind nun alle Rezeptoren gegeneinander relativ angegeben.

Im **3.Schritt** werden die Ergebnisse aus dem 2.Schritt potenziert (2^x), wobei von der idealen Effizienz 2 ausgegangen wird.

3.7.2 LinReg–Werte

Das LinReg–Programm ist die zweite Möglichkeit die Rohdaten des LightCyclers zu analysieren. Hierbei berechnet das Programm die theoretische Anfangskonzentration des zu vervielfältigenden Gens und die PCR-Effizienz der jeweiligen Probe.

Diese Programm ist kostenlos und wird über Anfrage an die unten erwähnte Email-Adresse automatisch versendet (bioinfo@amc.uva.nl; Betreff: LinRegPCR). Dieses Programm wurde verwendet nach der Empfehlung von der Arbeitsgruppe um Ramakers, 2003 [24].

Die Daten aus dem LightCycler der Firma Roche müssen als so genannte „Noise Band“ unter der Option „Quantification“ abgespeichert werden. Die Daten müssen in ein Excel File transferiert werden, damit sie vom Programm erkannt werden.

Jede einzelne Probe (Sample) wird nun in einer Kurve aus Punkten dargestellt, wobei die Anzahl der Messungen des LightCyclers der logarithmischen Progression der Fluoreszenz entgegengesetzt wird. Das Programm sucht nun die Punkte in der Kurve, die am ehesten auf einer Linie liegen (Abbildung 9). An dieser Stelle ist die Steigung am Wendepunkt abzulesen. Es muss darauf geachtet werden, dass der Abstand zwischen den Punkten gleich ist, wobei eine maximale Abweichung von 0,1% allerdings zu tolerieren ist. Dieses spiegelt sich wieder im Korrelationskoeffizienten R^2 , der $>0,999$ sein muss. Andernfalls muss eine manuelle Nachkorrektur durch Veränderung der oberen und/oder unteren Grenze durchgeführt werden. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass sich die

verwendeten Punkte auf der logarithmischen Fluoreszenzkurve zwischen 1 und -1 befinden.

Die Linie der Punkte schneidet die x-Achse in einem Punkt. Dieser Schnittpunkt stellt als N^0 die Startkonzentration des vervielfältigten Gens dar.

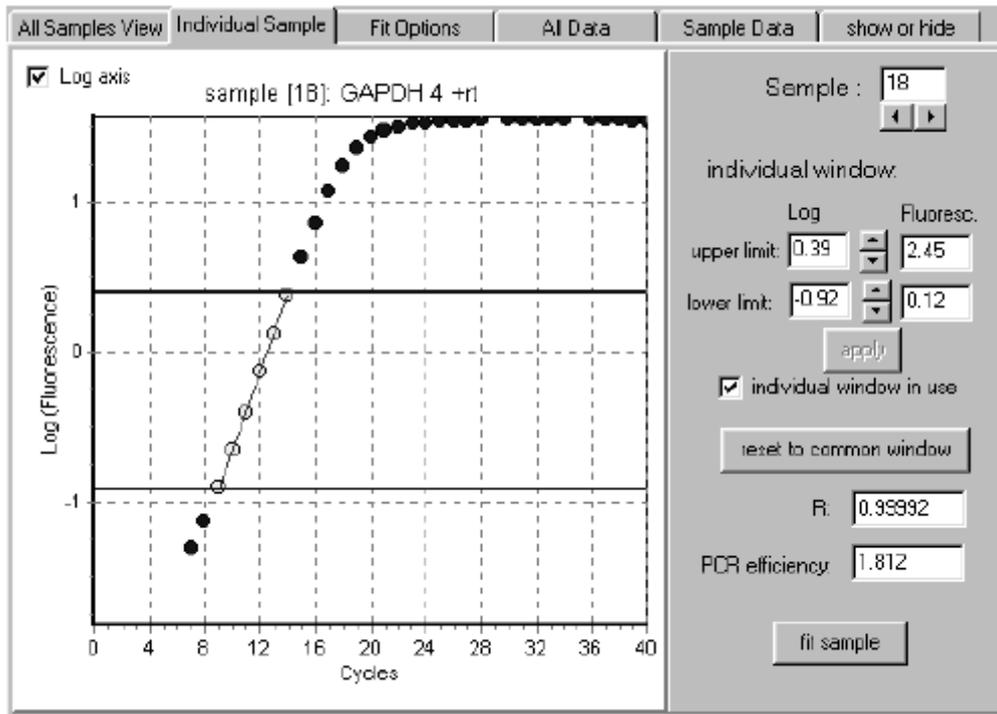


Abb.9 LinReg-Programmfenster (Version 7.5); Fluoreszenzmessungen für jeden Zyklus, punktförmig aufgetragen in einer logarithmischen Kurve.

3.7.3 PCR-Effizienz

Die Effizienz der PCR-Reaktion sagt aus, wie ideal unter den gegebenen Umständen das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten der PCR-Reaktion funktioniert hat. Die ideale PCR-Effizienz wäre erreicht, wenn aus jedem der zwei Mutterstränge jeweils zwei Töchterstränge entstehen würden. Man spricht dann von einer Effizienz=2. Diese ideale Effizienz existiert aber nur theoretisch. Da dieser Richtwert nicht erreicht werden kann, ist insbesondere die Konstanz der Effizienzen als Qualitätsmerkmal von besonderer Wichtigkeit. Mit Hilfe von Erkenntnissen aus früheren Forschungsgruppen [24] wurde eine

Effizienzregel aufgestellt, nach der Chargen-zu-Chargen beziehungsweise Lauf-zu-Lauf-Unterschiede mit Effizienzunterschieden von 0,05 oder weiter vom Durchschnitt abweichend nicht berücksichtigt wurden. Im jeweiligen Durchschnitt wurden alle Effizienzen zusammengefasst, die auf ein Primerpaar eines Rezeptors hin gemessen wurden. Der Durchschnitt wurde für jede Verdünnungsreihe einzeln berechnet. Diese Effizienzregel ist insbesondere bedeutsam, da größere Schwankungen in der Effizienz zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit führen (Tabelle 4).

Molekülzahl	PCR-Effizienz	
1,12E+01	1,73	Durchschnitt der PCR-Effizienz
2,59E+01	1,70	1,68
3,87E+01	1,68	1,63-1,73
2,55E+02	1,62	(Toleranzbereich)
1,86E+01	1,63	
4,94E+01	1,67	

Tab.4 Bedeutung abweichender Effizienz; T3R α 1-mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen; untersucht wurden Proben von 6 verschiedenen Tieren; bei einem Abweichen von mehr als 0,05 von der durchschnittlichen PCR-Effizienz kommt es oft zu einem starken Abweichen der Molekülzahl.

3.7.4 Housekeeping-Gen

Die zu vervielfältigende Menge an RNA kann bereits interindividuell variieren. Auch in späteren Schritten wie der RNA-Extraktion, der reversen Transkription oder der PCR können Unregelmäßigkeiten im Ablauf zu Unterschieden in der Substratmenge führen. Um diese Unterschiede zu erkennen und auszuschalten benötigt man einen so genannten internen Standard.

Die Methode der **Normalisierung auf TotalRNA** wurde in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten standardmäßig durchgeführt. Es wurde immer 1 µg RNA je Probe aus der RNA-Extraktion in die mRNA-cDNA-Umschreibung eingeführt. Dieses 1 µg wurde photometrisch bestimmt, je nach RNA-Gehalt der gewonnenen Lösung auf µl umgerechnet, und das entsprechende Volumen verwendet.

Eine weitere, weit verbreitete Methode, unter anderem wegen ihrer Einfachheit und ihren relativ niedrigen Kosten, ist die Verwendung eines **Housekeeping-Gens**. Das Housekeeping-Gen verändert sich wie alle Gene interindividuell. Diese Eigenschaft ist wichtig für die spätere Normierung. Die Besonderheit dieses Gens ist allerdings, dass es sehr konstant in den zu untersuchenden Geweben vorkommt und es unter den Bedingungen, denen es während der Experimente ausgesetzt wird, auch bleibt. Durch eine entsprechende Normierung lässt sich dann abgrenzen, welche Unterschiede zwischen den einzelnen Proben auf äußere Umstände zurückzuführen sind und welche Unterschiede glaubwürdig sind. Oft muss für jedes zu untersuchende Gen und den entsprechenden Bedingungen ein eigenes Housekeeping-Gen gesucht werden.

Die hier verwendeten Housekeeping-Gene sind GAPDH und Gs α . GAPDH ist ein viel beschriebenes und als Housekeeping-Gen verwendetes Enzym der Glykolyse, während Gs α die Untereinheit α des S-Typs des Guanin bindenden Proteins (Gs α) darstellt. Das Gs α -Gen ist ein von Prof. Eschenhagen vielfach untersuchtes Gen des Herzens. Dieser testete dieses Gen 1991-2000 an Herzzellen der Ratte unter verschiedensten Bedingungen. Unter anderem setzte er die Zellen Isoprenalin aus, verglich gesunde Zellen mit Herzinfarktzellen und untersuchte Herzen nach chronischer Stimulation des β -Adrenorezeptors [5]. Die Gs α -Untereinheit veränderte sich dabei kaum. Diese Eigenschaft weckte die Hoffnung, dieses Gen als Housekeeping-Gen verwenden zu können.

3.8 Testen auf T3R durch Western Blotten

- die zu untersuchenden Gesamtzelllysate in Sample Buffer lysieren;
- mit einem 7,5% Polyacrylamid Mini-Gel durch Elektrophorese bei 200V konstant circa 1 Stunde separieren;
- Proteine mittels dem semi-dryblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran auftragen; hierbei werden die Proteine in fixierter Position durch elektrischen Strom (400 mA konstant, 1 Stunde) vom Gel auf die Membran gezogen;
- mittels PonceauS-Färbung der Membran bestätigen, dass angemessene und vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden, anschließend mit PBS entfärben;
- mittels Coomassie-Färbung (30') nachweisen, wie viele Proteine nach dem Blot auf dem Gel verblieben sind, anschließend mit Essigsäure entfärben;
- Membran mit 2,5% Milchpulver und 1% BSA in TBS-Tween (Tris gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween-20) für 2 Stunden blocken;
- primär monoklonale Antikörper für T3R α 1, T3R α 2 [35] oder T3R β 1 (J52, Santa Cruz Biotechnology) entsprechend 1:50, 1:100 bzw. 1:500 verdünnen und über Nacht in einer 5 ml Milchpulverblockerlösung bei 4°C auf die Membran inkubieren lassen;
- dreimaliges Waschen mit TBS-Tween;
- mit Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper genau 45 Minuten auf die Membran inkubieren lassen;
- Erkennung mit dem chemolumineszenten Substrat SuperSignal® durchführen.

3.9 Zelleexperimente mit Kardiomyocyten und –fibroblasten

3.9.1 Isolierung von Kardiomyocyten

- den linken Ventrikel in 3-5 mm große Stücke zerschneiden;

- vorsichtig 30 Minuten lang in eiskaltem Tyrode-Puffer mit Skalpell weiter zerkleinern;
- so lange fortfahren, bis im Mikroskop in der Mehrzahl einzelne „rod shaped“-Kardiomyocyten nachgewiesen werden können;
- die Lösung mit den Kardiomyocyten im Zentrifugenröhrchen 20 Minuten sich setzen lassen;
- den Überstand abnehmen und das Pellet drei Mal waschen;
- das Pellet bei -80°C einfrieren oder daraus RNA oder Protein isolieren.

3.9.2 Isolierung, Kultivierung und Behandlung von Kardiofibroblasten

- auch hier den linken Ventrikel in 3-5 mm große Stücke zerschneiden;
- diese Stücke mit Skalpell weiter zerkleinern;
- mit Trypsin (1%) und Kollagenase (0,1%) in PBS für 45 Minuten verdauen;
- die Enzymreaktion mit 10% Kälberserum (FCS) stoppen;
- das verdaute Gewebe durch einen 500 μm Meshfilter aufreinigen;
- zweimal bei 200g für 5 Minuten zentrifugieren;
- die isolierten Zellen in Kulturmedium resuspendieren (DMEM mit 10% FCS) und auf mit 1% Gelatine beschichteten Kulturschalen (coated dishes) bei 37°C und 5% CO_2 inkubieren;
- die Zellen bei sub-Konfluenz nach 4-5 Tagen Dauer trypsinieren und mit einer Aussähdichte von 1×10^4 Zellen/ cm^2 passagieren.

Außerdem wurden die Kardiofibroblasten (CF) bis zur maximal 9.Passage eingesetzt um die Zellcharakteristiken zu erhalten. Routinemäßig wurden durch Präsenz von Vimentin und das Fehlen von Faktor VIII die Zellen als CF immunotypisiert (Zellkulturen müssten

mehr als 95% CF beinhalten). Die Experimente wurden zwischen der 3. und 6. Passage durchgeführt.

Folgendes Experiment wurde mit den Kardiofibroblasten durchgeführt:

- Zellen wurden in 6-well Schalen bei einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ cm^2 für 3 Tage unter folgenden Bedingungen kultiviert:
 - DMEM serum-frei
 - DMEM plus 10% FCS
 - DMEM plus dem Serumsupstitut Ultrosor G (2%)

3.10 Primer und Antikörper

3.10.1 Primer

Target-Gene	Produktlänge (bp)	5'→3'	Primersequenzen	GeneBank accession no
T3Rα1	234	Forward reverse	TCTTCTCTCCTTCCTCTGGTCC TACGGTCAAGATGGCTCGTC	AJ005797 Mac Gene Works2.45: 1460-1693 White FASEB 2001:15:1367
T3Rα2	106	Forward reverse	TCTTTCCGTGTCCTGTGAGG TAGAAGCATGAACCAAGGGC	AJ005798 Mac Gene Works2.45: 1899-2004 White FASEB 2001:15:1367
T3Rβ1	204	Forward reverse	GACCAGCTCGATTCTCCATC AAGAAACCCTTGCAGCCTTC	AJ238614 Mac Gene Works 2.45: 154- 357 White FASEB 2001:15:1367
MCT8 hu	222	Forward reverse	CTTCTTCGTCCCTCTGATGC TGCTGGTGGCAAAAATGTAA	NM_006517 Primer3: BH182-BH183: 1870-2091
MCT10 hu	199	Forward reverse	GCATACCAGCCTTCATTGGT AGCCAGCCAGAAAGAGAACA	NM_018593 Primer3: 694-892
GAPDH	205	Forward reverse	TGCTGGTGCTGAGTATGTCG CAAGCAGTTGGTGGTACAGG	AF017079 Mac Gene Works2.45: 602- 806
GSα	210	Forward reverse	AAGCAGGATGACTACGTGCC CATGTTGTAGCTGCTGCTGG	NM_214312 Mac Gene Works2.45: 760- 969

Tab.5 Auflistung der verwendeten Primer mit den jeweiligen Quellen bzw. Eintragsnummern in der NCBI-Datenbank; alle Primer außer die für MCT8 und 10 entsprechen der Gensequenz von Schweine-mRNA-Sequenzen.

