

Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung des equinen Thyroxin-bindenden Globulins

NINA SKUBELLA

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

**Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger

und

**dem Zentrum für Innere Medizin,
Klinik für Endokrinologie, Universität Duisburg-Essen**

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. O. E. Janßen

**MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE
CHARAKTERISIERUNG DES EQUINEN
THYROXIN-BINDENDEN GLOBULINS**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

NINA SKUBELLA

Tierärztin aus Würzburg

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. R. Gerstberger

Priv.-Doz. Dr. O. E. Janßen

Tag der Disputation: 20.12.2005

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 EINFÜHRUNG	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 DAS PFERD	2
2.1.1 Entwicklungsgeschichte des Pferdes	2
2.1.2 Systematik der Perissodactyla	4
2.1.3 Charakteristika der Perissodactyla	5
2.1.4 Geschichte der Systematik	6
2.2 DIE SCHILDDRÜSE DES PFERDES	9
2.2.1 Embryonale Entwicklung	9
2.2.2 Makroskopische Anatomie	10
2.2.3 Mikroskopische Anatomie	11
2.2.4 Physiologie der Schilddrüse	12
2.3 SCHILDDRÜSENERKRANKUNGEN DES PFERDES	14
2.3.1 Hypothyreose	14
2.3.2 Hyperthyreose	15
2.3.3 Altersbedingte Veränderungen	15
2.4 SCHILDDRÜSENHORMONTRANSPORT IM BLUT	16
2.4.1 Albumin	16
2.4.2 Transthyretin	17
2.4.3 Thyroxin-bindendes Globulin	17
2.4.3.1 Physikochemische Eigenschaften des TBG	17
2.4.3.2 Serumkonzentration von Schilddrüsenhormonen bei Tieren	18
2.4.3.3 Charakterisierung animalischer TBG-Varianten	19
2.4.3.4 Die Konzentration von TBG im menschlichen Serum	21
2.4.3.5 Serpine	22
2.5 FRAGESTELLUNG	23

3	MATERIAL, GERÄTE UND METHODEN	25
3.1	MATERIAL	25
3.1.1	Chemikalien	25
3.1.2	Enzyme	25
3.1.3	Radioisotope	26
3.1.4	Nukleotide/Oligonukleotide	26
3.1.5	DNA Größen	26
3.1.6	Kits	26
3.1.7	Proteine	27
3.1.8	Seren/Probenmaterial	27
3.2	GERÄTE	28
3.3	METHODEN	29
3.3.1	Proteinbiochemische Methoden	29
3.3.1.1	T ₄ -Bindungstest	29
3.3.1.2	Kompetitiver Verdrängungsassay nach Scatchard	32
3.3.1.3	Hitzenaturierung	37
3.3.2	Molekularbiologische Methoden	38
3.3.2.1	Isolierung von genomischer DNA aus EDTA- Blut	38
3.3.2.2	Konzentrationsbestimmung von DNA über die optische Dichte	39
3.3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	39
3.3.2.4	Aufreinigung der PCR-Produkte	40
3.3.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA auf Agarose-Gelen	41
3.3.2.6	RNA-Isolierung aus Gewebe	42
3.3.2.7	c-DNA-Synthese	43
3.3.2.8	Sequenzierung	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	LABORCHEMISCHE UND PROTEINBIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES TBG BEI DEN PERISSODACTYLA	44
4.1.1	Schilddrüsenhormonparameter	44
4.1.2	T ₄ -Bindungstest	45
4.1.3	Kompetitiver Verdrängungsassay nach Scatchard	46
4.1.4	Analyse der Hitzestabilität von TBG der Hippomorpha	48
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES EQUINEN TBG	54
4.3	GLYKOSILIERUNGSTELLEN DES EQUINEN TBG	55

4.4	SEQUENZVERGLEICH DES EQUINEN TBG MIT ANDEREN SPEZIES	56
5	DISKUSSION	60
5.1	AUFGABEN DES TBG	60
5.2	STRUKTUR-FUNKTIONS-KORRELATIONEN IM TBG-MOLEKÜL	61
5.3	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE IM ZUSAMMENHANG MIT DEM DERZEITIGEN STAND DER SYSTEMATIK	63
5.4	KÖNNEN DIE GEWONNENEN ERKENNTNISSE ÜBER TBG EINEN BEITRAG ZUR AUFKLÄRUNG DER VERWANDTSCHAFTSVERHÄLTNISSE DER SÄUGETIERE (PHYLOGENESEVERGLEICH) LEISTEN?	66
6	ZUSAMMENFASSUNG	68
7	SUMMARY	70
8	LITERATURVERZEICHNIS	71
9	DANKSAGUNG	78

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Miohippus, Przewalskipferd und heutiges Pferd.....	2
Abb. 2:	Vergleichende Darstellung der Zehe von Tapir, Nashorn und Pferd	5
Abb. 3:	Arbeitsschritte zwischen Sequenzierung und Phylogeniekonstruktion	8
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Schilddrüse, Epithelkörperchen und Thymus	10
Abb. 5:	Die Schilddrüse des Pferdes	11
Abb. 6:	Histologie der Schilddrüse	12
Abb. 7:	Synthese der Schilddrüsenhormone	13
Abb. 8:	Überblick über einige Vertreter der Serpine	22
Abb. 9:	T ₄ -Bindungstest.....	29
Abb. 10:	Displacementbestimmung	30
Abb. 11:	Scatchard-Analyse der T ₄ -Bindung an TBG zur Bestimmung der Bindungsaffinität und Bindungskapazität	33
Abb. 12:	T ₄ Bindungstest	45
Abb. 13:	Scatchardanalyse der T ₄ -Bindung von humanem Serum im Vergleich zu Pferd, Zebra und Nashorn	46
Abb. 13:	Hitzestabilität von TBG von Mensch, Wallach und Stute bei 50°C	48
Abb. 14:	Hitzestabilität von TBG von Mensch, Wallach und Stute bei 50°C	48
Abb. 15:	Hitzestabilität von TBG von Mensch, Wallach und Stute bei 60°C	49
Abb. 16:	Hitzestabilität des TBG vom Menschen im Vergleich zu den Perissodactyla bei 55°C	50
Abb. 17:	Hitzestabilität des TBG aus equinem und humanem Serum und einer Mischprobe zum Ausschluss von Störfaktoren im equinem Serum	51
Abb. 18:	Schematische Darstellung der cDNA-Sequenzierreaktionen.....	54
Abb. 19:	Alignment bekannter TBG-Sequenzen.....	57
Abb. 20:	Phylogenetischer Baum des TBG.....	59
Abb. 21:	Stellung der Hyracoidea in der Systematik	65

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Systematik der Perissodactyla, Unterordnung Hippomorpha.....	4
Tab. 2:	Ergebnisse des TT_4 -RIA zur Bestimmung der Konzentration der T_4 - Standardlösung.....	35
Tab. 3:	Schilddrüsenfunktionsparameter des Menschen und von Vertretern der Perissodactyla.....	44
Tab. 4:	Bindungsaffinität nach Scatchard	47
Tab. 5:	TBG Serumkonzentration nach Scatchard	47
Tab. 6:	Ergebnisse der Hitzedenaturierungen bei 50°C, 55°C und 60°C.....	53
Tab. 7:	Als Primer verwendete Oligonukleotide.....	55
Tab. 8:	Glykosilierungsstellen bekannter TBG	56
Tab. 9:	Homologievergleich bekannter TBG-Nukleinsäure-Sequenzen.....	58

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α_1 -ACT	α_1 -Antichymotrypsin
α_1 -PI	α_1 -Proteinaseinhibitor
α_2 -AP	α_2 Antiplasmin
Arg	Arginin
AT-3	Antithrombin 3
B (Scatchardanalyse)	gebundener Ligand
bp	basenpaare
BP	Barbiturat Puffer
BSA	Bovines Serumalbumin
C (als Baustein der DNA)	Cytidin
CBG	Corticosteroid-bindendes Globulin
cDNA	Komplementäre DNA
cpm	Zahl der pro Minute registrierten Ereignisse (counts per minute)
CrmA	Cytokine response modifier gene A
dest.	destilliert
DIT	Dijodtyrosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
DUOX	Duale Oxygenase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F (Scatchardanalyse)	freier Ligand
fmol	femtomol
fT ₃	Freies Trijodthyronin
fT ₄	Freies Thyroxin
G (als Baustein der DNA)	Guanin
HC-2	Heparin-Cofaktor 2
HCl	Salzsäure

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HWZ	Halbwertszeit
K_a	Affinitätskonstante
kDa	Kilo Dalton
LATS	Long-acting Thyroid Stimulator
Met	Methionin
MIT	Monojodtyrosin
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NaOH	Natronlauge
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
NJ	Neighbor Joining
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEDF	Pigment epithelium derived factor
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
T (als Baustein der DNA)	Thymidin
T_3	Trijodthyronin
T_4	Thyroxin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TB-Lösung	Tris-BSA-Lösung
TPO	Schilddrüsenperoxidase (thyroid peroxidase)
Tris-Puffer	Tris[hydroxy-methyl]aminomethane

TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
TT ₃	Gesamt-T ₃ (totales Trijodthyronin)
TT ₄	Gesamt-T ₄ (totales Thyroxin)
TTR	Transthyretin

1 Einführung

Das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) ist das wichtigste Transportprotein für Schilddrüsenhormone im Blut der meisten Säugetiere. Es besitzt zum einen eine außerordentlich hohe Bindungsaffinität zu Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3), zum anderen eine große Spezifität für diese Moleküle. Schlüssel zum genauen Verständnis der hochaffinen Bindung des TBG ist die Analyse seiner Primärstruktur, insbesondere im Bereich der Ligandenbindungsstelle.

Aufgrund der Homologie der Aminosäuresequenz gehört TBG zur Superfamilie der *Serin-Protease-Inhibitoren* (Serpine). Das Hauptstrukturmerkmal der Serpine ist die Ausprägung dreier β -Faltblattstrukturen, von denen zwei eine fassförmige Anordnung aufweisen und daher als β -barrel bezeichnet werden. In Anlehnung an die Kristallstruktur des α_1 -Proteinase Inhibitors (α_1 -PI), auch bekannt als α_1 -Antitrypsin, dem Archetyp der Serpine, wird dieses β -barrel als Ligandenbindungsstelle des TBG angenommen, wobei für α_1 -PI selbst kein Ligand bekannt ist. Mittels Affinitätsmarkierung, gerichteter Mutagenese und Protein-Engineering konnte diese Vermutung inzwischen bewiesen werden. Eine exakte Charakterisierung der Eigenschaften des TBG würde die Aufklärung seiner Röntgenkristallstruktur erfordern, die bisher jedoch nicht gelang.

Natürlich vorkommende humane TBG-Varianten sind mit wenigen Ausnahmen durch eine Instabilität des Moleküls gekennzeichnet, so dass ihre Charakterisierung keine weiteren spezifischen Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus erlaubt.

Eine Erfolg versprechende Alternative zu den bisher genannten Verfahren stellt der Vergleich des menschlichen TBG mit dem anderer Spezies dar. Die Sequenzierung und biochemische Charakterisierung des TBG anderer Arten lässt im Vergleich mit den bereits bekannten Daten eine Vertiefung des Verständnisses der Struktur-Funktions-Korrelation erwarten. Bislang wurde das TBG von Ratte, Schaf, Schwein und Rind charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals das equine TBG protein-biochemisch und molekularbiologisch analysiert. Die molekularbiologische Untersuchung eines Proteins und der Sequenzvergleich bei verschiedenen Tieren ermöglichen zudem Aussagen über die Phylognese der Arten.

2 Einleitung

2.1 Das Pferd



Abb. 1: **Miohippus, Przewalskipferd und heutiges Pferd (aus: www.riovistaproducts.com, Datum des Abrufs: 22.07.2005)**

2.1.1 Entwicklungsgeschichte des Pferdes

Die Vorläufer des Hauspferdes lebten vor etwa 60 Millionen Jahren als kleine antilopenähnliche Waldbewohner in Nordamerika und Europa. Diese Tiere hatten kaum Ähnlichkeit mit den heutigen Pferden. Der Eohippus besaß vier Zehen vorn, drei Zehen hinten, war nur 25-40 cm groß, lebte in den Wäldern und ernährte sich vom Laub. Während der europäische Vertreter vor 35-40 Mio. Jahren ausstarb, ging die Entwicklung auf dem amerikanischen Kontinent weiter.

Miohippus, die nächste Entwicklungsstufe, lebte vor ungefähr 30-25 Mio. Jahren (Oligozän). Er lief nur noch auf drei Boden berührenden Zehen an jedem Bein, von denen die mittlere Zehe stärker ausgebildet war. Miohippus war ungefähr 60-90 cm groß. Auch er lebte in den Wald- und Buschgebieten und ernährte sich von Laub.

Die darauf folgende Stufe, der Merychippus, entwickelte sich vor rund 25–11 Mio. Jahren (Miozän). Da Gras bewachsene Steppenlandschaften entstanden waren, konnte

diese Urpferdeform den Wald verlassen. Merychippus war der erste Grasäser, seine Widerristhöhe betrug etwa 100 cm, und er setzte zum Laufen nur noch eine Zehe auf.

Definiert man das Pferd als Einhufer, so ist erst der Pliohippus, etwa 10-2 Millionen Jahre vor Christus (Pliozän), als der erste pferdeähnliche Einhufer anzusehen. Er glich in seinen Proportionen und seiner Gestalt schon sehr dem Pferd, wie wir es heute kennen, und lebte in Nordamerika. Pliohippus erreichte eine Widerristhöhe von 122 cm und lief nur noch auf einer von einem festen Huf umgebenen Zehe. Er lebte in der Steppe und war Grasfresser.

Nach etwa 5 Millionen Jahren entwickelte sich aus dem Pliohippus das „richtige“ Pferd, der *Equus caballus*. In etwa dieser Zeit muß auch die Wanderung dieser Einhufer über die damalige Landbrücke der Beringstraße nach Asien, Europa und bis nach Afrika erfolgt sein.

Vom Pleistozän (1 Mio. Jahre v. Chr.) bis zum Holozän (10000 Jahre v. Chr.) dürften die Urahnen des Pferdes in vier verschiedenen Erscheinungsformen aufgetreten sein, was auf die Anpassung an unterschiedliche Klimata und Umgebungen zurückzuführen ist: das Urpony, das Tundrenpony, das Ramskopfpferd und das Steppenpferd. Aus diesen Pferden entwickelten sich in der letzten Eiszeit wieder verschiedene Mischformen.

2.1.2 Systematik der Perissodactyla

Die Ordnung der Perissodactyla (Unpaarhufer) setzt sich aus zwei Unterordnungen zusammen, den Ceratomorpha (Nashornverwandte) und den Hippomorpha (Pferdeartige). Die Unterordnung der Hippomorpha wird von drei Familien gebildet: den Pferden, den Tapiren und den Nashörnern.

Familie	Gattung	Art	Deutsche Bezeichnung	
Equidae	Equus	caballus	Hauspferd	
		przewalski	Przewalskipferd	
		asinus	Esel	
		quagga burchellii	Burchell's Zebra	
		grevyi	Grevyi Zebra	
		hemionus	Kulan	
		kiang	Kiang	
		onager	Onager	
		quagga	Zebra	
		zebra	Zebra	
Tapiridae	Tapirus	Tapirus bairdii	Zentralamerikanischer Tapir	
		Tapirus indicus	Malaysischer Tapir	
		Tapirus pinchaque	Bergtapir	
		Tapirus terrestris	Flachlandtapir	
Rhinocerotidae	Dicerorhinus	Dicerorhinus sumatrensis	Sumatranashorn	
		Rhinoceros	Rhinoceros unicornis	Indisches Panzernashorn
			Rhinoceros sondaicus	Javanashorn
		Diceros	Diceros bicornis	Spitzmaulnashorn
		Ceratotherium	Ceratotherium simum simum	Südliches Breitmaulnashorn
			Ceratotherium simum cottoni	Nördliches Breitmaulnashorn

Tab. 1: Systematik der Perissodactyla, Unterordnung Hippomorpha

2.1.3 Charakteristika der Perissodactyla

Das Urpferd hatte an den Vordergliedmaßen vier Zehen und an den hinteren drei, die mit Huf scheiden bedeckt waren. Die heutigen Tapire erinnern in ihrem Fußbau an das Urpferd, da sie noch die vier Zehen vorne und drei hinten haben. Nashörner haben jeweils vorne und hinten drei Zehen. Bei den Pferden sind nur die Mittelzehen als Laufgliedmaße erhalten geblieben. Auf der dritten Zehe lastet das gesamte Gewicht der Pferde.

Unpaarhufer haben entweder keine Eckzähne oder diese sind nur unscheinbar ausgebildet. Schneidezähne sind in Ober- und Unterkiefer vorhanden. Einige Nashornarten haben keine Schneidezähne im Oberkiefer. Unpaarhufer können sehr gut riechen und hören, weil die Ohrmuscheln große und bewegliche Schalltrichter bilden. Nashörner können nicht gut sehen.

Schweißdrüsen sind nur beim Pferd vorhanden; Nashörner und Tapire regulieren ihre Körpertemperatur über die Schleimhäute der Mund- und Nasenhöhlen.

Unpaarhufer sind nicht wiederkäuende Pflanzenfresser.

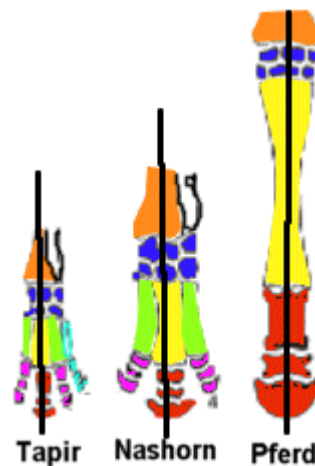


Abb. 2: **Vergleichende Darstellung der Zehe von Tapir, Nashorn und Pferd (aus: www.payer.de, Datum des Abrufs: 22.07.2005)**

2.1.4 Geschichte der Systematik

Die ersten überlieferten Klassifikationen stammen von Aristoteles (384-322 v. Chr.), aber die Frage, wie und zu welchem Zweck eine Klassifikation konstruiert werden soll, ist keineswegs gelöst. Die letzten 40 Jahre haben sogar mehr Diskussionen über Theorie und Methodik einer Klassifikation erlebt als andere Zeiten vorher. Übereinstimmung ist allerdings nicht erreicht worden. Die Ergebnisse der Phylogeneseforschung, die alle Wissenschaftsbereiche von Molekularbiologie über Morphologie bis zu Ethologie und Ökologie berücksichtigen sollte, werden in Form des Stammbaumschemas dargestellt (Storch, Welsch 1997).

Die erste wissenschaftlich fundierte Klassifikation der Lebewesen unternahm der Schwede Carl von Linné 1735 in seinem Werk „Systema naturae“. Da Linné an die Konstanz der Arten glaubte, betrachtete er taxonomische Einheiten als künstlich. Sein Hauptaugenmerk galt der Praktikabilität: die Lebewesen wurden nach Schlüsselmerkmalen geordnet, die eine schnelle Bestimmung ermöglichen sollten. Später wurde erkannt, dass Ähnlichkeiten entweder auf Homologie oder auf Analogie beruhen können, und man begann, die bestehende Klassifikation zu verändern, die Idee eines „natürlichen Systems“ war geboren.

Die hiervon inspirierte Darwinistische Evolutionstheorie (1859) schuf schließlich die Basis für die Erforschung der Verwandtschaftsverhältnisse der Lebewesen und damit eine Klassifikation aufgrund ihrer Phylogenese. Allerdings war die Methodik zunächst nicht definiert und Theorien über Verwandtschaftsbeziehungen beruhten auf der Intuition der Biologen. Erst in der Mitte des 20. Jahrhunderts befassten sich die Wissenschaftler mit der theoretischen Basis. Es kam zu verschiedenen „Schulen“, namentlich der numerischen Taxonomie (Phänetik), der streng phylogenetischen Systematik nach Hennig (Kladistik) und der evolutionären Klassifikation.