3.10.2 Antikörper

- T3R-Antikörper $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (monoklonale IgM-Antikörper)
 - T3R-AK $\alpha 1$ bindet bei 47 kDa
 - T3R-AK $\alpha 2$ bindet bei 58 kDa
- veröffentlich von Zandieh-Doulabi und seinem Forschungsteam, 2003 [35]
- erhalten von Onno Bakker, Amsterdam

- monoklonaler T3R- $\beta 1$ -Antikörper aus der Maus (J52/SC-738, Santa Cruz Biotechnology)
 - Peroxidase gekoppelte zweiter Antikörper gegen Maus IgG #515-035-003
 - Peroxidase gekoppelte zweiter Antikörper gegen Maus IgM #115-035-075 (Beide von Jackson ImmunoResearch Laboratories-Dianova)

3.11 Lösungen – Puffer – Reagenzien - Geräte

Lösungen

- **mRNA -> cDNA-Umschreibungslösung, Invitrogen-Kit und dNTP**

- First strand buffer 6 μ l
- 0,1 M DTT 3 μ l
- Super Script Reverse Transcriptase 1 μ l
- dNTP (siehe unten) 1,5 μ l

- **RNA-Elektrophoresegel (1%)**

- Agarose 0,5 g
 - 10x Gel running buffer 5 ml
 - Ethidiumbromid 0,5 μ l
 - 37% Formaldehyd 1,5 ml
- 42,5 ml aqua dest. hinzu fügen

- **Polyacrylamid SDS-Gele (7,5%) für Proteine**

- **Trenngel (7,5%)**

- 50% Glycerin/ a.d. 6,8 ml
- AA/Bis 3,5 ml
- LOWER Tris, pH 8,8 3,5 ml
- TEMED 7 μ l
- 10% APS 70 μ l

- **Sammelgel (4%)**

- AA/Bis 0,66 ml
 - UPPER Tris, pH 6,8 1,25 ml
 - TEMED 5 µl
 - 10% APS 35 µl
- 3,05 ml a.d. hinzu fügen

• **Probengemisch für eine Gelkammer eines RNA– Elektrophoresegel**

- 5 µg der zu untersuchenden RNA
- 65,6% Formamid
- 21,3% 37% Formaldehyd
- 13,1% 10x running buffer (Zusammensetzung siehe unten)
- 1 µl loading buffer (Zusammensetzung siehe unten)

• **Herstellung eines Reaktionsgemisches für eine Kapillare im LightCycler**
(alle Substanzen als Kit von Roche)

- 1,8 µl MgCl
 - 1,5 µl SybrGreen-Farbstoff
 - 0,36 µl des Primerpaares des gesuchten Gens
 - 1,5 µl der zu vervielfältigenden RNA
- 9,84 µl a.d. hinzu fügen

• **Coommassie–Farbe**

- Coomassie R 2 g
 - Coomassie G 0,5 g
 - Methanol 500 ml
 - Essigsäure 200 ml
- auf 300 ml mit a.d. auffüllen

• **Coommassie–Entfärber**

- Essigsäure 25 ml
- Methanol 300 ml

• **TBS–Tween** (Tris gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween-20)

• **LOWER Tris, pH 8,8**

- Tris (1,5M) 18,17 g
 - 20 % SDS 2 ml
- auf 100ml mit a.d. auffüllen

- **UPPER Tris, pH 6,8**
- Tris (0,5 M) 6,06 g
- 20% SDS 2 ml
- auf 100 ml mit a.d. auffüllen

- **Nitrocellulosemembran** – SV 71223.01

Puffer

- **Celsior**

Bestandteile (Menge (g/mol) – Bezeichnung)

- 60 mM Mannitol
- 70 mM Lactobionsäure
- 20 mM Glutamat
- 0,25 mM CaCl₂
- 15 mM KCl
- 13 mM MgCl₂
- 100 mM NaOH
- 30 mM Histidin
- 3 mM Glutathion
- 20 mM BDM
- pH 7,3

- **Tyrode-Puffer**

Bestandteile (Menge – Bezeichnung – Firma – Bestellnummer)

- 120 mM NaCl
- 3,8 mM KCl
- 1,2 mM KH₂PO₄
- 1,2 mM MgSO₄x 7H₂O
- 11,1 mM Glucose
- 20 mM HEPES
- pH 7,4

- **10x Gel running buffer**

- 20,93 g MOPS
- 0,205 g NaAcetat
- 0,731 g EDTA
- auf 500 ml mit milli-pore H₂O auffüllen

- **Loading buffer**
 - 20 ml Glycerin (50 %) pH 7,0
 - 20 mg Bromphenolblau (0,05 %) auf 40 ml mit a.d. auffüllen

- **PBS (Zellkulturpuffer)**
 - 1,05 g KH_2PO_4
 - 2,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 - 45 g NaCl auf 5 Liter mit milli-pore H_2O auffüllen

- **TrisGlycin–Laufpuffer (Protein–Gel) – 100fach Stock**
 - 30 g Tris
 - 144 g Glycin auf 1 Liter mit milli-pore H_2O auffüllen

Reagenzien

(Bezeichnung – Firma – Produktnummer/Bestellnummer)

- | | |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
| • 1% BSA | Sigma – A-3059 |
| • 2,5% Milchpulver | Roth – 2710453 |
| • Acrylamid | Roth – 2011737 |
| • Agarose | Invitrogen – 15510-027 |
| • APS | Roth – 2317865 |
| • BDM | Sigma – B0753 |
| • Benchmark™ Pre-Stained protein ladder | Invitrogen – Cat.No. 10748-010 |
| • Bis | Roth – 2037509 |
| • Bromphenolblau (0,05%) | Merck – 108122 |
| • $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | Merck – 102382 |
| • Chloroform | Merck – 102445 |
| • DEPC | Roth – 2165428 |
| • DMEM | Gipco – 21885-025 |
| • dNTP Set | Amersham Biosciences – 27-2035-01 |
| • EDTA | Merck – 324506 |
| • Essigsäure | Merck – 109951 |
| • Ethanol | Merck – 100986 |
| • Ethidiumbromid | Sigma – E1510 |
| • FCS | Invitrogen – 10270106 |
| • Formaldehyd | Merck – 104002 |
| • Formamid | Merck – 109684 |
| • Gelantine | Sigma – G1890 |
| • Glucose | Merck – 108342 |
| • Glutamat | Merck – 10291 |

- Glutathion Merck – 104090
- Glycerin Merck – 104092
- Glycin Roth – 3908.2
- HEPES Sigma/Roche – H-3375/737151
- Herings Sperma Invitrogen – Ca.No. 15634-017
- Histidin Merck – 104351
- Isopropylalkohol Merck – 100995
- KCl Merck – 104936
- KH_2PO_4 Merck – 10818
- Kollagenase Worthington – LS005275
- Lactobionsäure Sigma – L2398
- Mannitol Merck – 105987
- Methanol Merck – 106008
- $\text{Cl}_2\text{Mg} \times 6 \text{H}_2\text{O}$ Merck – 105833
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ Merck – 105886
- MOPS Roche – 1.124.684
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ Sigma – 10028-24-7
- NaAcetat Merck – 106268
- NaCl Fluka – 71381
- NaOH Merck – 106498
- pd(N)6–Primer Amersham Biosciences – 27-2166-01
- pd(T)–Primer Amersham Biosciences – 27-7858-02
- PonceauS-Farbe Serva – Cat.No. 33427
- SDS Biorad – 161.0300
- SuperSignal® West Dura Pierce – Code 0034075
- TEMED Roth – 2037446
- Tris Merck – 1.08282.2500
- Trizol–RNA–Extraktion Invitrogen – Cat.No. 15596-018
- Trypsin Biochrom – L2143
- Tween-20 Biorad – Cat.No. 170-6531
- Ultroser G Life -15950-017

Geräte

- LightCycler der Firma Roche
- Photometer der Firma Eppendorf
- Gel- und Blotkammer–System für den Western Blot der Firma Invitrogen
- Gelkammer für RNA–Gel der Firma Biorad
- Ultra-Turrax der Firma Jahnke+Kunkel (IFN Labortechnik)

4. Resultate

4.1 Wahl des Analyseprogramms

Es stehen verschiedene Ansätze zur Interpretation von rt-PCR-Rohdaten zur Verfügung.

Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde mit dem LinReg-Programm (Ramakers, 2003 [24]) als viel versprechende Neuerung und der delta-delta Methode als etablierte und viel verwendete Rechenmethode gearbeitet.

Solche Rechenmethoden werden verwendet, da schon kleinste Schwankungen in der PCR-Effizienz zu fehlerhaften Interpretationen der Ergebnisse führen können. Unterschiede, allein durch die effizienter oder ineffizienter ablaufende Vervielfältigung bedingt, können dafür ausreichen.

Das LinReg-Programm bestimmt für jede Probe einzeln und unabhängig von den anderen mitgemessenen Proben seine Startkonzentration und die PCR-Effizienz und hat im Gegensatz zur delta-delta Methode den Vorteil, weniger anfällig gegen Schwankungen zu sein. Sollten dennoch Schwankungen auftreten, können diese mit diesem Programm leichter detektiert werden. Damit ermöglicht es eine entsprechende Bewertung der Gültigkeit der Messergebnisse. Deutlich niedrigere Standardabweichungen als bei der delta-delta Methode erhält man durch zusätzliche Beachtung der Effizienzregel (Abbildung 10). Diese wird angewandt, indem man alle Proben außerhalb eines schmalen Fensters von 0,05 ober- oder unterhalb vom Durchschnitt der Probeneffizienzen nicht in die Berechnung mit einbezieht. Die Proben, bei denen der Grenzwert 0,05 über- oder unterschritten wird, weichen oft in hohem Maße vom erwarteten Wert ab (Abbildung 10 - Vergleich der letzten beiden Säulen, ohne und mit Beachtung der Effizienzregel und Tabelle 4) [24].

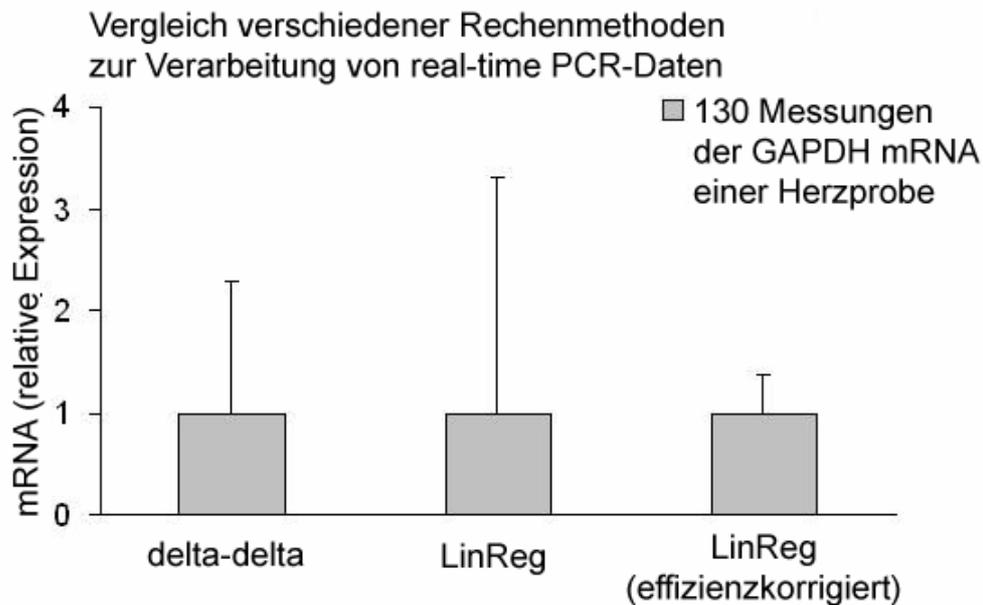


Abb.10 Vergleich mehrerer Rechenmethoden zur Verarbeitung der rt-PCR-Daten; GAPDH-mRNA eines Herzens wurde in standardisiert festgelegter Menge mittels quantitativer rt-PCR gemessen; berechnete Ergebnisse nach der delta-delta Methode, dem LinReg-Programm und dem LinReg-Programm mit Beachtung der Effizienzregel; die Analyse mit LinReg unter Beachtung der Effizienzregel hat die geringste Standardabweichung und ist damit die verlässlichste Methode.

<u>Molekülzahl</u>	<u>PCR-Effizienz</u>	
1,12E+01	1,73	Durchschnitt der PCR-Effizienz
2,59E+01	1,70	1,68
3,87E+01	1,68	1,63-1,73
2,55E+02	1,62	(Toleranzbereich)
1,86E+01	1,63	
4,94E+01	1,67	

Wiederaufnahme der Tab.4: Bedeutung abweichender Effizienz; T3R α 1-mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen; untersucht wurden Proben von 6 verschiedenen Tieren; bei einem Abweichen von mehr als 0,05 von der durchschnittlichen PCR-Effizienz kommt es oft zu einem starken Abweichen der Molekülzahl.

Bei der Potenzierung (2^x) als letzter Schritt der delta-delta Methode wird von der idealen Effizienz zwei ausgegangen. Diese wird aber physiologisch nie erreicht. Die Effizienz liegt

meist deutlich niedriger und schwankt je nach Laufbedingungen zwischen 1,6 und 1,9. Da man bei der delta-delta Methode von einer zu hohen Effizienz ausgeht, kommt es bei der Berechnung oft zu falsch hohen oder niedrigen Unterschieden.

4.2 Verwendung des Kalibrators

Die oben erwähnte Normierung auf einen Kalibrator erwies sich als nicht sinnvoll. Keine der beiden verwendeten Normierungsmethoden ergab klarere Werte mit niedrigeren Standardabweichungen. Aus diesem Grund floss diese Normierungsmethode nicht in die Ergebnisanalyse ein.

4.3 Optimale Verdünnungsstufe

Die optimale Verdünnung stellt ein Ausbalancieren zwischen einer zu niedrigen und einer zu hohen Verdünnung dar. Während bei einer zu niedrigen Verdünnung die Faktoren, die die PCR hemmen, noch in einer zu hohen Konzentration vorhanden sind, sind bei einer zu hohen Verdünnung die zu vervielfältigenden Substrate nur in derart geringen Konzentrationen vorhanden, dass die Reaktion gar nicht oder nur stark verzögert ablaufen kann. Die Verdünnung und damit die sinkende Konzentration an reaktionshemmenden Substanzen führten mit steigender Verdünnungsstufe zu einem Anstieg der Effizienz (Tabelle 6).

Name	Stufe	PCR-Effizienz
Probe	unverdünnt	1,466
Probe	1:10 verdünnt	1,712
Probe	1:100 verdünnt	1,814

Tab.6 Beispiel des Effizienzanstieges bei steigender Verdünnung des Reaktionsgemisches durch sinkende Konzentration der hemmenden Faktoren.

In der Verdünnungsreihe unverdünnt – 1:10 – 1:100 erwies sich die Verdünnung 1:10 als die Verlässlichste. Grund dafür sind die geringeren Standardabweichungen der Verdünnung 1:10 im Vergleich mit den anderen Verdünnungsstufen (Abbildung 11) und dem geringeren Ausschuss von Proben durch Effizienzwankungen (Tabelle 7).

In der Stufe 1:100 fehlte außerdem oftmals die Bestätigung einer korrekt abgelaufenen Reaktion in der Schmelzkurve. Dies war am fehlenden Kurvenausschlag zu erkennen und liegt wohl darin begründet, dass oftmals durch die zu hohe Verdünnung nicht mehr ausreichend mRNA in der Reaktion vorhanden war.

Verdünnungsstufen	Effizienzbedingter Ausfall
unverdünnt	16 von 135
1:10	4 von 163
1:100	12 von 135

Tab.7 Anzahl der Proben, die durch ihre zu stark abweichende Effizienz nicht in die Analysen aufgenommen wurden, aufgelistet nach ihrer Verdünnung; unter Beachtung der Effizienzregel ergeben sich die wenigsten Ausfälle bei der Verdünnung 1:10.

Die Festlegung auf die Stufe 1:10 führte dazu, dass in weiteren Experimenten die Verdünnungsreihe 1:5 – 1:10 – 1:20 aufgebaut wurde. Hierbei zeigte sich, dass sich die einzelnen Verdünnungsstufen 1:5 – 1:10 – 1:20 im Verhältnis zueinander besser entsprachen als die Verdünnungsstufen unverdünnt – 1:10 – 1:100. Von den verwendeten Verdünnungsstufen zeigte sich am Ende die Verdünnung 1:5 als die Verlässlichste.

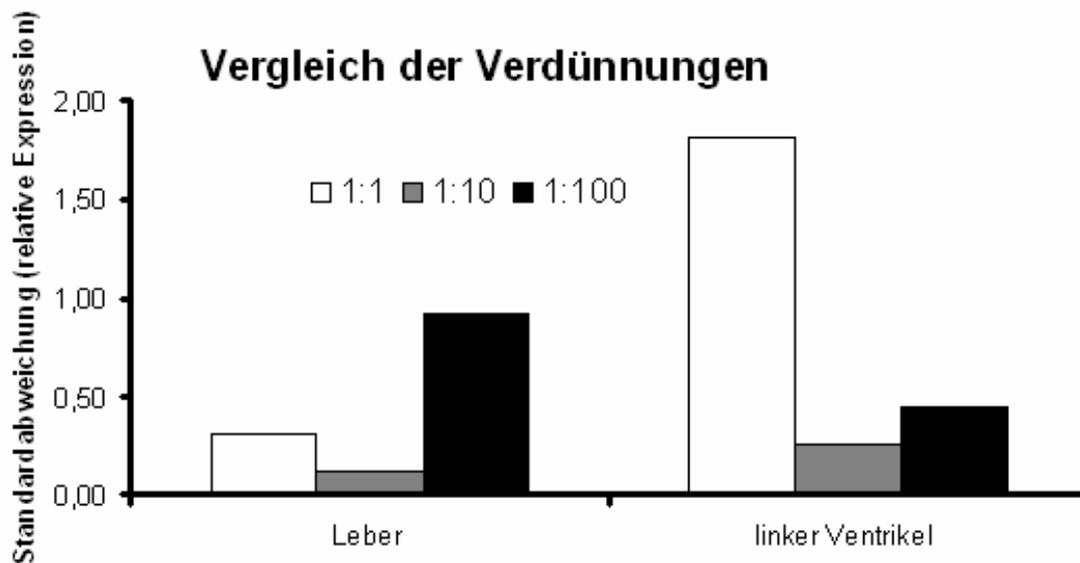


Abb.11 Vergleich der Standardabweichungen bei verschiedenen Verdünnungsstufen; mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen und auf $Gs \alpha$ normiert; untersucht wurden Proben von 6 verschiedenen Tieren; die geringste Standardabweichung ergab sich bei der Verdünnung 1:10.

4.4 Housekeeping-Gen

Bei ersten Vergleichen des Herzens mit der Leber zeigte sich, dass sich das bis dahin verwendete Housekeeping-Gen GAPDH sehr stark in seiner Expression zwischen beiden Geweben unterschied. Bei einer Verwendung dieses Housekeeping-Gens wäre ein Vergleich der untersuchten Gewebe unmöglich gewesen. Daraufhin wurde nach einem Housekeeping-Gen gesucht, welches nicht nur minimale Unterschiede innerhalb des Herzens, sondern auch im Vergleich zur Leber aufweist. Unter anderen wurde $Gs \alpha$ auf die mögliche Verwendung als Housekeeping-Gen hin untersucht.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Expression von $Gs \alpha$ im Vergleich zum bisher verwendeten Housekeeping-Gens GAPDH. Es wurde hierbei die Expression in Herzzellen mit der Expression in Leberzellen verglichen. GAPDH unterscheidet sich zwischen Herz und Leber fast im Faktor acht. Bei $Gs \alpha$ dagegen zeigt sich im Vergleich ein deutlich niedrigerer Unterschied um weniger als Faktor 2.

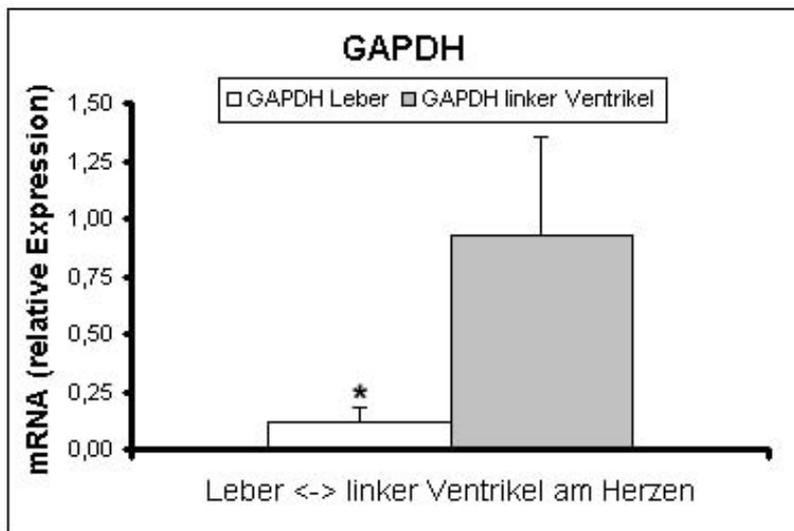


Abb.12a) Vergleich der Genexpression von GAPDH;

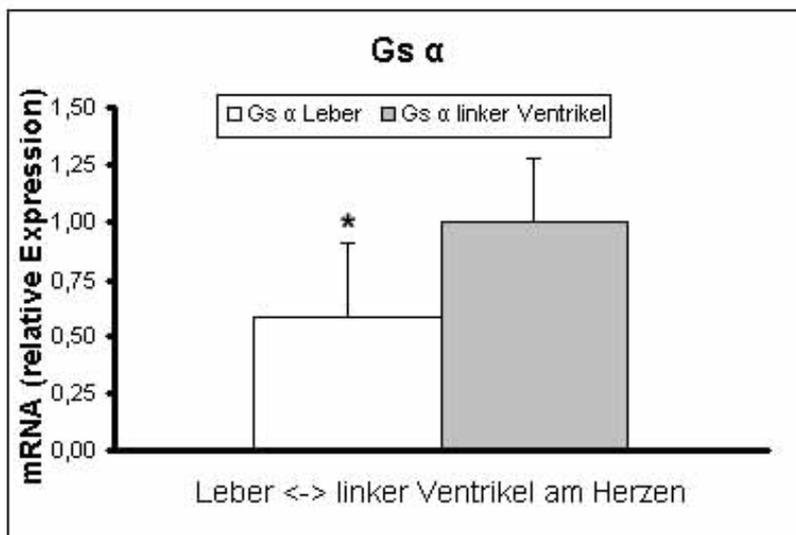


Abb.12b) Vergleich der Genexpression von Gs α ; mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen und anschließend relativ zum linken Ventrikel ausgedrückt (linker Ventrikel=1), die Effizienzregel wurde beachtet; untersucht wurden Proben von 6 verschiedenen Tieren; Gs α zeigt im Vergleich zwischen Herz und Leber deutlich niedrigere Unterschiede als GAPDH; * für GAPDH: 0,001 und * für Gs α : 0,023.

4.5 Quantifizierung der T3R am Herzen

Das Herz erfüllt mit seinen unterschiedlichen Räumen (linker und rechter Ventrikel, linkes und rechtes Atrium) unterschiedliche Aufgaben und unterliegt somit unterschiedlichen

Beanspruchungen. Dadurch ergab sich die Frage, ob sich die Expression der T3R im Herzen in diesen unterschiedlichen Räumen unterscheidet. Wichtig schien insbesondere der Vergleich der größten Räume, dem rechten und dem linken Ventrikels mit ihren unterschiedlichen Druckgradienten. Außerdem wurden Proben aus dem linken Atrium entnommen und zwar als Beispiel für beide Atrii, in denen sich die Druckgradienten ähnlich darstellen.

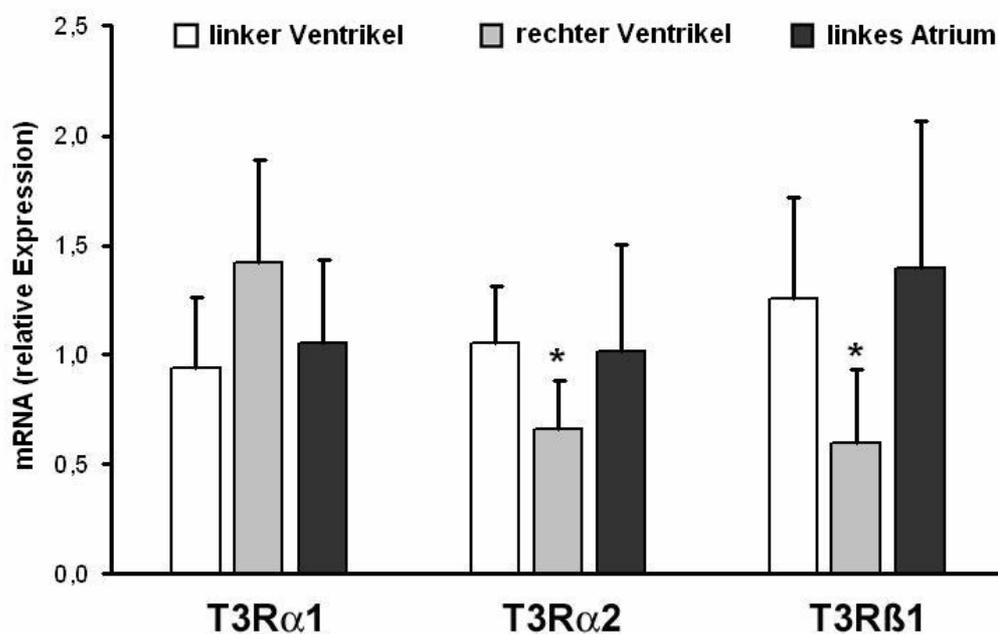


Abb.13 Vergleich der Expression der T3R in drei Kompartimenten des Herzens (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, linkes Atrium); mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen, auf GAPDH normiert und anschließend relativ zum linken Ventrikel ausgedrückt (linker Ventrikel=1), die Effizienzregel wurde beachtet; untersucht wurden in jeder Gruppe Proben von 6 verschiedenen Tieren; T3R α 2 und β 1 werden im rechten Ventrikel im Vergleich zum linken Ventrikel signifikant niedriger exprimiert; * für T3R α 2: <0,013 und * für T3R β 1: <0,017.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant niedrigere Expression des T3R α 2 Rezeptors im rechten Ventrikel im Vergleich zum linken Ventrikel. Während sich beim

T3R α 1 im Vergleich dieser Strukturen kein signifikanter Unterschied zeigte, wurde der T3R β 1 im rechten Ventrikel nach demselben Muster wie der T3R α 2 geringer exprimiert (Abbildung 13).

4.6 Quantifizierung der T3R im Vergleich von Herz und Leber

Der T3R α 2 wird im Herz doppelt so stark exprimiert wie in der Leber. Im Gegensatz dazu weist die Expression des T3R α 1 im linken Ventrikel im Vergleich zur Leber keine Unterschiede auf. Beim T3R β 1 zeigt sich im Vergleich eine stärkere Expression in der Leber, die sich allerdings als nicht signifikant herausstellte.