In der numerischen Taxonomie werden die Lebewesen nach ihrer Ähnlichkeit geordnet; diese Schule unterscheidet sich nicht wesentlich von den Methoden, die vor Darwin benutzt wurden. In der phylogenetischen Systematik wird der Verlauf der Evolution einer Gruppe von Lebewesen, also ihre Phylogenese, in einem Kladogramm (Stammbaum) dargestellt, und aus diesem Kladogramm ergibt sich unmittelbar das phylogenetische System dieser Gruppe. Demnach kann es nur ein einziges System geben, nämlich das, welches den tatsächlichen Verlauf der Evolution widerspiegelt. In

der evolutionären Klassifikation hingegen ist es erlaubt, die subjektive Meinung des Wissenschaftlers in das System einfließen zu lassen, und es wird toleriert, dass auf diese Weise verschiedene Systeme Gültigkeit haben können.

Da die phylogenetische Systematik also heute die einzige Methode ist, die dem Anspruch nach einem natürlichen System gerecht wird, hat sie sich innerhalb der drei Schulen weitgehend durchgesetzt. Dass trotzdem auch unter Kladisten verschiedene phylogenetische Systeme jeweils einer Gruppe kursieren, liegt darin begründet, daß es nicht möglich ist, den tatsächlichen Verlauf der Evolution und damit das „wahre System“ zu kennen. Die vorhandenen Systeme sind Theorien, die durch wachsende Datenmengen das wahre System approximieren sollen.

In diesem Zusammenhang muss auch die molekulare Systematik gesehen werden: sie soll die morphologische Systematik nicht ersetzen, sondern ergänzen. So stellen Molekülsequenzen lediglich eine weitere Informationsquelle dar, um Anhaltspunkte über die Phylogenese zu erhalten; keinesfalls können sie morphologische Daten ersetzen. Aussagen der molekularen Phylogenie sind Teil der Evolutionsgeschichte. Da alle Aussagen zur Evolutionsgeschichte strenggenommen Hypothesen bleiben, können wir sie nicht experimentell beweisen. Je länger aber die Sequenzen und je vollständiger die Datensätze sind, die untersucht werden, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, über solche Analysen die realen Evolutionsereignisse zu rekonstruieren (Storch, Welsch, Wink 2001). Ebenso muss betont werden, dass auch auf molekulare Sequenzen die Prinzipien der phylogenetischen Systematik angewendet werden müssen.

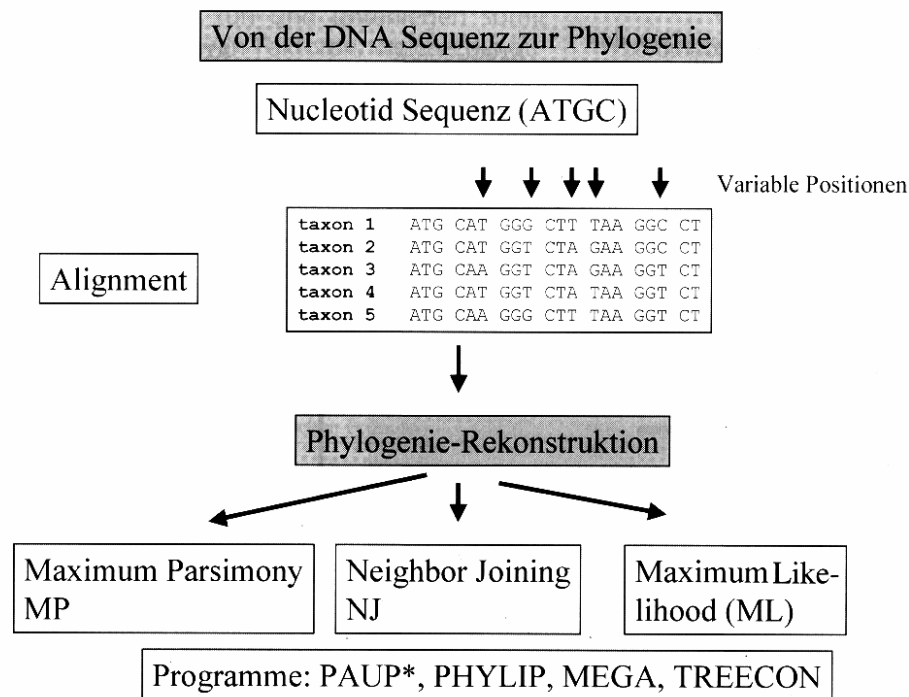


Abb. 3: Arbeitsschritte zwischen Sequenzierung und Phylogenierekonstruktion

Stammbaumrekonstruktion:

Das evolutionäre Verzweigungsmuster lässt sich am besten durch einen dichotom aufgebauten Stammbaum darstellen. Grundsätzlich wird zwischen numerischen Distanzmethoden und Merkmalsmethoden (*Parsimony*- und *Maximum Likelihood*-Methoden) unterschieden. *Neighbour-Joining (NJ)* ist eine typische Distanzmethode, bei der die Gesamtähnlichkeit zwischen jeweils zwei Taxa als numerischer Wert ermittelt wird.

Maximum Likelihood (ML)-Methoden bevorzugen das Verzweigungsmuster, das statistisch die größte Wahrscheinlichkeit hat. Der Umfang der evolutiven Veränderungen wird über verschiedene statistische Substitutionsmodelle abgeschätzt; z.B. werden die Häufigkeiten von Transitionen und Transversionen der einzelnen Nucleotide berücksichtigt.

Bei Maximum Parsimony (MP) werden Taxa so angeordnet, dass die Zahl der Merkmalsänderungen zwischen verwandten Taxa möglichst klein ist. Kladisten erkennen nur die Parsimony-Methoden als sinnvoll an, da Distanzmethoden streng genommen nur phänetische Dendrogramme erstellen können und nicht zwischen ursprünglichen und abgeleiteten Merkmalen unterscheiden. In der Praxis der molekularen Phylogenieanalyse liefern aber häufig Distanz- und Merkmalsmethoden Bäume mit identischer oder ähnlicher Topologie (Storch, Welsch, Wink 2001).

2.2 Die Schilddrüse des Pferdes

2.2.1 Embryonale Entwicklung

Die erste Anlage der Schilddrüse entsteht als Epithelverdickung am Boden des Schlunddarmes. Dieser Sproß dringt in die Tiefe des Mesoderms ein, biegt kaudal um und wächst zum Ductus thyreoglossus aus. Dann weitet er sich an seinem freien Ende zu einem hufeisenförmigen, zweizipfligen Divertikel, das an den Kehlkopfknorpeln vorbei nach kaudal bis vor die Trachea wandert. Aus den Seitenteilen der Anlage bilden sich die beiden Lappen und aus dem Mittelstück der tierartig unterschiedlich strukturierte Isthmus. Der Ductus thyreoglossus selbst wird zurückgebildet. Aus Resten können akzessorische Schilddrüsen entstehen, die am Zungengrund, am Hals oder in der Brusthöhle vorkommen. Der Abgang des Ductus thyreoglossus von der Mundhöhle ist beim Menschen als flache Grube am Zungengrund noch sichtbar. Die zunächst rein epitheliale Schilddrüsenanlage wird durch einwachsendes, gefäßhaltiges Mesenchym in Zellstränge und Zellplatten zerlegt, aus denen sich später die Schilddrüsenfollikel herausbilden. Die Calcitonin produzierenden, parafollikulären oder C-Zellen entwickeln sich aus dem ultimobranchialen Körper, der aus der vierten Schlundtasche entsteht und sich bei Säugern mit der Schilddrüsenanlage vereinigt.

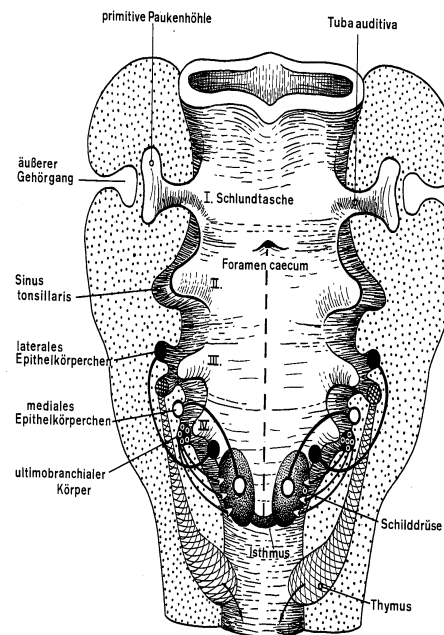


Abb. 4: **Schematische Darstellung der Schilddrüse, Epithelkörperchen und Thymus**
(in Anlehnung an Starck 1975) (aus: Schnorr 1989)

2.2.2 Makroskopische Anatomie

Die Schilddrüse besteht beim Pferd aus einem linken und einem rechten Lappen, die den Seitenflächen der Trachea anliegen und durch ein ventral die Luftröhre umgreifendes Mittelstück verbunden sind. Der beim Menschen daran anschließend zungenwärts laufende Lobus pyramidalis ist auch bei Esel und Maultier verhältnismäßig häufig ausgebildet und kommt nur selten bei Schwein und Fleischfresser vor. Im Gegensatz zu Mensch und Schwein ist das Mittelstück (Isthmus) bei den anderen Haussäugetieren nur schwach entwickelt oder fehlt ganz. Bei Pferd und Wiederkäuer ist nur ein bindegewebiger Strang vorhanden. Die Farbe der Schilddrüse ist rotbraun und ihre Konsistenz ist derb.