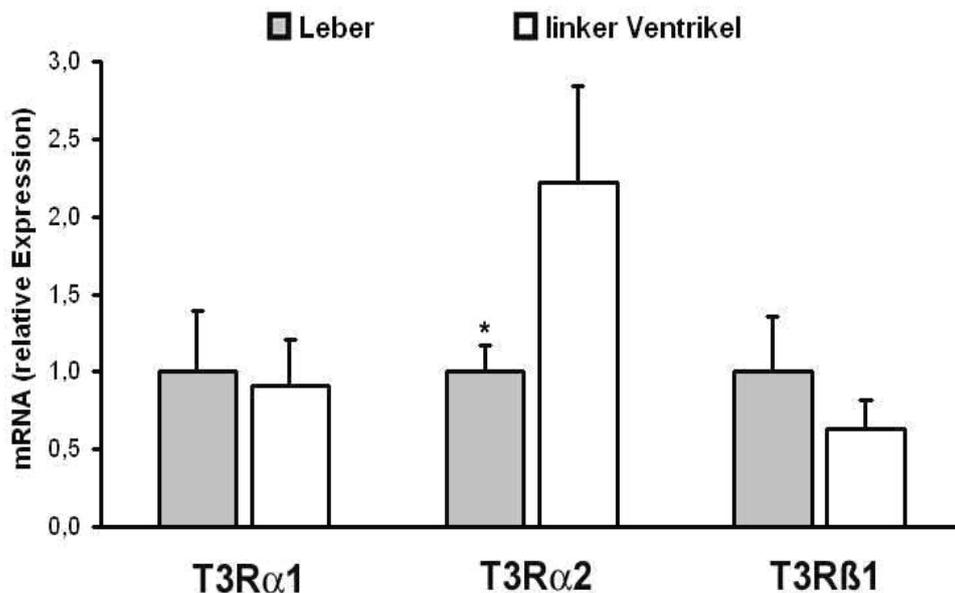


Abb.14 Vergleich der Expression von T3R in der Leber und im linken Ventrikel des Herzens; mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen, auf Gs α normiert und anschließend relativ zur Leber ausgedrückt (Leber=1), die Effizienzregel wurde beachtet; untersucht wurden Proben von 6 verschiedenen Tieren; T3R α 2 wird im linken Ventrikel doppelt so viel exprimiert als in der Leber; * für T3R α 2: 0,0014.

4.7 Zellexperimente zur Messung von T3R an Kardiomyocyten und –fibroblasten

Verglichen wurden hierbei die T3R in den Kardiomyocyten, die Funktion und Aktivität des Herzens ausmachen, und die der Kardiofibroblasten, die die Stabilität des Herzens gewährleisten. Deutliche Unterschiede zeigten sich bei dem T3R $\alpha 2$ und $\beta 1$. Der T3R $\alpha 2$ zeigte sich in den Kardiomyocyten knapp dreimal so stark exprimiert als in den Kardiofibroblasten, der T3R $\beta 1$ ist mehr als fünfmal stärker in den Kardiomyocyten als in den Kardiofibroblasten zu finden (Abbildung 15). Beim T3R $\alpha 1$ fand sich überraschenderweise eine tendenziell höhere Expression bei den Kardiofibroblasten, die sich aber als nicht signifikant herausstellte.

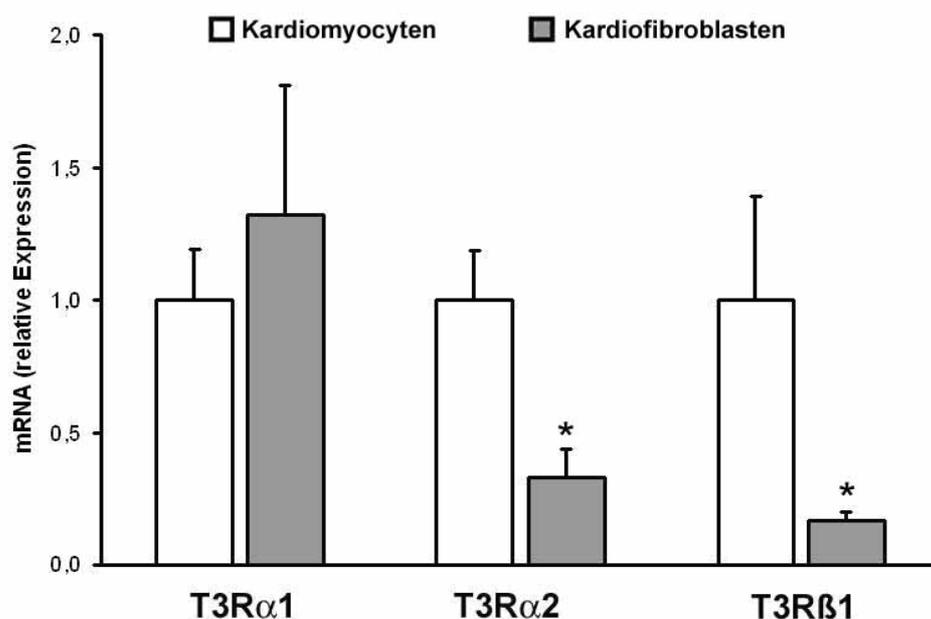


Abb.15 Expression der T3R $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\beta 1$ in isolierten Kardiomyocyten im Vergleich zu Kardiofibroblasten; mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen, auf Gs α normiert und anschließend relativ zu den Kardiomyocyten ausgedrückt (Kardiomyocyten=1), die Effizienzregel wurde beachtet; T3R $\alpha 2$ und T3R $\beta 1$ werden in den Kardiomyocyten deutlich stärker exprimiert als in den Kardiofibroblasten, im Gegensatz dazu zeigt sich beim T3R $\alpha 1$ kein signifikanter Unterschied; * für T3R $\alpha 2$: <0,001 und * für T3R $\beta 1$: 0,016.

Kein Unterschied zeigte sich in der Rezeptorexpression bei dem Vergleich der unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellenreihen (Abbildung 16). Es wurden hierbei Zellen unter serumfreien Bedingungen, also in einem Nährmedium ohne Serumproteine und -hormone, gehalten. Die Zellen wurden durch diese ungünstigen Bedingungen nicht zur Proliferation angeregt. Des Weiteren wurden Zellen in normalem Nährmedium (FCS) in annähernd physiologischen Bedingungen kultiviert. In einer dritten Reihe wurde außerdem ein künstliches Nährmedium mit enthaltenen Wachstumshormonen (Ultroser G (2%)) eingesetzt.

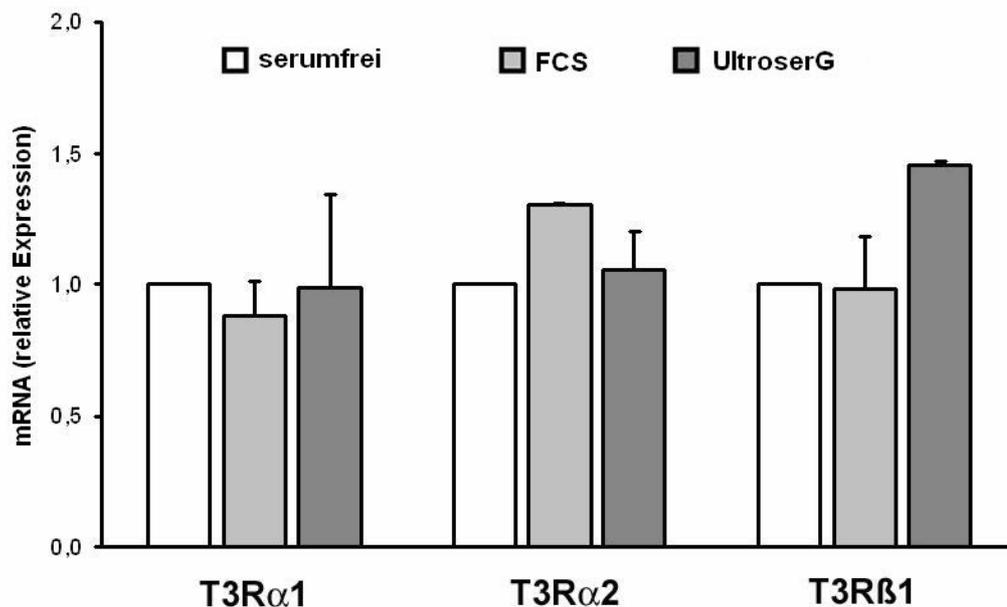


Abb.16 Expression der T3R α 1, α 2 und β 1 im Vergleich von unter verschiedenen Bedingungen gezüchteten Kardiofibroblasten; mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen, auf Gs α normiert und anschließend relativ zu den serumfrei gezüchteten Kardiofibroblasten ausgedrückt (Kardiofibroblasten (serumfrei)=1), die Effizienzregel wurde beachtet; kein signifikanter Unterschied im Vergleich der unter verschiedenen Proliferationsbedingungen kultivierten Zellen.

4.8 Proteinanalyse der T3R

Der Antikörper für den T3R $\alpha 2$ zeigte im Western Blot auf der für ihn beschriebenen Höhe von 58 kDa [35] nur im Herzen eine Bande (E). Zusätzlich dazu fanden sich in allen Geweben bei 50 kDa beziehungsweise in der Leber bei 55 kDa Banden (F). Bei 37 kDa zeigte sich außerdem allein im Herzen eine Bande, dort jedoch in sehr starker Konzentration (G).

Beim T3R $\alpha 1$ -Blot zeigten sich bei 47 kDa die für den Rezeptor beschriebenen Banden [35] im Gesamtherzen und den Kardiofibroblasten (B). Zusätzlich dazu fanden sich auf jeweils verschiedenen Höhen zwischen 50-63 kDa insgesamt fünf Banden auf alle drei untersuchten Gewebe verteilt (A).

Bei 28 kDa beziehungsweise 43 kDa sind in der Literatur mitochondriale Rezeptoren als Isoformen des c-erbA α -Transkripts beschrieben [2]. Auch das Forscherteam um Portman spricht von verschiedenen mitochondrialen Unterformen für den T3R $\alpha 1$ und $\alpha 2$ [23]. Beim T3R $\alpha 1$ -Blot fanden sich dazu passend Banden auf Höhe von etwa 28 kDa in Herz und Leber, nicht aber in den Kardiofibroblasten (C). Zusätzlich hierzu zeigte sich im $\alpha 1$ -Blot wie auch schon beim $\alpha 2$ -Blot im Herzen bei 37 kDa eine Bande (D) (Abbildung 17a).

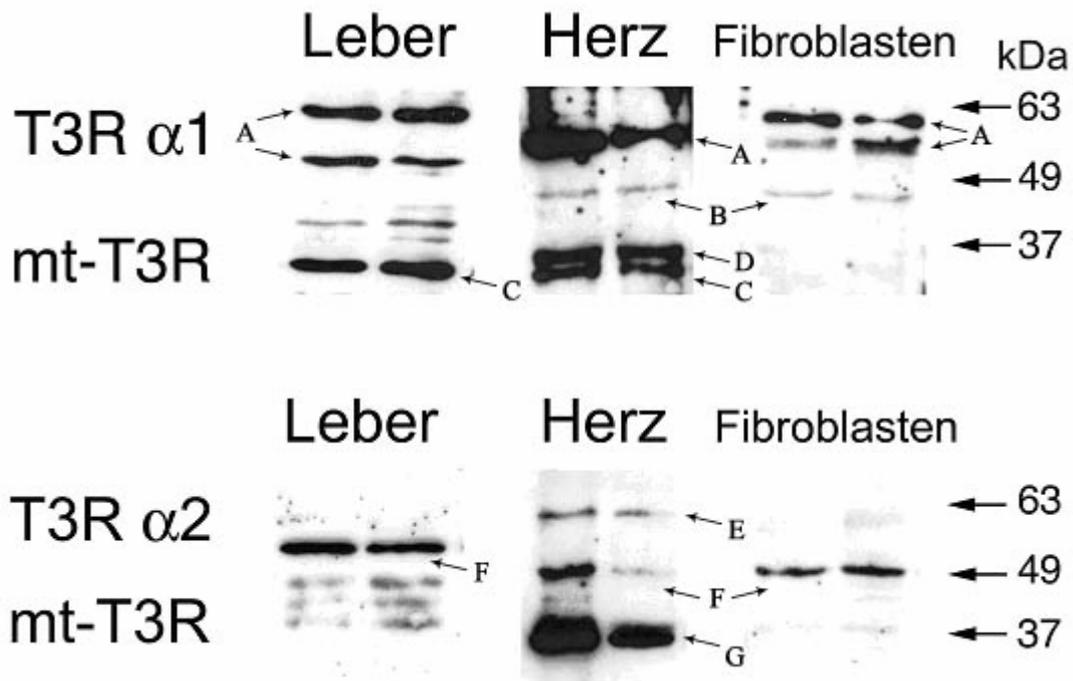


Abb.17a): Proteinanalyse der T3R $\alpha 1$ und $\alpha 2$ in den Geweben Leber, Herz (insbesondere aus Kardiomyocyten bestehend) und Kardiofibroblasten; Doppelbestimmung der Proteinmengen bei zwei verschiedenen Proben, dargestellt als doppelte Bande; Proteine aus Gesamtzelllysaten wurden mittels Western Blot-Verfahren analysiert, kDa definiert durch die verwendete BenchmarkTM Pre-Stained protein ladder; mt-T3R=mitochondriale T3R; im T3R $\alpha 1$ -Blot: bei 47 kDa für den Rezeptor beschriebene Banden im Gesamtherz und in Kardiofibroblasten (B), zusätzlich fünf Banden in allen drei Geweben in verschiedenen Größen zwischen 50 und 63 kDa (A), mitochondriale Rezeptorbanden bei 28 kDa in Herz und Leber (C), außerdem eine zusätzliche, wahrscheinlich modifiziert mitochondriale Bande im Herzen bei 37 kDa (D); im T3R $\alpha 2$ -Blot: bei 58 kDa eine für den Rezeptor beschriebene Bande im Herz (E), zusätzlich Banden bei 50 kDa in Herz und Fibroblasten und 55 kDa in der Leber (F), mitochondriale Rezeptorbande im Herz bei 37 kDa (G).

Im Blot des T3R $\beta 1$ zeigten sich in allen untersuchten Geweben allein bei 51 kDa Banden. Dies ist laut dem Hersteller Santa Cruz Biotechnology der typische Bindungsort des

Antikörpers für den T3R β 1. Die Phase der Kardiofibroblasten ist dabei am stärksten ausgeprägt (Abbildung 17b).