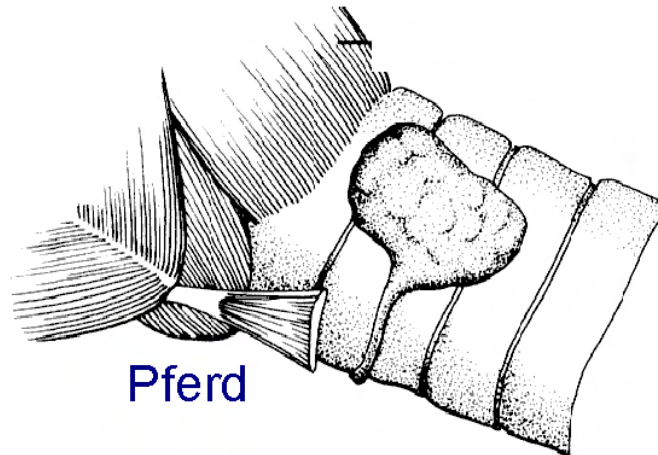


Abb. 5: **Die Schilddrüse des Pferdes**

Die Größe und das Gewicht der Schilddrüse variieren nach Rasse, Alter, Geschlecht, klimatischen Verhältnissen und der Jahreszeit. Schwerere Rassen haben niedrigere relative Schilddrüsengewichte. Höhererinder haben höhere Gewichte als Niederungsvieh. Im Herbst und im Winter ist das Gewicht höher. Kastraten und mehrmals trächtig gewesene Stuten haben ebenfalls höhere Gewichte im Vergleich zu männlichen Tieren.

Das durchschnittliche Gewicht der Schilddrüse beträgt beim Pferd 30-35 g.

2.2.3 Mikroskopische Anatomie

Das Parenchym der Schilddrüse wird histologisch aus einem einschichtigem Epithel, das hohlkugelartig zu Follikeln angeordnet ist, gebildet. Das Epithel besteht aus den schwach färbbaren Hauptzellen und den vereinzelt dazwischen liegenden, stärker färbbaren und schmälere Kolloidzellen. Erstere sind je nach Funktionszustand abgeflacht, kubisch oder zylindrisch, letztere sind in aktivierten Follikeln häufiger anzutreffen als in ruhenden. Das Stroma der Schilddrüse besteht aus kollagenen und elastischen Fasern, die, von der Bindegewebskapsel ausgehend, die einzelnen Follikel umspinnen. In der aktivierten Drüse zeichnen sich interfollikuläre Räume durch Blutfülle der sinusoiden Kapillaren deutlich ab.

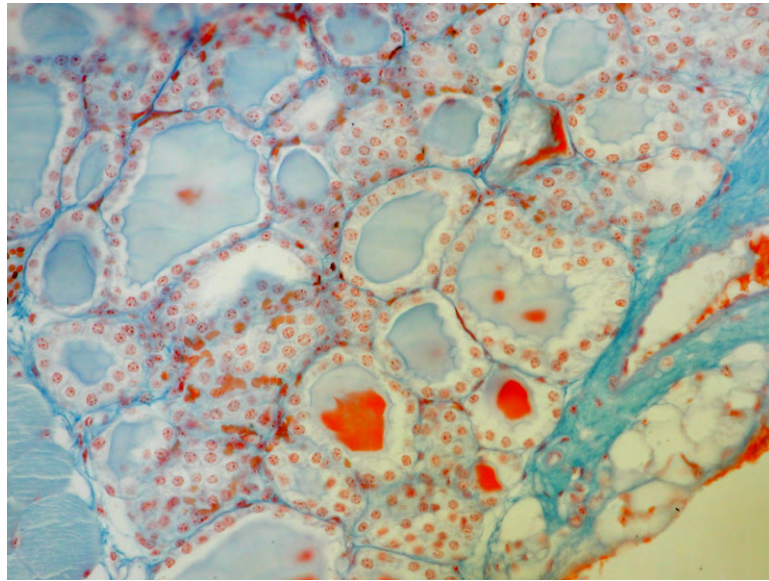


Abb. 6: **Histologie der Schilddrüse**

2.2.4 Physiologie der Schilddrüse

Die Bildung des Prohormons L-Tetraiodthyronin (Thyroxin, T_4) und des biologisch aktiven Schilddrüsenhormons Trijodthyronin (T_3) ist abhängig von der aktiven Aufnahme von Jodionen in die Schilddrüsenzelle und ihrer anschließenden Anreicherung. Dieser Energie-fordernde Transport wird durch hypophysäres TSH stimuliert und kann durch Perchloration gehemmt werden. Jodfreies Thyreoglobulin wird im endoplasmatischen Retikulum gebildet und über Transportvesikel und Exozytose in das Follikellumen abgegeben, wo es als Kolloid gespeichert wird. Die Jodierung des Thyreoglobulins erfolgt extrazellulär an der Kontaktstelle des Kolloids mit der apikalen Oberfläche der Drüsenzellen durch Oxidation des Jodids und Bindung an Tyrosinreste im Thyreoglobulin. Dieser Vorgang wird durch die Schilddrüsenperoxidase katalysiert. Bei Bedarf (Stimulation durch TSH) wird Kolloid über Endozytose in die Follikelzellen aufgenommen, die Schilddrüsenhormone werden durch lysosomale Enzyme vom Thyreoglobulin abgespalten und in die Zirkulation abgegeben. Der größte Teil des Trijodthyronins entsteht durch Monodeiodierung von Thyroxin (5'-Deiodinase) in extrathyreoidalen Geweben. Die endokrine Aktivität der Schilddrüse wird über einen übergeordneten hypothalamisch/hypophysären negativen

Rückkopplungsmechanismus gesteuert. Neben den bisher genannten Drüsenfunktionen besitzt die Schilddrüse in den parafollikulären Zellen (C-Zellen), die zwischen den Schilddrüsenfollikeln angeordnet sind, ein zweites, von der Hypophyse unabhängiges endokrines Funktionsprinzip. Sein Sekret, das Proteohormon Calcitonin, reguliert den Kalziumstoffwechsel im Sinne eines Parathormonantagonisten.

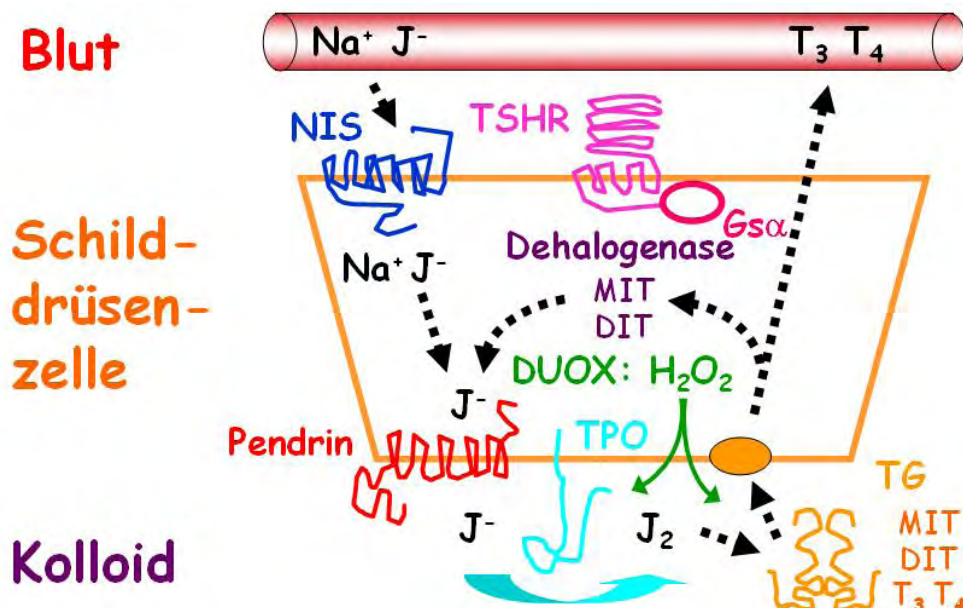


Abb. 7: **Synthese der Schilddrüsenhormone (Janßen, O.E. 2004)**

Das im Blut zirkulierende Jod wird über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) in die Schilddrüsenzelle aufgenommen. Nach Diffusion durch die Zelle wird das Jodid vom Pendrin in das Kolloid des Schilddrüsenfollikels weiter transportiert. Dort erfolgt die Umwandlung von Jodid in elementares Jod durch die Schilddrüsenperoxidase (thyroid peroxidase, TPO). Auch die Kopplung des Jods an Tyrosinreste des Thyroglobulin (TG) erfolgt durch die Schilddrüsenperoxidase. Die für beide Schritte erforderlichen freien Sauerstoffradikale werden als H_2O_2 von der dualen Oxygenase (DUOX) bereitgestellt. Am Thyroglobulin entstehen durch die Jodierung Monojodtyrosin (MIT) und Dijodthyrosin (DIT), die durch Kopplung, ebenfalls durch die Schilddrüsenperoxidase, in Trijodthyronin (T_3) und Tetrajodthyronin (Thyroxin = T_4) umgewandelt werden. Das Thyroglobulin wird bei Bedarf durch Pinozytose in die Schilddrüsenzelle aufgenommen und dort durch proteolytischen Abbau durch lysosomale Enzyme verdaut. Das in der Schilddrüsenzelle freigesetzte T_3 und T_4 wird dann bei Bedarf in das Blut sezerniert. Zum Teil wird in der Zelle auch MIT und DIT als nicht gekoppelte Tyrosinreste freigesetzt, aus denen das Jod mittels der Dehalogenase in einen Salvageprozess wieder in den Kreislauf eingeführt wird, um vom Pendrin erneut ins Kolloid sezerniert zu werden. Alle Transport- und Syntheseschritte unterliegen der Regulation durch Thyreoidea stimulierendes Hormon (Thyreotropin, TSH), das seine Wirkung über den TSH-Rezeptor (TSHR) und Aktivierung stimulierender alpha-G-Proteine ($\text{G}_{\text{s}\alpha}$) vermittelt.

2.3 Schilddrüsenerkrankungen des Pferdes

2.3.1 Hypothyreose

Als Hypothyreose wird die Unterfunktion der Schilddrüse mit einer zu geringen Sekretion ihrer Hormone bezeichnet. Diese Insuffizienz kann chromosomal bedingt sowie intrauterin oder postnatal erworben sein. Zu unterscheiden ist zwischen der primären Hypothyreose, bei der die Erkrankung ihren Ausgang von der Schilddrüse selbst nimmt, und der sekundären Form, bei der die TSH-Sekretion zu gering ist.