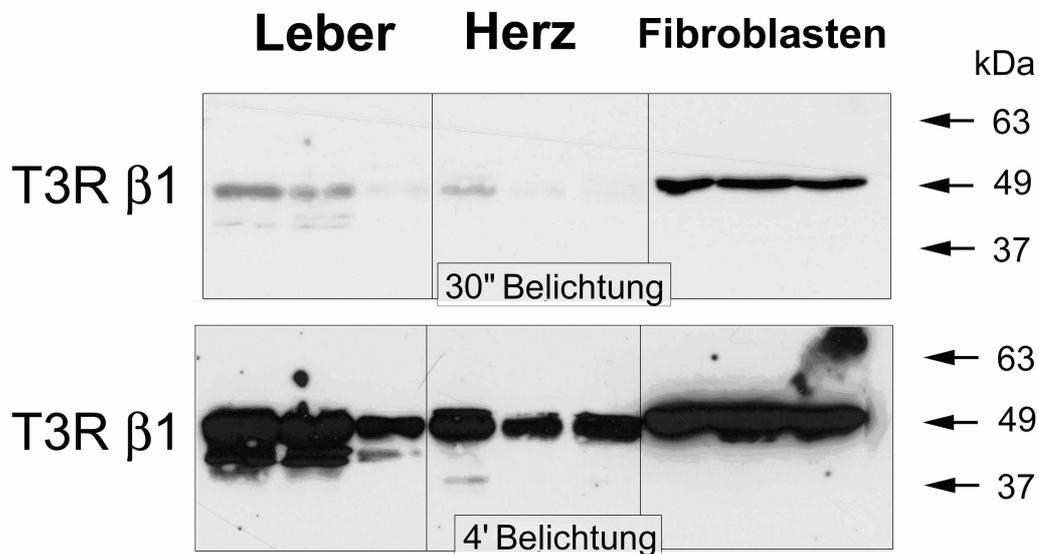


Abb.17b) Proteinanalyse des T3R β 1 in den Geweben Leber, Herz und Kardiofibroblasten; Proteine aus Gesamtzelllysaten wurden mittels Western Blot-Verfahren analysiert, kDa definiert durch verwendete Benchmark™ Pre-Stained protein ladder, Belichtung des Photopapiers für 30 Sekunden beziehungsweise 4 Minuten, Trippelbestimmung der Proteinmenge bei drei verschiedenen Proben; ubiquitäre Expression von T3R β 1 in allen untersuchten Geweben allein bei 51 kDa, dabei deutlich am meisten in den Kardiofibroblasten.

4.9 Quantifizierung der Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT10

Der Schilddrüsenhormontransporter MCT8 wird in der Leber im Vergleich zum Herzen dreimal mehr exprimiert. Auch beim MCT10 zeigte sich eine signifikant höhere Expression in der Leber (Abbildungen 18a und 18b).

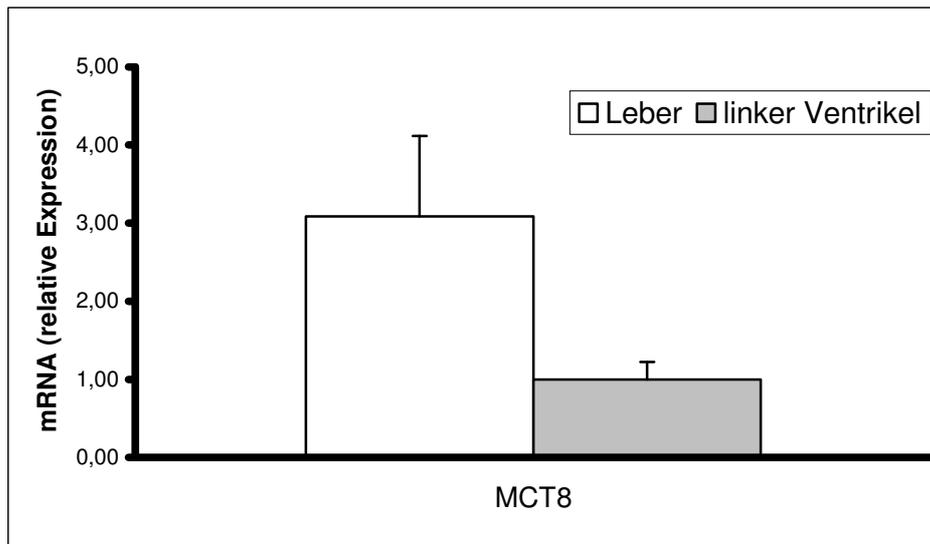


Abb.18a)

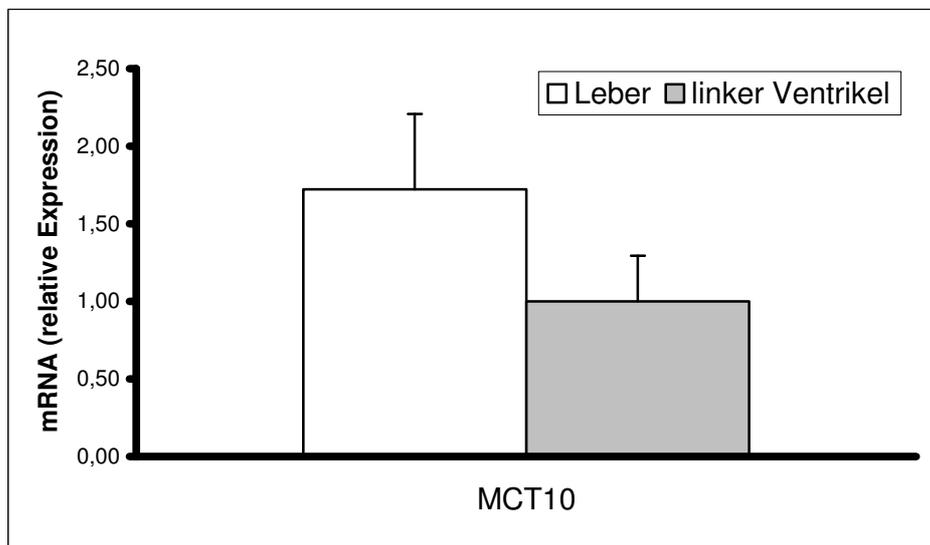


Abb.18b)

Vergleich der Expression der Schilddrüsenhormontransporter MCT8 (18a) und MCT10 (18b) zwischen Herz und Leber; mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen, auf Gs α normiert und anschließend relativ zum linken Ventrikel ausgedrückt (linker Ventrikel=1), die Effizienzregel wurde beachtet; untersucht wurden Proben von 6 verschiedenen Tieren; linker Ventrikel steht hierbei für das gesamte Herz; 3-fach höhere Expression von MCT8 in der Leber im Vergleich zum linken Ventrikel, ebenfalls signifikant höhere Expression von MCT10 in der Leber; * für MCT8: < 0,001 und * für MCT10: 0,015.

4.10 Quantifizierung der T3R des Reizleitungsystems des Herzens

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede beim T3R α 1 und β 1. Der T3R α 2 ist im AV-Knoten des zuerst präparierten Herzen im Vergleich zur Negativkontrolle stärker exprimiert. Dieses Muster bestätigt sich am zweiten Herzen.

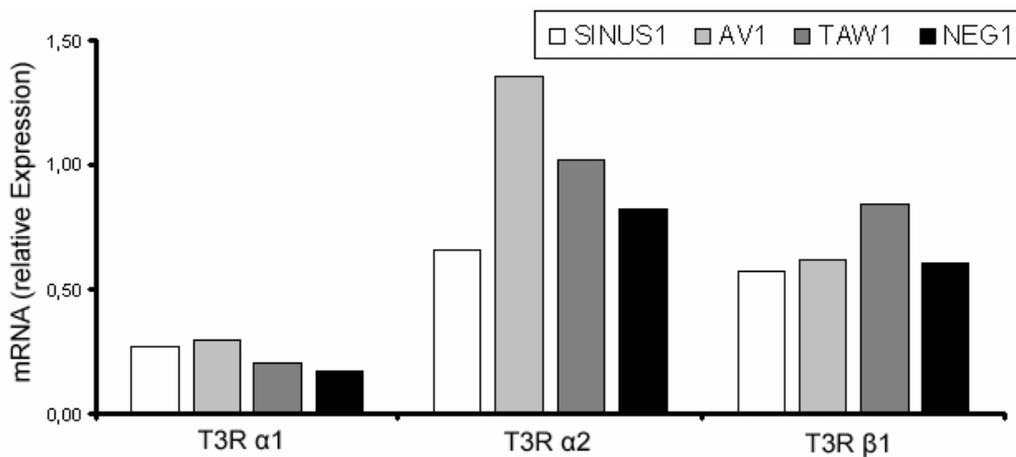


Abb.19a)

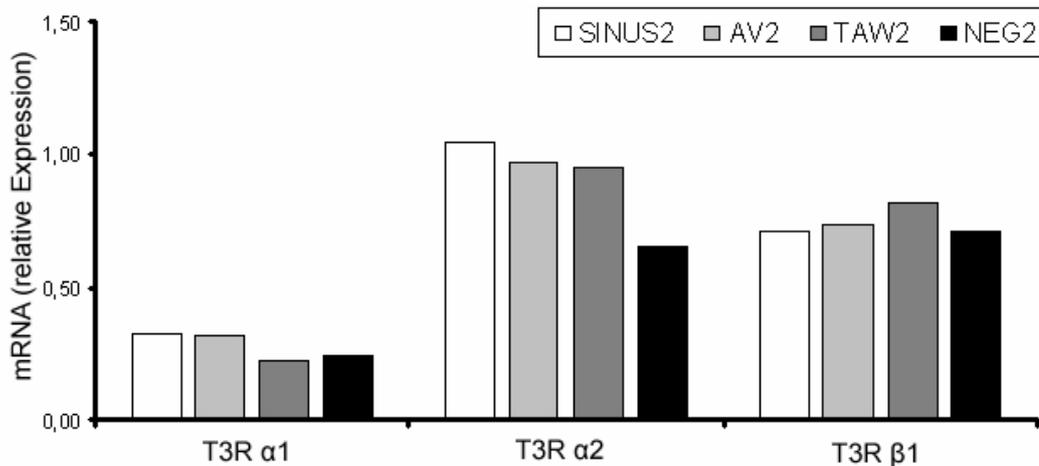


Abb.19b)

Vergleich der T3R α 1, α 2 und β 1 zwischen den wichtigsten Bestandteilen des Reizleitungsystems des Herzens, dem Sinus-Knoten (SINUS1 und 2), AV-Knoten (AV1 und 2), Tawara-Schenkel (TAW1 und 2), außerdem einer Negativkontrolle (NEG1 und 2); mRNA wurde mittels quantitativer rt-PCR gemessen und auf Gs α normiert; jedes präparierte Herz wurde in jeweils einer Abbildung dargestellt; T3R α 2 ist im AV-Knoten des ersten Herzen im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht, mit gleicher Tendenz im zweiten Herzen, jeweils keine Unterschiede beim T3R α 1 und β 1.

5. Diskussion

5.1 Fazit zum Ablauf der quantitativen rt-PCR

Es zeigte sich bei den Auswertungen der Ergebnisse, dass durch die LinReg-Methode kombiniert mit einer Effizienzregel deutlich stabilere und damit glaubwürdigere Werte gewonnen werden können als mit der delta-delta Methode, die sich an Ct-Zahlen orientiert. Die Berechnung der Effizienz jeder einzelnen Probe erlaubt eine viel genauere und individuellere Aussage über Schwankungen und deren Ursachen. Die Ct-Zahlen hingegen zeigen bei Messungen großer Probenmengen über längere Zeiträume große Schwankungen.

Es zeigte sich außerdem, dass für jeden Versuchsaufbau je nach Primer und Gewebe die richtige Verdünnung ermittelt werden sollte, um einen idealen Ablauf der rt-PCR zu gewährleisten. Stärkere Verdünnungen sind dabei tendenziell verlässlicher als schwache Verdünnungen.

Gs α stellte sich in Berechnungen als deutlich konstanter und somit als Housekeeping-Gen verlässlicher heraus und zwar nicht nur beim Herzen, wo auch GAPDH wenig Schwankungen zeigt, sondern insbesondere im Vergleich zu der hier untersuchten Leber. Da die Leber als Vergleichsorgan in die Berechnung mit einging, würden deutliche Unterschiede im Housekeeping-Gen die Ergebnisse verfälschen. Auch bei den durchgeführten Zellkulturexperimenten zeigte sich Gs α konstanter.

Für mögliche weiterführende Vergleichsanalysen an anderen Geweben sollten in diesen Fällen GAPDH und Gs α auf ihre Verwendbarkeit hin geprüft werden und gegebenenfalls weitere Gene auf ihren möglichen Einsatz als Housekeeping-Gene hin untersucht werden.

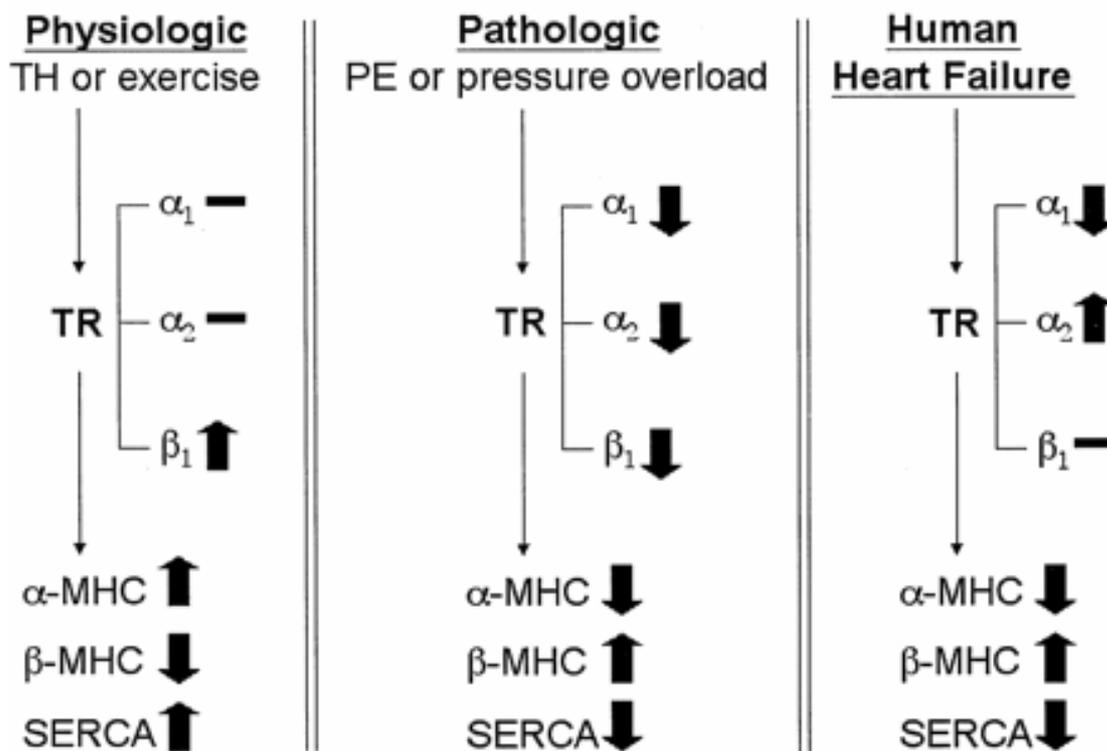
5.2 Fazit zu den Ergebnissen der T3R-Daten

5.2.1 Fazit der Untersuchungen der T3R auf mRNA-Ebene

5.2.1.1 Fazit: T3R $\alpha 2$

Frühere Untersuchungen am Herzen konzentrierten sich auf die Darstellung von Verteilungsmustern der T3-bindenden Rezeptorproteine $\alpha 1$ und $\beta 1$ [27]. Diese zwei T3R am Herzen wurden durch ihre Fähigkeit SDH zu binden als allein bedeutsam für die Wirkung von SDH am Herzen angesehen. Neuere Hypothesen gehen aber von einer ebenso bedeutenden Funktion des nicht-SDH-bindenden T3R $\alpha 2$ bei der Wirkung von T3 am Herzen aus [16, 30]. Die Resultate dieser Studie unterstützen diese Sichtweise.