Die Symptomatik der Hypothyreose ist dann besonders ausgeprägt, wenn die Störung bereits pränatal oder beim Fohlen, also in Phasen ausgeprägter Wachstums- und Reifungsprozesse, eingetreten ist. Im ersten Fall kommt es häufig zu Totgeburten oder zur Geburt lebensschwacher Fohlen, die teilweise Sehnenkontrakturen aufweisen und nicht stehen und saugen können. Loewe et al. (1974) entfernten die Schilddrüse bei einjährigen Fohlen und stellten folgende Veränderungen fest: stark reduziertes Wachstum, Empfindlichkeit gegen Kälte, mattes, struppiges Fell und verspäteter Verlust des Winterhaarkleides, allgemeine Lethargie, Ödeme an den Hintergliedmaßen, erniedrigte Rektaltemperatur, verringerte Phosphorkonzentration im Blut. Da bei diesen Tieren die Ossifikation des Skeletts verzögert ist, besteht die erhöhte Gefahr des Auftretens traumatisch bedingter Frakturen.

Bei älteren Pferden sind die Symptome der Hypothyreose häufig so geringgradig ausgeprägt, dass sie leicht übersehen werden können. Oft fällt primär nur eine Vergrößerung der Schilddrüse auf. Beobachtet wurden ferner allgemeine Trägheit und Schwäche, Neigung zur Fettsucht und beiderseitigem, symmetrischem Haarausfall, Myxödem, Bradykardie, Erniedrigung der Körpertemperatur, Sistieren des Ovarialzyklus.

Aufschluss über das Bestehen einer Hypothyreose geben labordiagnostische Untersuchungen der Schilddrüsenfunktion, wobei der Nachweis einer erniedrigten Hormonkonzentration im Serum oder Plasma mittels der kompetitiven Proteinbindungsmethode oder des Radioimmunoassays die größte Aussagekraft hat. Als Normalwerte für T₄ wurden von Refetoff et al. (1970) 6-12µg/100 ml Serum angegeben (Dietz, Huskamp 1999).

2.3.2 Hyperthyreose

Als Hyperthyreose werden Überfunktionszustände der Schilddrüse bezeichnet, die zu einer verstärkten Sekretion von T₃ und T₄ führen. Die Ätiologie ist beim Pferd weitgehend ungeklärt. Möglicherweise können emotionale Faktoren (Furcht, Schreck) und Streßsituationen auslösend wirken. Eine Rolle spielen weiterhin Entzündungen, Schilddrüsenadenome und seltener -karzinome.

Beim Menschen wird dem Long-Acting Thyroid Stimulator (LATS), der eine gegenüber dem TSH verlängerte, stark Schilddrüsen stimulierende Wirkung hat und Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor entspricht, eine wesentliche pathogenetische Rolle bei der autoimmun-bedingten Hyperthyreose zugeschrieben. Beim Pferd liegen bisher keine Hinweise auf eine Immunogenese der Hyperthyreose vor, da bislang keine Erhöhung der Anti-TSH-Rezeptor-Antikörper im Blut nachgewiesen wurde. Das TSH ist erniedrigt, weil die vermehrt sezernierten Schilddrüsenhormone die TSH-Freisetzung aus der Hypophyse hemmen.

Als häufiges, aber nicht obligatorisches Symptom einer Hyperthyreose wird eine Vergrößerung der Schilddrüse gefunden, die entweder diffus ist oder aus einem oder mehreren Knoten besteht. Weitere Befunde sind Tachykardien und Arrhythmien, Abmagerung trotz gesteigerten Appetits, Unruhe und Exzitationen mit Schweißausbruch bei geringfügigen Anlässen. Vor allem Traber- und Vollblutpferde reagieren oft - ohne auffällige Vergrößerung der Schilddrüse - auf geringste Reize mit Tachykardie, Herzrhythmusstörungen und Nervosität, die auf eine subklinische Hyperthyreose schließen lassen (Dietz 1994).

2.3.3 Altersbedingte Veränderungen

Im Alter geht mit der Reduzierung metabolischer Aktivitäten eine allmähliche teilweise Ruhigstellung der Schilddrüse einher. Zu beobachten ist dies beim Pferd vom 12. Lebensjahr an. Das Follikelepithel wird flach und die Follikel sind mit Stapelkolloid gefüllt. Ferner treten knotige Hyperplasien als kompensatorische oder autonome Regenerate auf. Bei älteren Tieren wird regelmäßig Lipofuszin in den luminalen Bereichen der Follikelepithelien gefunden (braun-rote Organverfärbung) (Dahme, Weiss 1999).

2.4 Schilddrüsenhormontransport im Blut

Thyroxin (T_4), in wesentlich geringeren Mengen auch Trijodthyronin (T_3), wird in der Schilddrüse aus Tyrosin und Jod synthetisiert und ins Blut abgegeben. Dort wird der weitaus größte Teil über eine nicht kovalente Bindung an Transportproteine gebunden und in die Peripherie transportiert. Nur ein sehr geringer Teil von T_3 und T_4 bleibt ungebunden (sog. Freies T_3 oder T_4 , fT_3 , fT_4). Der Anteil des freien T_4 beträgt 0,03%, der des freien T_3 0,3%. Dieses freie Hormon kann direkt in die Zellen aufgenommen werden. Die freien Hormonspiegel stellen den vom Hypophyse-Schilddrüsenregelkreis regulierten Anteil dar. Die freie Fraktion steht mit dem proteingebundenen im Austausch, so dass letzterer wie ein Schilddrüsenhormonspeicher wirkt. In der Zelle wird T_4 in T_3 umgewandelt. Nur T_3 kann an den nukleären Schilddrüsenhormonrezeptor (T_3 -Rezeptor) binden und ist somit das eigentlich wirksame Hormon, T_4 ist ein Prohormon. Die Umwandlung von T_4 zu T_3 erfolgt durch Dejodierung.

Im Plasma von Säugetieren konnten drei Hauptproteine nachgewiesen werden, die als Trägerproteine der Schilddrüsenhormone fungieren. Diese sind Albumin, Transthyretin und Thyroxin-bindendes Globulin. Neben ihrer Transportfunktion haben sie die Aufgabe, den Hormonverlust mit dem Harn zu reduzieren und ein schnell verfügbares Hormondepot zu bilden (Robbins et al. 1978, Refetoff 1979, Döcke, Friedemann 1994).

2.4.1 Albumin

Albumin hat zwar nur eine geringe Affinität, aber eine hohe Kapazität zur Bindung von Schilddrüsenhormonen. Da außerdem seine Konzentration im Blut hoch ist, bindet es beim Menschen etwa 10% des T_4 und 30% des T_3 (Döcke, Friedemann 1994). Bei einigen Tieren dient ausschließlich Albumin als T_4 -Transportprotein. Dies ist der Fall bei australischen Beuteltieren (68 untersuchte Spezies), die alle Albumin als primären T_4/T_3 -Transporter besitzen (Lahner 2000). Auch bei den Amphibien (3 untersuchte Arten) und den Fischen (4 Arten beschrieben) dient ausschließlich Albumin als T_4 -Transportprotein (Schreiber und Richardson 1997).

2.4.2 Transthyretin

Transthyretin (TTR) hat eine mäßig hohe Affinität (10^8 /mol) und mäßig hohe Kapazität für T_4 (beim Menschen etwa $250 \mu\text{g/mol}$), so dass es etwa 15 % des T_4 bindet. Seine Bindungskapazität für T_3 ist so niedrig, dass es kaum T_3 bindet. Seine Konzentration im Serum liegt bei 250 mg/l . TTR wurde beim Rind, Hund und Kaninchen nachgewiesen. Es weist eine strukturelle Verwandtschaft mit verschiedenen gastrointestinalen Proteohormonen auf (Döcke, Friedemann 1994). Bei Schildkröten wurde ein Transthyretin-ähnliches Protein nachgewiesen, das auch Vitamin D bindet.

2.4.3 Thyroxin-bindendes Globulin

Das Thyroxin-bindende Globulin ist das wichtigste Transportprotein für Schilddrüsenhormone im Serum des Menschen und vieler Säugetiere. Unter physiologischen Bedingungen sind mehr als 75 % des im Blut zirkulierenden T_4 und 70% des T_3 an TBG gebunden.

2.4.3.1 Physikochemische Eigenschaften des TBG

TBG ist ein 54 kDa schweres saures Inter- α -Glykoprotein mit einem Kohlehydratanteil von 15-23% (Gershengorn et. al. 1977, Zinn et. al. 1978, Gärtner et. al. 1981). Der isoelektrische Punkt liegt zwischen pH 4,15 und 4,55.

Im Jahre 1952 wurde erkannt, dass TBG als Haupttransportprotein für Schilddrüsenhormone funktioniert (Robbins, Rall 1952). Im Normalfall, also bei euthyreoten Personen mit normaler TBG-Konzentration, trägt ein Drittel der TBG-Moleküle Schilddrüsenhormone. Wird TBG in vitro ganz gesättigt, der totalen Bindungskapazität entsprechend, so transportiert es ungefähr $20 \mu\text{g } T_4/\text{dl Serum}$, was einer Mol zu Mol Relation von TBG zu T_4 entspricht (Refetoff 1989). Verdrängungsexperimente mit 1,8-Anilinonaphtalensulfonsäure, welche mit hydrophoben Bindungsstellen an Proteinen in Wechselwirkung tritt, bestätigen, dass TBG nur eine einzige Bindungsstelle für T_4 besitzt (Green et al. 1972).

Humanes TBG hat mit etwa $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ eine extrem hohe Bindungsaffinität zu T_4 (Green et al. 1972, Snyder et al. 1976). Daher transportiert es 75% des T_4 , obwohl es das am geringsten verfügbare der drei Transportproteine ist. Die Bindungsaffinität für T_3 ist mit $4,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ über 20 mal niedriger (Robbins 1996), aufgrund der fehlenden Bindung von T_3 an Transthyretin transportiert TBG aber dennoch 70 % des T_3 .