Der T3R $\alpha 2$ wird **im Herzen im Verhältnis zur Leber** doppelt so stark exprimiert. Dies ist insbesondere verwunderlich, da die Leber ein sehr bedeutsames, SDH umwandelndes Organ darstellt und damit höhere T3R $\alpha 2$ -Werte zu erwarten gewesen waren. Dies bestätigt frühere Untersuchungen, die ebenfalls relativ hohe T3R $\alpha 2$ -Werte im Herzen beschreiben [32]. Dieses Verhältnis spricht für eine Schutzfunktion des T3R $\alpha 2$ am Herzen [30], welches „als eines der T3-responsivsten Organe im Körper“ [17] bezeichnet wird. Die hohen Mengen an exprimierten T3R $\alpha 2$ verhindern die Wirkung der anderen T3R [23], indem sie die TRE-Bindungsstelle besetzt halten **ohne** dort eine Reaktion auszulösen. Der T3R $\alpha 2$ schützt dadurch das Herz vor übermäßiger, durch T3 hervorgerufener Inotropie und Chronotropie. Die niedrigere Rezeptorexpression in der Leber scheint dabei nicht verwunderlich, da die Leber in ihrer eigenen Funktion nicht so sehr von den negativen Auswirkungen einer Hyperthyreose betroffen ist. T3R $\alpha 2$ ist also eine Art Selbstschutz. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch frühere Ergebnisse (Abbildung 6) [16].



Wiederaufnahme der Abb.6: Effekte durch Hypertrophie (physiologisch oder pathologisch) verglichen mit den Effekten durch Herzversagen (heart failure); „physiologische“ Hypertrophie wurde hierbei hervorgerufen durch Schilddrüsenhormonbehandlung (TH) oder körperlicher Arbeit (exercise), „pathologische“ Hypertrophie wurde hervorgerufen durch Überdruckbelastung des linken Ventrikels (pressure overload) oder durch Phenylephrine (PE) in Kultur; Expressionsmuster der T3R α_1 , α_2 und β_1 auf mRNA-Ebene (mittlere Reihe) und Expressionsmuster bedeutender SDH-responsiver Herzproteine (untere Reihe) zeigen charakteristische Anstiege (Pfeil nach oben), Abfälle (Pfeil nach unten) oder keine Veränderungen (Strich) [28].

Bei der „physiologischen“ Hypertrophie kommt es nicht zur Steigerung der Expression von T3R α_2 . In dieser Stoffwechselsituation muss das Herz nicht geschützt werden, da es sich um einen normalen Prozess handelt. Dagegen kommt es bei der „pathologischen“

Hypertrophie zwar zu einem Abfall der Expression des Rezeptortyps, allerdings parallel zu einer Downregulation der anderen beiden Rezeptortypen und dadurch zum Schutz des Herzens durch eine generelle Verminderung der Responsivität für SDH. Beachtenswert ist insbesondere das Expressionsmuster der T3R während des Herzversagens. Bei einer gleich bleibenden Expression von T3R $\beta 1$ kommt es zum Abfall des SDH-wirkungsvermittelnden T3R $\alpha 1$. Um das Herz zu schützen kommt es gleichzeitig zu einem Anstieg des dominant-negativ wirkenden T3R $\alpha 2$. Dies entspricht der bestehenden Hypothese, nach der es bei einer herzgefährdenden T3-Stoffwechsellage zu einer Veränderung in der Prozessierung des Grundtranskripts c-erbA α kommt. Durch alternatives Splicen wird vermehrt T3R $\alpha 2$ und dem entsprechend weniger T3R $\alpha 1$ gebildet [30] um das Herz zu schützen. Auf der anderen Seite kommt es bei einem Absinken des Schilddrüsenhormonspiegels zu einer Regulation des T3R $\alpha 1$ nach oben und zu einem verminderten Spleißen des T3R $\alpha 2$ um die T3-Responsivität zu erhöhen.

In diesem Zusammenhang sollte man auch die Ergebnisse der Experimente mit den **kultivierten Kardioblasten** betrachten. Um zu prüfen, wie weit das Wachstum von Zellen mit einer Veränderung der Expression der T3R einhergeht, wurden die Zellen in verschiedenen Kulturen angezüchtet. In den serumfreien Kulturen wurden die Fibroblasten unter Mangelbedingungen angezüchtet. Deutlich bessere Proliferationsbedingungen bestanden in den Kulturen mit natürlichem Kälberserum beziehungsweise mit dem künstlichen Nährmedium Ultrosor G. In diesen zwei Medien ist in beiden Fällen ein Cocktail aus Hormonen enthalten, der auch bis zu einem gewissen Grad aus T3 besteht. Trotz höchst unterschiedlicher Proliferationsverhältnisse kam es zu keiner Veränderung der T3R-Expression.

Versuche an Kardiomyocyten, wie aktuell von der Forschungsgruppe um Pantos [22], zeigen, dass die Expression der T3R beeinflussbar ist. Die Forscher um Pantos riefen durch Applikation von T3 eine Expressionsänderung seines eigenen Rezeptors T3R $\alpha 1$ hervor. In Zusammenhang mit diesen Ergebnissen könnte man vermuten, dass die Kardiomyocyten, entsprechend der Kardiomyocyten von Pantos und seinem Team, höhere T3-Spiegel benötigen, um ihre T3R-Expression zu verändern, das also die unterschiedlichen Stoffwechsellagen nicht für eine Änderung der Expression ausreichen. Die wahrscheinlichere Erklärung für die fehlende Expressionsänderung in den Kardiomyocyten ist allerdings, dass diese ihre T3R-Expression grundsätzlich nicht verändern, da ihre Funktionen nicht oder nur in sehr geringem Maße von T3 beeinflusst werden. In diesem Fall wären die in früheren Experimenten am gesamten Herzen gemessenen Veränderungen der T3R-Expression alleine auf die Kardiomyocyten zurückzuführen. Aufgrund der Areaktivität der Kardiomyocyten unter den hier verwendeten Kulturmodellen wurde auf weitere Versuchsreihen mit höheren T3-Konzentrationen verzichtet, da diese wenig erfolgsversprechend scheinen.

Im Vergleich der T3R der Kardiomyocyten mit nativen Kardiomyocyten zeigte sich, dass der T3R $\alpha 2$ auf mRNA-Ebene in den Kardiomyocyten im Vergleich zu den Kardiomyocyten niedriger exprimiert wird (Abbildung 15). Dies kann damit erklärt werden, dass die Kardiomyocyten nicht im besonderen Maße geschützt werden müssen. Sie haben eine niedrigere Stoffwechselaktivität, eine passive Stützfunktion, keine Wirkung auf die Ino- und Chronotropie am Herzen und sind, wie die Kulturen vermuten lassen, auch areaktiv für T3. Dies ist an sich eine weitere Bestätigung für die Hypothese, die im T3R $\alpha 2$ eine Schutzfunktion des Herzens sieht. Die Ergebnisse auf Proteinebene lassen jedoch noch eine andere Interpretation zu und werden später genauer diskutiert (5.2.2.1).

Betrachtet man **die Ergebnisse der Herzkompimente** (Abbildung 13), so zeigt sich, dass der „schützende“ T3R $\alpha 2$ sich nicht ubiquitär über das Herz verteilt. Es findet sich eine signifikant höhere Expression im linken Ventrikel im Vergleich zum rechten Ventrikel. Das linke Kompartiment ist in seiner Pumpfunktion durch die hohe Belastung im Hochdrucksystem besonders gefordert, aber dadurch auch eher gefährdet, überbeansprucht zu werden. Ein besonderer Schutz ist also sinnvoll.

Proben der linken Atrii wurden als Beispiel für beide Vorhöfe entnommen, da in beiden Vorhöfen ähnliche Druckgradienten bestehen. In diesem Experiment ergaben sich allerdings im linken Vorhof im Vergleich mit dem linken Ventrikel ähnliche Expressionsmuster, obwohl im linken Vorhof ein deutlich niedriger Druck herrscht. Für dieses Phänomen könnte eine Art Schutzmechanismus gegen eine zu starke Steigerung der Herzfrequenz eine Rolle spielen, auch um damit Herzrhythmusstörungen, insbesondere Vorhofflimmern, zu vermeiden. Da das Vorhofflimmern deutlich häufiger auftritt als die ventrikulären Arrhythmien, sind derartige Unterschiede in der Expression des „hemmenden“ T3R $\alpha 2$ -Rezeptors nicht verwunderlich. Die hohen Werte in den Atrii könnten für eine basal erhöhte Regulation gegen die erhöhte Arrhythmiegefahr in den Vorhöfen sprechen. Neuere Studien sehen an den Mündungen der Pulmonalvenen in die Vorhöfe die Hauptquelle für Vorhofflimmern. T3R-Quantifizierungen an den Pulmonalvenen wären sinnvoll. Sollten dort differente T3R-Expressionsmuster gefunden werden, könnten diese einen Ko-Faktor für die erhöhte Arrhythmiegefahr darstellen.

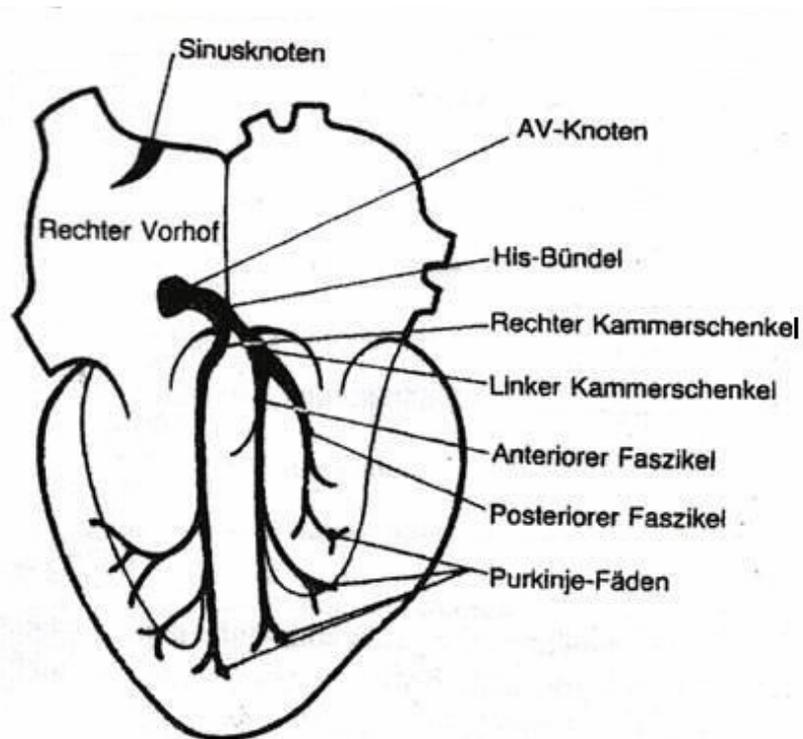
Eine weitere Möglichkeit die Verteilung der T3R-Expression innerhalb der verschiedenen Kompartimente zu erklären, ist eine Aktivierung der T3R-Expression durch das erhöhte O_2 -Vorkommen im Endokard und der inneren Myokardschichten. Der Grund hierfür wäre das im linken Ventrikel und Atrium vorhandene O_2 -reiche Blut. Im Gegensatz dazu käme es im rechten Ventrikel durch das dort vorhandene O_2 -ärmere Blut zu einer geringeren

Aktivierung. Weitere Untersuchungen des bisher vernachlässigten rechten Atriums sollten folgen. Nach dieser Theorie wäre dort ein T3R-Expressionsmuster wie im rechten Ventrikel zu erwarten.

Zusammengefasst lassen die hier erstmalig erhobenen Ergebnisse der T3R-Verteilung des Herzens Raum für mehrere Theorien. Mit den oben erwähnten nachfolgenden Experimenten kann man von einer baldigen Aufklärung dieser Sachlage ausgehen.

Abschließend wurden auch erste **Untersuchungen am Reizleitungssystem** durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine tendenziell höhere Expression des T3R $\alpha 2$ im AV-Knoten. Dies wäre durch die Wächterfunktion des AV-Knotens zu erklären. Die vom Sinusknoten kommende Erregung wird während der Überleitung am AV-Knoten gehemmt. Möglicherweise kann er durch diese T3R-Verteilung bei einer durch Hyperthyreose hervorgerufene Tachykardie wenigstens zum Teil chronotrop hemmend und dadurch kompensiert wirken.

Dass der T3R $\alpha 2$, wie oben erwähnt, als erste Rezeptorisoform während der Entwicklung erscheint, spricht ebenfalls für die besondere Bedeutung dieser Isoform. Eine übermäßige Wirkung von SDH am Herzen und eine damit verbunden Überlastung soll damit von vorneherein verhindert werden [13].



Wiederaufnahme der Abb.7: Aufbau des Reizleitungssystems am Herz.

5.2.1.2 Fazit: T3R $\alpha 1$

Bei der Untersuchung des T3R $\alpha 1$ ergaben sich in den hier durchgeführten vergleichenden Untersuchungen auf mRNA-Ebene keine spezifischen Unterschiede (Abbildungen 13-16 und 19).

Nach der Hypothese des Forscherteams um Timmer reagiert dieser Rezeptor primär auf Änderungen des T3-Spiegels im Blut [30]. Änderungen der T3R $\alpha 1$ -Werte innerhalb verschiedener Gewebe sind also möglicherweise nur durch T3-Gabe zu erkennen. Die aktuellen Ergebnisse von Pantos und seinem Team [22] zeigen diese Induktion des T3R $\alpha 1$ durch T3. Im Rahmen von Untersuchungen an hypo- und hyperthyreoten Versuchstieren könnte diese flexible T3R-Expression als Reaktion auf verschieden hohe T3-Spiegel weiter untersucht werden.

Das Team um Vennström beschreibt in seinen Versuchen an Ratten den T3R $\alpha 1$ als wichtigsten Regulator des Herzens, insbesondere für von diesem regulierte herzspezifische Proteine [19]. Der T3R $\alpha 1$ wird aber in der Leber ebenso stark exprimiert wie im Herzen, was die Herzspezifität zumindest in Frage stellt. In diesem Zusammenhang muß nochmals erwähnt werden, dass das von uns verwendete Schwein als Untersuchungsobjekt, durch die größere Homologie mit menschlichem Gewebe Ergebnisse produziert, die den am Menschen gewonnene Ergebnisse eher entsprechen. Diese könnte mögliche, auf Rattenmodelle basierende Fehlinterpretationen aus der Vergangenheit erklären.

5.2.1.3 Fazit: T3R $\beta 1$

Wichtig für die Wirkungszusammenhänge der T3R ist neben dem Verhältnis der T3R $\alpha 1$ und $\alpha 2$ auch deren Zusammenspiel mit dem T3R $\beta 1$. Während T3R $\alpha 1$ auf Veränderungen des Schilddrüsenhormonspiegels im Blut reagiert, ist der T3R $\beta 1$ für die basale Funktion der SDH am Organ wichtig [33]. Ebenso wie auch beim T3R $\alpha 1$, wird die Wirkung des T3R $\beta 1$ vom T3R $\alpha 2$ durch dessen Interaktion mit den TRE gehemmt.

Am Herzen besteht ein Gleichgewicht zwischen dem wirkungsvermittelnden T3R $\beta 1$ und dem hemmenden T3R $\alpha 2$, dementsprechend zeigte sich für den T3R $\beta 1$ innerhalb des Herzens ein ähnliches Muster beim T3R $\alpha 2$. In den aktiveren Teilen des Herzens sind die T3R $\beta 1$ -Rezeptoren stärker exprimiert. Seien es in den Kardiomyocyten im Vergleich zu den Kardiofibroblasten oder, eine Ebene darüber, im linken Ventrikel gegenüber dem rechten Ventrikel.

Die aktivierende Wirkung von SDH wird im linken Ventrikel, speziell an den Kardiomyocyten, mehr gebraucht und über den hoch exprimierten T3R $\beta 1$ auch stärker vermittelt. Im Atrium zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Menge an T3R $\beta 1$. Dies könnte

einen Teil der Erklärung für die erhöhte Arrhythmiebereitschaft darstellen, da die SDH über T3R β 1 stärker am Atrium wirken.

5.2.2 Fazit der Untersuchungen der T3R auf Proteinebene

Zur Validierung der auf mRNA-Ebene entstandenen Thesen wurden in vielen Veröffentlichungen zusätzliche Untersuchungen spezifischer Proteine gefordert. Deshalb wurden in dieser Doktorarbeit die Proben mittels Western Blot auch auf Proteinebene untersucht, um damit die Ergebnisse auf mRNA-Ebene zu untermauern. Die dabei verwendeten Antikörper wurden zum Teil käuflich erworben (Antikörper für T3R β 1), zum Teil von der Arbeitsgruppe um O. Bakker zur Verfügung gestellt (Antikörper für T3R α 1 und α 2).

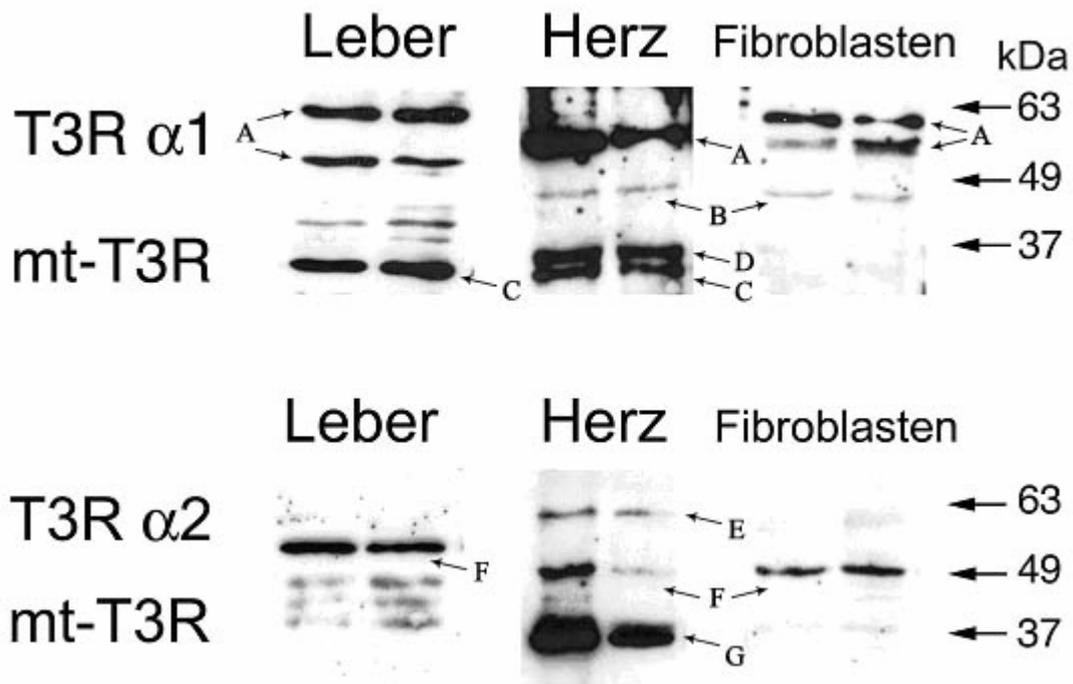
5.2.2.1 Fazit: T3R α 2

In den Blots des T3R α 2 (Abbildung 17a) zeigt sich auf der beschriebenen Höhe für den T3R α 2 bei 58 kDa im Herz eine Bande (E). Dies passt zu den mRNA-Ergebnissen, die ja auch ein höheres Vorkommen von T3R α 2 im Herzen im Vergleich zur Leber sehen.

Die Banden auf Höhe von 50 kDa beziehungsweise 55 kDa (F) in allen Geweben sind dagegen auffällig. In der Literatur werden verschiedene Modifikationsmöglichkeiten für Proteine, insbesondere die Phosphorylierung und die Glykosylierung, beschrieben. Posttranslatorische Prozessierungen wären eine Erklärung für die Proteine in dieser ungewöhnlichen Größenordnung. Über die Bedeutung dieser modifizierten Formen lässt sich bis zu diesem Punkt noch nichts sagen.

Weiterhin zu beachten ist die nicht zu übersehende intensive Bande im Herzen bei 37 kDa (G). Wie oben erwähnt, sind für den T3R α 2 mehrere mitochondriale Isoformen in ähnlicher Größenordnung beschrieben. Diese Bande stellt also höchstwahrscheinlich den

mitochondrialen T3-Rezeptor dar. Da dieser sich nur im Herzen nachweisen lässt, könnte dies für eine wichtige Bedeutung dieses Rezeptors im Herzen sprechen und umso mehr die hohen T3R $\alpha 2$ -mRNA-Mengen in der rt-PCR erklären.



Wiederaufnahme der Abb.17a): Proteinanalyse der T3R $\alpha 1$ und $\alpha 2$ in den Geweben Leber, Herz (insbesondere aus Kardiomyocyten bestehend) und Kardiofibroblasten; Doppelbestimmung der Proteinmengen bei zwei verschiedenen Proben, dargestellt als doppelte Bande; Proteine aus Gesamtzelllysaten wurden mittels Western Blot-Verfahren analysiert, kDa definiert durch die verwendete BenchmarkTM Pre-Stained protein ladder; mt-T3R=mitochondriale T3R; im T3R $\alpha 1$ -Blot: bei 47 kDa für den Rezeptor beschriebene Banden im Gesamtherz und in Kardiofibroblasten (B), zusätzlich fünf Banden in allen drei Geweben in verschiedenen Größen zwischen 50 und 63 kDa (A), mitochondriale Rezeptorbanden bei 28 kDa in Herz und Leber (C), außerdem eine zusätzliche, wahrscheinlich modifizierte mitochondriale Bande im Herzen bei 37 kDa (D); im T3R $\alpha 2$ -Blot: bei 58 kDa eine für den Rezeptor beschriebene Bande im Herz (E), zusätzlich Banden bei 50 kDa in Herz und Fibroblasten und 55 kDa in der Leber (F), mitochondriale Rezeptorbande im Herz bei 37 kDa (G).

5.2.2.2 Fazit: T3R α 1

Im Blot für T3R α 1 zeigen sich, wie in der Literatur beschrieben, Banden für den T3R α 1 im Bereich von 47 kDa (B). Sie sind vor allem im gesamten Herzen und den Kardiofibroblasten zu sehen, was allerdings nicht den Verteilungen der in dieser Arbeit gewonnenen mRNA-Ergebnisse entspricht. Diese zeigen in der Leber ähnliche Mengen an T3R α 1 wie im Herzen auf. In den Kardiofibroblasten dagegen ist deutlich weniger T3R α 1-mRNA vorhanden als in den Kardiomyocyten.

Zusätzlich sieht man überraschenderweise auch deutliche Banden bei 50-63 kDa (A). Insbesondere die Phosphorylierung ist für T3R beschrieben [31]. Lui Cheng, Mitverfasser der Studie [31], hält in einer persönlichen Stellungnahme eine Modifizierung der Rezeptoren und dadurch deren Verlängerung auf 50-60 kDa mittels Phosphorylierung und Glykosylierung für möglich. Möglicherweise sind diese Modifikationen auch mit Ursache für die Veränderungen der in den rt-PCR-Untersuchungen gefundenen Mengenverhältnisse.

Für den T3R α 1 ist wie für den T3R α 2 eine mitochondriale Form beschrieben [12, 31]. Diese ist im T3R α 1-Blot nur in der Leber und im Herz exprimiert. Diese zwei Gewebe benötigen, im Gegensatz zu den Kardiofibroblasten, die Energie des mitochondrialen Stoffwechsels für ihre Funktion in besonderem Maße. Beschrieben sind insbesondere die mitochondrialen T3R bei 28 kDa (C), die zusätzliche Bande bei 37 kDa im Herzen (D), wie beim T3R α 2 stellt höchstwahrscheinlich eine Modifikation des mitochondrialen T3R dar.

5.2.2.3 Fazit: T3R β 1

Der mit käuflich erworbenem Antikörper hergestellte Blot für den T3R β 1 zeigt das eindeutigste Bild (Abbildung 17b). In allen drei Geweben zeigten sich Banden allein auf

Höhe des beschriebenen Rezeptors. Wie im Blot für den T3R $\alpha 1$ zeigt sich auch beim T3R $\beta 1$, im Einklang mit den mRNA-Ergebnissen, kein signifikanter Unterschied zwischen Leber und Herz.

Interessant ist aber, dass nach diesem Blot der T3R $\beta 1$ am meisten in den Kardiofibroblasten exprimiert wird. Diese besitzen aber, nach den mRNA-Analysen, am wenigsten T3R $\beta 1$. Nach Versuchsergebnissen des Forscherteams um White mit Kardiomyocyten reagieren kultivierte Zellen im Gegensatz zu nativen Zellen auf die Behandlung mit SDH mit einem Abfall der β -Transkript-mRNA [32]. Dieser Sachverhalt bei kultivierten Zellen lässt nur eine eingeschränkte Wertbarkeit der Ergebnisse auf β -Transkript mRNA-Ebene bei der Interpretation der Funktion der T3R in vivo zu. Im Gegensatz zu der mRNA reagieren Proteine außerdem deutlich langsamer auf Veränderungen. Diese beiden Gründe sprechen dafür, dass die Ergebnisse auf Proteinebene als bedeutsamer und verlässlicher anzusehen sind.

Die höheren Werte von T3R $\beta 1$ in den Kardiofibroblasten könnten sich damit erklären lassen, dass das Gewebe Herz, dort vor allem die Kardiomyocyten, und das Gewebe Leber schneller auf Veränderungen des Schilddrüsenhormonspiegel reagieren müssen, von dem sie wesentlich stärker abhängig sind. Wahrscheinlich wird die Wirkung von SDH bei diesen Geweben mehr über das α -Transkript reguliert, das über alternatives Spleißen bei Bedarf entweder höhere Menge an T3R $\alpha 1$ oder T3R $\alpha 2$ erzeugt, um die Wirkung von SDH effizient zu verstärken oder zu vermindern.

5.3 Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT 10

Die deutlich höhere Expression des MCT8 in der Leber im Vergleich zum Herzen spricht für eine besondere Funktion dieses Transporters in der Leber. Bedenkt man, dass die Leber in hohem Maße intrazelluläres T4 in systemisch wirksames T3 umzuwandelt, wird dies

nachvollziehbar. Für diese Funktion ist ein erhöhter Schilddrüsenhormontransport nötig. Außerdem wird ja, wie oben erwähnt, LAT1 als wichtiger Schilddrüsenhormontransporter in der Leber nicht exprimiert [6], so dass alternative Wege genommen werden müssen. Auf der anderen Seite ist es für das Herz als sehr T3-sensibles Organ auch wichtig nicht zu viel Hormon in die Zellen aufzunehmen, um eine zu starke Aktivierung zu vermeiden.

Interessant wären sich an diese Experimente anschließende quantitative Analysen von kaum SDH-responsiven Organen wie Kardiofibroblasten, um die Menge in den bisher untersuchten Organen zu relativieren. Außerdem wären Vergleiche der Expression in den verschiedenen Kompartimenten des Herzens und auch im Reizleitungssystem des Herzens sinnvoll.

Die am MCT10 beschriebene Fähigkeit des hochaffinen T3-Auswärtstransportes ist in dieser Ausprägung bisher für keinen anderen Schilddrüsenhormontransporter beschrieben [2]. T4 wird vor allem in der Leber in T3 umgewandelt. Deshalb muss durch den MCT10 auch ein ausreichender T3-Abtransport in die Blutbahn sichergestellt werden. In der Leber ist der MCT10 ebenfalls stärker exprimiert als im Herzen und kann damit den Abtransport von T3 sicherstellen um eine lokale Akkumulation zu verhindern.