Das TBG-Molekül besteht aus einer einzigen Proteinkette, die sich aus 395 Aminosäuren zusammensetzt. Hauptsyntheseort des TBG ist die Leber, geringe Spuren des TBG werden auch von Monozyten gebildet (Kambe et al. 1988).

2.4.3.2 Serumkonzentration von Schilddrüsenhormonen bei Tieren

Bei den Haustieren tritt das TBG in unterschiedlichen Konzentrationen auf, was eine der Ursachen für die unterschiedlichen Gesamt- T_4 -Spiegel ist. Dagegen findet sich das T_3 , das in geringerem Maße an die Plasmaeiweiße gebunden wird, bei den meisten Tieren in etwa gleichen Konzentrationen. Der Transport des Trijodthyronin im Blut unterscheidet sich von dem des Thyroxin dadurch, dass mit niedrigerer Affinität an die Plasmaeiweiße gebunden ist und den Kreislauf rasch verlässt. Bei den landwirtschaftlichen Nutztieren beläuft sich das Verhältnis von T_4 zu T_3 im Normfall auf etwa 50:1. Eine relativ große Menge T_3 wird zudem von den Erythrozyten gebunden.

Die Beobachtung, dass T_4 und T_3 bei Vögeln gleich stark wirksam sind (Tata und Shellabarger 1959), wird mit dem Fehlen TBG-artiger Proteine im Serum erklärt. Sehr wahrscheinlich stellen die Unterschiede in den Bindungsproteinen für die Schilddrüsenhormone eine Ursache der artbedingten großen Variabilität in der Kinetik und im Stoffwechsel der Iodthyronine dar.

Der Referenzbereich für Gesamt- T_4 erstreckt sich beim Pferd von 4 bis 12 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ und der Anteil des freien T_4 beträgt 0,7- 3,5 $\text{ng}/100 \text{ ml}$. Die meisten Säugetiere weisen fT_4 -Spiegel zwischen 1,4 und 3,7 $\text{ng}/100 \text{ ml}$ Serum auf, bei Affen findet man niedrigere (0,45 $\text{ng}/100 \text{ ml}$), bei Vögeln (Hühnern) und Fischen höhere (5,5 $\text{ng}/100 \text{ ml}$) Spiegel (Refetoff et al. 1970). In der Regel machen die fT_4 -Spiegel weniger als 0,1% des Gesamtthyroxin im Blut aus (Döcke, Friedemann 1994).

2.4.3.3 Charakterisierung animalischer TBG-Varianten

Die Schilddrüsenhormonbindung im Serum zeigt deutliche tierartliche Unterschiede. Bei allen bisher untersuchten Wirbeltieren lassen sich Bindungsproteine für Schilddrüsenhormone im Serum nachweisen. Mit der Gegenstromelektrophorese oder in Tris-Maleat- und Glycinpuffersystem konnte beim Rind, Schaf und Schwein kein TTR nachgewiesen werden. TBG und Albumin sind bei diesen Spezies die wichtigsten Transportproteine. Beim Geflügel und anderen Vögeln (bislang 5 Spezies untersucht) finden sich zwei Schilddrüsenhormon-Transportproteine: Albumin und TTR (Schreiber und Richardson 1997). Zumindest Hühner scheinen noch ein drittes T₄-bindendes Protein zu besitzen, das annähernd gleiches Molekulargewicht, ähnliches Verhalten in der Serumelektrophorese und ähnliche T₄-Bindungsaffinität wie humanes TBG zeigt und ebenfalls ein Glykoprotein ist (Bhat und Cama 1978).

Bei den meisten Säugetierordnungen wurden zum Teil recht hohe TBG-Konzentrationen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu scheint bei der Ordnung der Carnivora TBG nicht exprimiert zu werden. Molekulargenetische und proteinbiochemische Charakterisierungen liegen nur von den TBG der Spezies Mensch, Schaf, Schwein, Rind und Ratte vor. Das gemeinsame funktionelle Merkmal der Tier-TBGs ist die im Vergleich zum humanen TBG reduzierte Hitzestabilität (Lahner 2000).

TBG bei der Ratte

Ratten können ihre TBG-Synthese nach Bedarf modifizieren (Emerson et al. 1993). In ihrem Genom findet sich ein TBG-Gen, dessen Translationsprodukt eine 76%ige Homologie zum humanen TBG zeigt (Imamura et al. 1991). Dieses TBG wird unmittelbar postpartal mit einem Gipfel am 15. Tag nach der Geburt synthetisiert, im Erwachsenenalter ist das Gen supprimiert, im Senium jedoch (ab etwa dem 300. Tag) wieder exprimiert. Dieser Mechanismus korreliert mit der funktionellen T₄-Konzentration im Serum: unmittelbar nach der Geburt ist die T₄-Produktion noch niedrig. Im Alter dagegen scheint die Wirkung der Schilddrüsenhormone nachzulassen (Savu et al. 1991). Erzeugt man bei erwachsenen Ratten experimentell eine Hypothyreose, so wird wieder TBG synthetisiert (Vranckx et al. 1990). Möglicherweise dient dieser Vorgang einer Begrenzung der realen Schilddrüsenhormon-Clearance in Zeiten relativen T₄-Mangels. Das sezernierte Ratten-TBG besteht aus 398 Aminosäuren. Der

Sequenzvergleich mit humanem TBG zeigt einen Homologiegrad von 81% auf Nukleotidebene und 76% auf Aminosäureebene in Bezug auf die codierende Region. Am NH₂-Terminus sind im Vergleich zum menschlichen TBG drei Aminosäuren eingefügt (Imamura et al. 1991).

TBG bei Fledermäusen

Mindestens eine Fledermausart (*Myotis lucifugus*) scheint ihre TBG-Synthese wechselnden Verhältnissen wie Winterschlaf oder Schwangerschaft anpassen und so ihren fT₄-Serumspiegel mitregulieren zu können (Kwiecinski et al. 1991).

TBG beim Schwein

Die codierende Region der TBG-DNA des Schweins besteht aus 1263 Nukleotiden, die für 420 Aminosäuren codieren. Ausgehend von einem Sequenzhomologievergleich mit anderen Serpinen ist ein Signalpeptid mit einer Länge von 23 Aminosäuren zu erwarten (Lahner et al. 1998). Zum sezernierten humanen TBG besteht eine Homologie von 85 % auf Nukleotidebene und 83% auf Aminosäureebene (Lahner 2000).

TBG beim Schaf

Die TBG-cDNA des Schafes weist eine Länge von 1379 bp auf und wird durch 16 Poly-A-Reste verlängert. Die codierende Region besteht aus 1236 bp, wobei das Startcodon 64 bp vom 5'-Ende entfernt liegt. Das Stopcodon befindet sich in Position 1300–1302. Das fertige Translationsprodukt besteht aus 412 Aminosäureresiduen, von denen die ersten 16 als Signalpeptid abgespalten werden. Das Schafs-TBG wird nur in der Leber exprimiert (Tsykin und Schreiber 1993).

Die Homologie zum humanen reifen TBG auf Ebene der Nukleotide beträgt 85%, auf Aminosäureebene noch 82%.

TBG beim Rind

Wie die meisten sezernierten Proteine (Kreil 1981, Silhavy et al. 1983) zeigt auch die bovine TBG-Aminosäuresequenz in ihrer NH₂-terminalen Region hydrophobe Eigenschaften, die auf ein Signalpeptid hinweisen. In Analogie zu den anderen bekannten TBG-Sequenzen (Mensch, Schwein, Schaf) lassen sich so zwei bovine TBG-Signalpeptide definieren, die abhängig vom Transkriptionsstart aus 15 Aminosäureresiduen, davon 9 hydrophob und 2 polar, bzw. 23 Residuen, davon 19 hydrophob und 6 polar, bestehen. Das bovine TBG mit Signalpeptid besteht also aus 411 bzw. 419 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 46,02 kDa bzw. 47,01 kDa (Lahner 2000).

2.4.3.4 Die Konzentration von TBG im menschlichen Serum

Der Normbereich der TBG-Konzentration im menschlichen Serum liegt zwischen 1,1 und 2,2 mg/dl und die Bindungskapazität für T₄ etwa bei 20 µg/100 ml. Bekannteste physiologische Ausnahme stellt die Schwangerschaft dar: Hier verdreifacht sich die Konzentration von TBG im mütterlichen Serum durch eine vermehrte Sialisierung der Kohlenhydratseitenketten des TBG-Moleküls (Ain, Refetoff 1988). Dies hat eine verminderte TBG-Clearance durch den Asialoglykoproteinrezeptor der Leber zur Folge (Ashwell und Harford 1982). Der Konzentrationsanstieg ist für die Versorgung des Feten mit mütterlichem Schilddrüsenhormon bedeutsam (Ekins et al. 1994). Eine Schilddrüsenhormonunterversorgung des Embryo in kritischen Phasen der Gehirnentwicklung führt zu einer Reihe schwerster Stoffwechselstörungen, deren klinisches Korrelat als Kretinismus bekannt ist (Ekins et al. 1994). Auch bei der Aufrechterhaltung einer intakten Schwangerschaft ist TBG bedeutsam: In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass bei Frauen, die eine Fehlgeburt erlitten, der TBG-Anstieg in der Frühschwangerschaft signifikant vermindert war (Skjoldebrand et al. 1986). Zumindest bei einigen Mammaliern ist die Entwicklung schwerer Verhaltensstörungen als Pendant zum humanen Kretinismus gesichert (Ekins et al. 1994).

Bei den landwirtschaftlichen Nutztieren wird die TBG-Konzentration im Blut durch Östrogene in der Trächtigkeit nicht erhöht (Döcke, Friedemann 1994).