Es werden im Moment vergleichende Experimente am MCT8 und MCT10 zwischen Organen auf Proteinebene von der Arbeitsgruppe um Friesema durchgeführt. Diese Ergebnisse könnten den auf mRNA-Ebene festgestellten Unterschied zwischen Leber und Herz bestätigen.

5.4 Klinischer Ausblick

Bereits früh konnten klinische Studien die positiv inotrope Wirkung von T3 am Herzen zeigen [11, 20]. Dies führte zu ersten Versuchen, T3 in der Behandlung von Herzversagen einzusetzen, welche anfangs auch vielversprechend erschienen. Eine parallel dazu stattfindende Steigerung des Sauerstoffverbrauchs, nicht nur im Herzen, sondern ebenso auch im restlichen Körper, verhinderten eine entscheidende Verbesserung der Prognose [17]. Dies hat die Erwartungen stark sinken lassen. Gezielter ansetzende Medikamente wie T3-Analoga könnten hier vielleicht in Zukunft zu einer neuen Behandlungsoption führen: zum Beispiel könnte mit einem selektiven T3R α 1-Agonisten der erhöhte Sauerstoffverbrauch vermieden werden und dadurch eine spezifischere Behandlung ermöglichen. Dies gilt insbesondere für eben jene Patienten mit Herzversagen [17]. Um diesen Behandlungsansatz in Erwägung zu ziehen, braucht man aber noch ein tieferes Verständnis von der Funktion und Wirkung der kardialen Regulationsmechanismen. Weitere Versuche sind also nötig, um ein besseres Verständnis der T3-Wirkung zu erhalten.

6. Zusammenfassung

Schilddrüsenhormon (SDH)- regulierte Gene sind essentiell für die Funktion des Herzen. Die von ihnen kodierten Proteine sind an der Ausprägung der Kontraktilität, Muskelmasse und Herzfrequenz beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wird daher die SDH- kontrollierte Genexpression in Zusammenhang mit den Schilddrüsenhormonrezeptoren (T3R) $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\beta 1$ sowohl in den Herzkompartimenten und dem Reizleitungssystem wie auch in den zwei wichtigsten, völlig unterschiedlichen Herzzelltypen, den Kardiomyocyten und den Kardiofibroblasten untersucht. Zum Vergleich wurde die T3R-Genexpression in der Leber gemessen.

Das T3R-Profil wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer realtime-PCR und auf Proteinebene mittels monoklonaler Antikörper untersucht. Für die Untersuchungen wurden ein in vivo Modell am Schwein und ein Zellkulturmodell verwendet und sorgfältig adaptiert.

In allen untersuchten Geweben wurden T3R α - und β -Transkripte gefunden. Überraschend waren die ähnlichen Expressionsmengen der T3R $\alpha 1$ und $\beta 1$ in Herz- und Lebergewebe auf mRNA-Ebene, wohingegen der T3R $\alpha 2$ in Herzgewebe deutlich mehr vorhanden war als in Lebergewebe. Auch konnte gezeigt werden, dass im linken Ventrikel mehr T3R $\alpha 2$ und $\beta 1$ gebildet wird als im rechten Ventrikel.

Auf Proteinebene unterschieden sich die T3R α nicht unbedingt in der Quantität als vielmehr durch die zum Teil sehr unterschiedlichen Längen der jeweiligen Rezeptor-Proteine. Besonders bemerkenswert waren die unterschiedlichen Proteinlängen von T3R $\alpha 1$ im Vergleich von Herz- und Lebergewebe.

Zur Differenzierung des Herzmuskelgewebes wurden die Kardiomyocyten und – fibroblasten von einander isoliert. Die Kardiofibroblasten unterschieden sich dabei von den Kardiomyocyten im Wesentlichen durch die deutlich niedrigere T3R $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -

Expression auf mRNA-Ebene, aber deutlich höhere Expression des T3R β 1 auf Proteinebene.

Außerdem wurden Kardiofibroblasten unter verschiedenen Bedingungen angezchtet und zum Proliferieren angeregt. Neben einem Nährmedium ohne physiologisches Serum, welches einer hormonellen Mangelsituation entspricht, wurden zwei verschiedene Nährmedien mit verschiedenen Hormoncocktails verwendet. Es zeigte sich dabei in den kultivierten Kardiofibroblasten keine Änderung im Expressionsmuster. Änderungen der T3R-Genexpression des ganzen Herzgewebes spiegeln also höchstwahrscheinlich allein Änderungen in den Kardiomyozyten wieder.

Der Aufnahme und gewebespezifischer Konvertierung von SDH kommt möglicherweise eine hohe biologische Bedeutung zu. Zum besseren Verständnis der Wirkung von SDH am Herzen wurden die gerade entdeckten SDH-Transporter: MCT8 und MCT10 untersucht. Diese werden, wie erwartet, im Herzen exprimiert, wenn auch deutlich weniger als in der Leber, als bedeutendes SDH-umsetzendes Organ.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse deutlich für den T3R α 2 als einen für das Herz typischen Rezeptor. Erstmals konnte in dieser Studie die bereits auf mRNA-Ebene beschriebene T3R α 2-Dominanz durch Ergebnisse auf Proteinebene bestätigt werden. Überraschenderweise zeigte sich dabei eine deutlich stärkere Lokalisation des Rezeptor-Proteins in den Mitochondrien im Vergleich zum Nukleus. Zukünftige Untersuchungen zu der Rolle des T3R α 2 im Energiestoffwechsel des Herzen durch Steuerung der mitochondrialen Aktivität erscheinen daher vielversprechend.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abe T, Suzuki T, Unno M, Tokui T, Ito S** 2002 Thyroid hormone transporters: recent advances. *Trends Endocrinol Metab* 13:215-220
2. **Bassett JH, Harvey CB, Williams GR** 2003 Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 213:1-11
3. **Blondeau JP, Osty J, Francon J** 1988 Characterization of the thyroid hormone transport system of isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 263:2685-2692
4. **d'Amati G, di Gioia CR, Mentuccia D, Pistilli D, Proietti-Pannunzi L, Miraldi F, Gallo P, Celi FS** 2001 Increased expression of thyroid hormone receptor isoforms in end-stage human congestive heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2080-2084
5. **Eschenhagen T, Mende U, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R, Warnholtz A, Wustel JM** 1991 Beta-adrenoceptor stimulation-induced increase in cardiac Gi-protein expression and in carbachol sensitivity. *Eur Heart J* 12 Suppl F:127-131
6. **Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Verrey F, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ** 2001 Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology* 142:4339-4348
7. **Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ** 2003 Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278:40128-40135
8. **Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ** 2004 Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 364:1435-1437
9. **Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ** 2008 Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol* 22:1357-1369
10. **Haddad F, Qin AX, McCue SA, Baldwin KM** 1998 Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state. *Am J Physiol* 274:E1018-1026
11. **Hamilton MA, Stevenson LW, Fonarow GC, Steimle A, Goldhaber JL, Child JS, Chopra IJ, Moriguchi JD, Hage A** 1998 Safety and hemodynamic effects of intravenous triiodothyronine in advanced congestive heart failure. *Am J Cardiol* 81:443-447

12. **Harper ME, Seifert EL** 2008 Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid* 18:145-156
13. **Hsu JH, Brent GA** 1998 Thyroid hormone receptor gene knockouts. *Trends Endocrinol Metab* 9:103-112
14. **Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, Enomoto A, Cha SH, Goya T, Endou H** 2002 The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics* 79:95-103
15. **Kinugawa K, Long CS, Bristow MR** 2001 Expression of TR isoforms in failing human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5089-5090
16. **Kinugawa K, Yonekura K, Ribeiro RC, Eto Y, Aoyagi T, Baxter JD, Camacho SA, Bristow MR, Long CS, Simpson PC** 2001 Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res* 89:591-598
17. **Klein I, Ojamaa K** 2001 Thyroid hormone-targeting the heart. *Endocrinology* 142:11-12
18. **Lazar MA** 1993 Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 14:184-193
19. **Mansen A, Yu F, Forrest D, Larsson L, Vennstrom B** 2001 TRs have common and isoform-specific functions in regulation of the cardiac myosin heavy chain genes. *Mol Endocrinol* 15:2106-2114
20. **Moruzzi P, Doria E, Agostoni PG** 1996 Medium-term effectiveness of L-thyroxine treatment in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Med* 101:461-467
21. **Muscat GE, Downes M, Dowhan DH** 1995 Regulation of vertebrate muscle differentiation by thyroid hormone: the role of the myoD gene family. *Bioessays* 17:211-218
22. **Pantos C, Xinaris C, Mourouzis I, Perimenis P, Politi E, Spanou D, Cokkinos DV** 2008 Thyroid hormone receptor alpha1: a switch to cardiac cell "metamorphosis"? *J Physiol Pharmacol* 59:253-269
23. **Portman MA** 2008 Thyroid hormone regulation of heart metabolism. *Thyroid* 18:217-225
24. **Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF** 2003 Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339:62-66
25. **Samson M, Osty J, Francon J, Blondeau JP** 1992 Triiodothyronine binding sites in the rat erythrocyte membrane: involvement in triiodothyronine transport and relation to the tryptophan transport System T. *Biochim Biophys Acta* 1108:91-98

26. **Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B** 1986 The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324:635-640
27. **Schwartz HL, Strait KA, Ling NC, Oppenheimer JH** 1992 Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J Biol Chem* 267:11794-11799
28. **Sussman MA** 2001 When the thyroid speaks, the heart listens. *Circ Res* 89:557-559
29. **Tata JR, Widnell CC** 1966 Ribonucleic acid synthesis during the early action of thyroid hormones. *Biochem J* 98:604-620
30. **Timmer DC, Bakker O, Wiersinga WM** 2003 Triiodothyronine affects the alternative splicing of thyroid hormone receptor alpha mRNA. *J Endocrinol* 179:217-225
31. **Ting YT, Bhat MK, Wong R, Cheng S** 1997 Tissue-specific stabilization of the thyroid hormone beta1 nuclear receptor by phosphorylation. *J Biol Chem* 272:4129-4134
32. **White P, Burton KA, Fowden AL, Dauncey MJ** 2001 Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. *Faseb J* 15:1367-1376
33. **White P, Dauncey MJ** 1999 Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development. *J Mol Endocrinol* 23:241-254
34. **Yen PM** 2001 Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097-1142
35. **Zandieh-Doulabi B, Dop E, Schneiders M, Schiphorst MP, Mansen A, Vennstrom B, Dijkstra CD, Bakker O, Wiersinga WM** 2003 Zonal expression of the thyroid hormone receptor alpha isoforms in rodent liver. *J Endocrinol* 179:379-385

8. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Seitz für die Geduld, Unterstützung und die vielen Anregungen während der Doktorarbeit bedanken. Ebenso gilt mein Dank auch meinem Betreuer Dr. Karim Sultan für die Erarbeitung der Fragestellung, die vielfältige Hilfe und die anregenden Diskussionen. Dr. Karim Sultans damalige technische Assistentin und Mitarbeiterin Birgit Henkel möchte ich hier erwähnen und ihr für die Unterweisung in den verschiedenen Versuchstechniken und die gute und liebevolle Zusammenarbeit danken. Auch die anderen Mitarbeiter des Labors haben mir bei meiner Arbeit viel geholfen.

Großer Dank gilt Herrn Onno Bakker und seinem Team der Abteilung Endokrinologie an der Universität Amsterdam für die Bereitstellung der Antikörper und die fruchtbare Zusammenarbeit während der Treffen in Amsterdam und Hamburg. Bei Herrn Prof. Dr. Davidoff, Professor an der anatomischen Abteilung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich mich für die Hilfe bei der Präparation des kardialen Herzleitungssystems bedanken. Das Graduiertenkolleg GRK-336: „Molekulare Endokrinologie -Molekularer Stoffwechsel“ hat mich vielfältig unterstützt, insbesondere bei der wissenschaftlichen Weiterbildung und der Finanzierung meiner Experimente und der Kongressteilnahme.

Ich möchte außerdem allen danken, die nach meinem schweren Unfall gegen Ende meiner Arbeit für mich da gewesen sind und mir geholfen haben, diese schwere Phase zu überwinden. Insbesondere meine Familie hat mir dabei immer wieder viel Kraft gegeben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Niklas Sebastian Weber
Anschrift: Eifflerstr.3, 22769 Hamburg
Geburtstag: 07.05.1981
Geburtsort: Heidelberg
Email: niklas.weber@gmx.net

Bildungsweg

1987-1990 Besuch der Fröbelschule (**Grundschule**), Heidelberg
1990-1991 Besuch der Stirumschule (**Grundschule**), Bruchsal
1991-2000 Besuch des Justus-Knecht-**Gymnasiums** Bruchsal und **Abitur** mit Note 1,9
2000/2001 **Zivildienst** im Krankentransport/Rettungsdienst bei der Malteser e.V. Wiesloch-Walldorf mit der Ausbildung als **Rettungshelfer**
2001-2008 Studium der **Medizin** im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Famulaturen

- **Nephrologie** im **Wilhelminenspital**, Wien, Österreich
- **Medizinische Notaufnahme** im **Hôpital St. André**, Bordeaux, Frankreich
- **Viszeralchirurgie** im **Hôpital St. André**, Bordeaux, Frankreich
- **Orthopädie und Chirotherapie** in der **Praxis Dr. Kurz**, Sigmaringen

Auslandsaufenthalte und Praktika

- 12-monatiger **Gastaufenthalt an der Universität Bordeaux**, Frankreich mit dem Austauschprogramm ERASMUS

Praktisches Jahr

- 1.Tertial:** **Wahlfach: Anästhesie** im **Hôpital Pellegrin**, Bordeaux, Frankreich
2.Tertial: **Chirurgie** in der **Asklepios Klinik St. Georg**, Hamburg
3.Tertial: **Innere Medizin** in der **Asklepios Klinik Altona**, Hamburg

2008 **2. Ärztliche Prüfung und Abschluss des Medizinstudiums** mit Note 2,0
(mündliche Note: 2, schriftliche Note: 2)

2008 **Erteilung der Approbation**

Soziales Engagement während des Studiums:

2002-2004 Arbeit im **Fachschaftratsrat** der Universität Hamburg, medizinische Fakultät

10. Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: Niklas Weber.....