2.4.3.5 Serpine

Das humane TBG weist auf Aminosäureebene einen hohen Grad an Homologie zu α_1 -PI (41%, früher als α_1 -Antitrypsin bezeichnet) und α -Antichymotrypsin (ACT, 40%) auf (Flink et al. 1986). Auch zum Cortisol-bindendem Globulin (CBG) besteht eine Strukturverwandtschaft von 40% (Hammond et al. 1987). Diese und etwa 100 weitere Proteine gehören zur Familie der Serpine (Huber und Carrell 1989). Die nahe Verwandtschaft von TBG, CBG, ACT, α_1 -PI wird auch beim Vergleich ihrer Genstrukturen deutlich: Alle vier haben eine ähnliche Exon/Intron-Anordnung und eine Peptidkette von ca. 400 Aminosäuren.

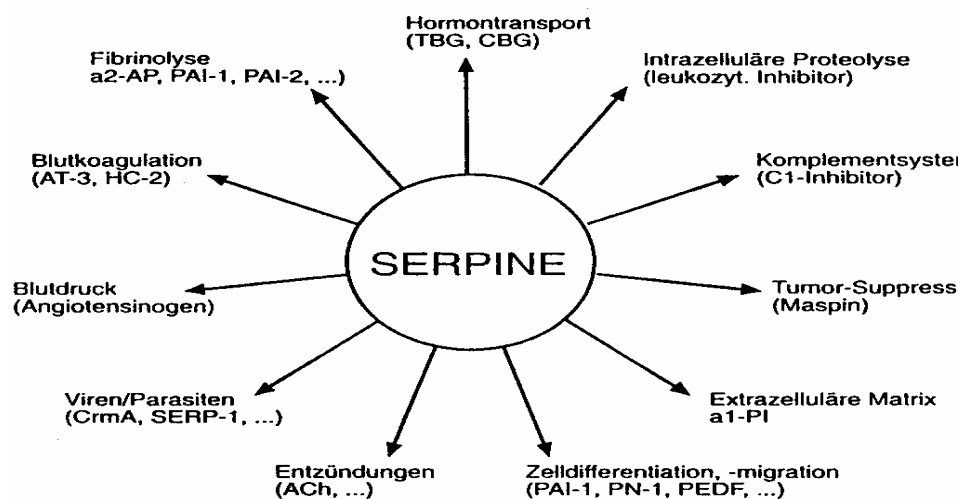


Abb. 8: Überblick über einige Vertreter der Serpine

Die Funktionen der einzelnen Proteine sind sehr unterschiedlich. Sie haben sich durch Genduplikation (Carrell et al. 1987) aus einem gemeinsamen Ur-Gen entwickelt (Hunt und Dayhoff 1980). Archetyp der Serpine ist der α_1 -PI. (Abb. 8). Die divergente Entwicklung über einen Zeitraum von 600 Mio. Jahren ist nicht sicher geklärt. Der größte Teil der Serpine, wie α_1 -PI, sind nicht kompetitive Inhibitoren, da sie durch sterische Hinderung den Zugang der Substrate zum katalytischen Zentrum der Proteinasen versperren. Ein anderer Teil wie Angiotensinogen (AGT) und Ovalbumin oder Hormontransportproteine wie TBG und CBG sind Homologe ohne Inhibitorfunktion, d. h. sie sind zwar Substrate von Serin-Proteasen, inhibieren diese aber nicht,

da sie sich nach der Verdauung durch die Proteasen wieder von ihnen abspalten. Die enge Verknüpfung von Form und Funktion unter den Serpinen wird am Beispiel der α_1 -PI Variante Pittsburgh deutlich. Sie manifestiert sich klinisch mit einer erhöhten Blutungsneigung und wurde 1983 zum ersten Mal bei einem Patienten beschrieben (Owen et al. 1983). Dabei weist das α_1 -PI-Molekül in seinem reaktiven Zentrum die Mutation Methionin³⁵⁸ \rightarrow Arginin auf und verliert so seine Elastase-hemmende Funktion. Es wird stattdessen zu einem höchst effizienten Inhibitor von Thrombin. Die Erklärung hierfür zeigt sich bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen untereinander: das aktive Zentrum des α_1 -PI-Pittsburgh entspricht dem des Antithrombin-3 (AT-3). Die Mutation Met³⁵⁸ \rightarrow Arg konvertiert also α_1 -PI in ein funktionelles AT-3-Molekül.

2.5 Fragestellung

Das TBG ist aufgrund seiner Eigenschaft, Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) sowohl mit hoher Affinität als auch Spezifität zu binden, zum Studium der komplexen Interaktion zwischen einem Transportprotein und seinem physiologischen Liganden aus mehreren Gründen hervorragend geeignet. Sowohl die funktionelle Quantität im Serum als auch die Qualität der Ligandenbindung ist mit einem einfachen T_4 -Bindungstest zuverlässig zu bestimmen. Auch die Stabilität, mit der die Funktion aufrechterhalten wird, lässt sich durch sukzessive Hitzedenaturierung des Proteins und anschließende Bestimmung der residualen T_4 -Bindungskapazität gut ermitteln. Schwieriger als das Verständnis der Funktion des TBG ist das seiner Struktur. In den letzten Jahren konnte ein modulares Strukturmodell der Serpine und ein Strukturmodell des TBG entwickelt werden. Die Zuordnung der verschiedenen Funktionen des TBG (Syntheseeffizienz, Bindungsaffinität und Hitzestabilität) zu den dafür verantwortlichen Bereichen in diesem Strukturmodell erfordert die Charakterisierung einer ausreichenden Anzahl TBGs mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dafür eignen sich in besonderem Maße TBGs von verschiedenen Säugetieren, da davon auszugehen ist, dass diese eine gute Syntheseeffizienz haben. In den letzten Jahren konnten knapp 100 verschiedene Säugetier-TBGs charakterisiert und fünf TBG-Gene sequenziert werden (Mensch, Schwein, Ratte, Rind, Schaf). Im Sequenzvergleich konnten einige Bereiche identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich an der hochaffinen Bindung beteiligt sind.

Aufgrund der Zugehörigkeit des TBG zur Superfamilie der Serpine, zu der auch das α_1 -PI sowie Antithrombin gehören, kann es als Modellprotein zum besseren Verständnis von Serpinen herangezogen werden.

Der vorliegenden Arbeit liegt folgende Zielsetzung zugrunde:

1. Untersuchung der Eigenschaften des TBG der Perissodactyla
2. Sequenzanalyse des equinen TBG
3. Verbesserung der Struktur-Funktions-Korrelation des TBG durch Sequenzvergleich mit dem Strukturmodell der Serpine und anderen Säugetier-TBGs, um Rückschlüsse auf Bindungseigenschaft und Struktur des Proteins ziehen zu können.
4. Der DNA-Sequenzvergleich kann dazu dienen, evolutive Zusammenhänge zu untersuchen. Könnte TBG als Indikatorprotein zur Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der Säugetiere (Phylogensevergleich) dienen?

3 Material, Geräte und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg
Barbituratpuffer	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
HPLC Wasser	Merck, Darmstadt
Ionenaustauscher Resin Amberlite-400	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
NaOH	Sigma, Deisenhofen

3.1.2 Enzyme

RNAse H	Promega, Madison, USA
Reverse Transkriptase	Gibco (Invitrogen)
Taq Polymerase	Promega, Madison, USA
Terminale Transferase	Gibco (Invitrogen)
RT-PCR-Mix	Gibco (Invitrogen)

3.1.3 Radioisotope

(¹²⁵ J)-Thyroxin	NEN, Boston, USA
Kaltes T ₄	Sigma, Deisenhofen

3.1.4 Nukleotide/Oligonukleotide

DNTPs	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Oligo d(T) Primer	Promega, Madison, USA

Die Oligos wurden bei Amersham Biosciences, Freiburg, hergestellt.

3.1.5 DNA Größen

100 bp Marker	Amersham Biosciences
DNA Molecular weight marker 2	Roche, Mannheim

3.1.6 Kits

QIAamp Blood Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Superscript II	Gibco
RN easy	Qiagen, Hilden

3.1.7 Proteine

BSA (Albuminfraktion V, Rinderserum)	Sigma, Deisenhofen
--------------------------------------	--------------------

3.1.8 Seren/Probenmaterial

Das Pferdeblut bzw. -serum stammte von den Islandpferden Drottning, Lysingur, Börkur und Katur im Besitz von Silvia und Stefan Hamm, Mühlberghof Oberlemp. Für die Gensequenzierung wurde ausschließlich die aus EDTA-Blut gewonnene genomische DNA der Stute Drottning verwendet. Das Tapirserum stammte vom Tierpark Hagenbeck, Hamburg. Das Nashornserum stellte der Salzburger Tiergarten Hellbrunn zur Verfügung. Das Serum von Esel und Kulan war aus dem Zoo Nürnberg. Aufgrund der nur sehr geringen Menge an zur Verfügung stehendem Serum von Kulan und Nashorn konnten bei diesen Tieren nicht alle Untersuchungen durchgeführt werden. Das Serum des Kulans reichte nur für einen T₄-Bindungstest und die Menge des Nashornserums war für die Hitzedenaturierungen nicht ausreichend. Das Zebrablut wurde uns vom Münchener Tierpark Hellabrunn überlassen. Die Pferdeleber stammte von Schlachtpferden des Gießener Schlachthofes.

3.2 Geräte

Gammacounter Wizard	Wallac, München/ Helsinki
Gelkammersystem und Netzgerät Modell 1000/500	BioRad, München
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator Ultra-Turrax	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Gradient PCR-Gerät	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge (Picofuge)	Stratagene, USA
Photometer Smart Spec 3000	BioRad, München
Schüttelinkubator	Gallenkamp
Brutschrank	UTB Binder
Schüttler (für Reagenzgläser, Vortex- Evaporateur)	Buchler, USA
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
UV-Tisch	Bachofer, Reutlingen
Varifuge 3.OR	Heraeus Sepatech, Hanau
Vortex-Schüttler Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage (KB 400-2)	Kern&Sohn GmbH, Albstadt
Wasserbad RM 20	Lauda, Königshofen

3.3 Methoden

3.3.1 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1.1 T₄-Bindungstest

Mit dem T₄-Bindungstest wird die relative *Bindungskapazität* von TBG für T₄ bestimmt. Dazu sättigt man das TBG der zu untersuchenden Serumprobe (Probe, P) mit radioaktiv markiertem T₄ ab, den Überschuss an freiem T₄ bindet man vollständig an ein Ionenaustauscher-Harz, das sedimentiert wird. Im Überstand befindet sich jetzt nur noch das vom TBG gebundene T₄, dessen Aktivität mit dem γ -Zähler bestimmt wird (Abb. 9) und ein relatives Maß der TBG-Menge darstellt, mit falsch niedrigen Werten bei erniedrigter T₄-Bindungsaffinität (TBG-Mutation oder einige Tier-TBGs)

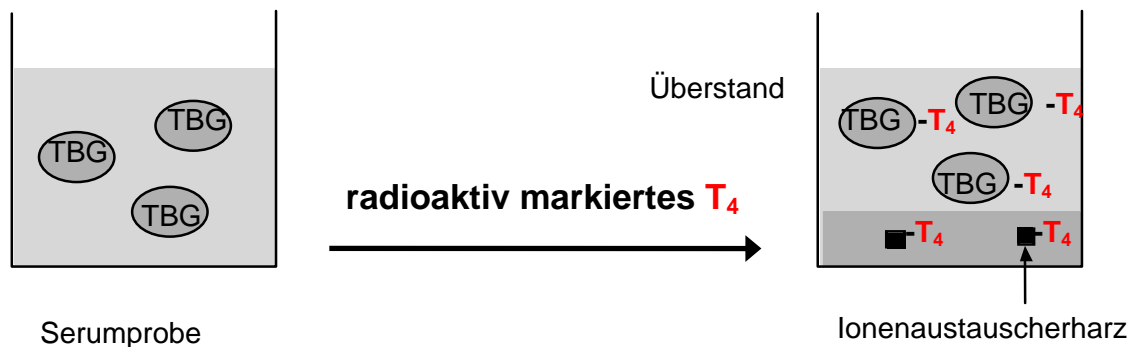


Abb. 9: T₄-Bindungstest

Die zu untersuchende TBG-Probe wird mit radioaktiv markiertem Thyroxin (T₄) im Überschuss versetzt. Nach Inkubation wird das ungebundene T₄ mittels Ionenaustauscherharz entfernt und die Aktivität des gebundenen T₄ im Überstand bestimmt. Diese proteingebundene Menge entspricht der relativen Bindungskapazität des TBG in der Probe

Störgrößen im Serum, die die Bindung kompetitiv beeinflussen können, werden für jede Serumprobe mit Hilfe der sogenannten Displacement-Bestimmung weitgehend eliminiert. Durch Zugabe eines großen Überschusses an unmarkiertem T₄ wird das spezifisch an TBG gebundene radioaktive T₄ verdrängt und an das Harz gebunden. Im Überstand bleibt dann nur noch eine unspezifisch gebundene radioaktive T₄-Menge, die der unspezifischen Bindung des Serums entspricht (Displacement D). Dieser Wert wird am Ende von den einzelnen Meßwerten subtrahiert (Abb. 10).

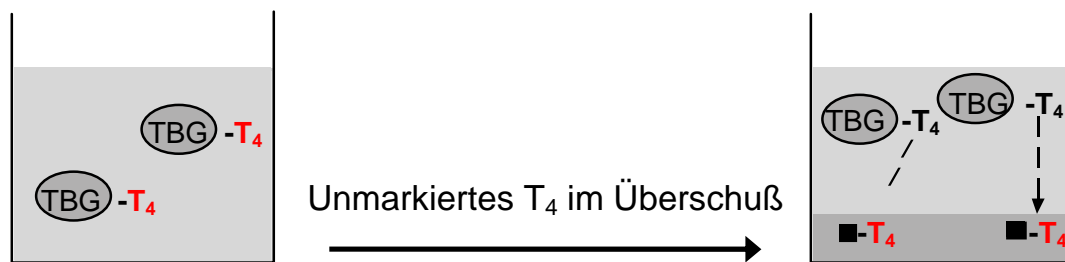


Abb. 10: **Displacementbestimmung**

Zur Bestimmung der unspezifischen T_4 Bindung wird im T_4 -Bindungstest das radioaktiv markierte T_4 durch einen großen Überschuss an unmarkiertem T_4 verdrängt. Die im Überstand verbleibende Aktivität ist nicht spezifisch an TBG gebunden und wird als unspezifische Bindung (Displacement) vom Messwert der spezifischen Bindung abgezogen.

Für jeden Bindungsassay werden ferner ein Null- und ein Totalwert bestimmt. Der Nullwert (N) ergibt sich aus der vollständigen Sättigung der markierten T_4 -Lösung mit dem Ionenaustauscher-Harz (ohne Zugabe von Serum) durch Messung des Überstandes. Der Totalwert (T) errechnet sich durch Messung der markierten T_4 -Lösung ohne Entfernung des freien T_4 mit dem Ionenaustauscher.

Barbiturat-Puffer (BP) dient der Verdrängung von im Serum auch an Albumin und Transthyretin gebundenem T_4 , wobei die Bindung an TBG unbeeinträchtigt bleibt. Hierbei wird ausgenutzt, dass die Barbiturate mit relativ hoher Affinität an Albumin und TTR, jedoch mit vernachlässigbar niedriger Affinität an TBG binden (hohe Spezifität des TBG und sehr viel niedrigere Spezifität von Albumin und Transthyretin). Die unspezifische Bindung von TBG an den Reaktionsgefäßwänden wird durch Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) reduziert.

Folgende Lösungen werden benötigt:

Alkalisches EtOH

NaOH (5N) 4 Tropfen

EtOH 20 ml

T₄ Stocklösung (T₄-Stock; 2 mg/ ml)

T₄ 20 mg

Alkal. EtOH 10 ml

BSA-Stammlösung (20 mg/ml)

20 mg/ml in H₂O dest.

Barbiturat-Puffer (BP-Lösung)

5 Flaschen Barbiturat-Puffer (300 mmol) ad 1000 ml H₂O dest. Der Ansatz wurde zum besseren Lösen auf 60°C erhitzt.

Lösung C

BP-Lösung 250 ml

BSA (20 mg/ml) 250 µl

¹²⁵J-T₄ ca. 150 µl

Die Lösung C wird mit der ¹²⁵J-T₄ (NEN, Boston, USA) versetzt, so dass 1 ml 80000 Ereignisse pro Minute (cpm) enthält.

Lösung D (1,64 nmol/50 µl) = Verdrängungslösung

T₄-Stocklösung 40 µl

BP-Lösung 1 ml

Die Lösung wurde nur am Herstellungstag verwendet.

Für den Assay wurden 2 ml Lösung C mit 2 µl des zu untersuchenden Serums versetzt. Davon wurden je 950 µl zu 50 µl Barbiturat Puffer (Meßwert) und je 950 µl zu 50 µl Lösung D pipettiert (Displacementwert). Zur Bestimmung der Null- und Totalwerte wurden je Test zwei Röhrchen nur mit je 950 µl Lösung C versetzt. Die Proben wurden gevortext und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur und danach 30 Minuten auf Eis inkubiert. Sodann wurden alle Ansätze mit Ausnahme des Totalwerts mit 0,5 cm³ Ionenaustauscher-Harz versetzt und zwei Minuten geschüttelt. Alle Ansätze wurden anschließend mit 2 ml eiskaltem H₂O verdünnt und 30 Sekunden aufgeschüttelt. Nach der Sedimentation des Harzes (10 Sekunden) wurde je 1 ml zügig abpipettiert und die Radioaktivität im Gammacounter bestimmt.

3.3.1.2 Kompetitiver Verdrängungsassay nach Scatchard

- Analyse der Bindungsaffinität von TBG-

Die Scatchardanalyse dient dazu, die *Bindungsaffinität* und die absolute Bindungskapazität von TBG für T₄ zu bestimmen.

Beim kompetitiven Verdrängungsassay nach Scatchard werden Verdünnungen der zu untersuchenden Serumprobe mit ¹²⁵J-T₄ inkubiert und anschließend mit ansteigenden Mengen von nicht-radioaktivem T₄ versetzt, welches das radioaktive T₄ allmählich verdrängt. Nach der Inkubation wurde das ungebundene T₄ mittels Ionenaustauscher-Harz von dem Protein-gebundenen getrennt. Anschließend wurde die TBG-gebundene ¹²⁵J-Aktivität im Gammazähler gemessen (Abb. 11).

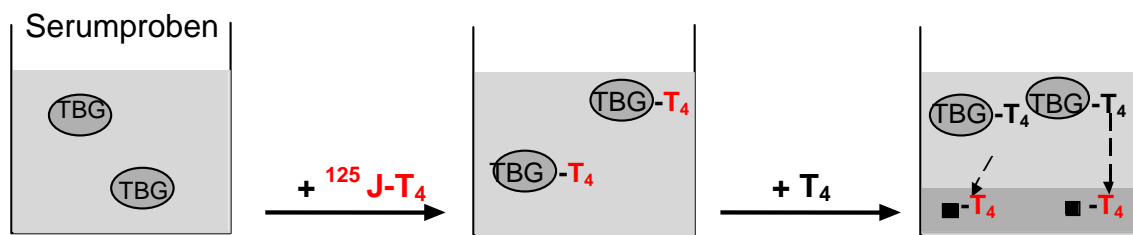


Abb. 11: **Scatchard-Analyse der T_4 -Bindung an TBG zur Bestimmung der Bindungsaffinität und Bindungskapazität**

Zunächst erfolgt die Inkubation der Verdünnungen der zu untersuchenden Serumproben mit $^{125}\text{J-T}_4$. Hiernach werden ansteigende Mengen von nicht radioaktivem T_4 zugegeben, das zur Verdrängung des radioaktiven T_4 führt. Das ungebundene T_4 wird nach der Inkubation mittels Ionenaustauscherharz von dem Protein-gebundenen getrennt und die TBG-gebundene ^{125}J -Aktivität im Gammazähler gemessen.

Bei dem kompetitiven Verdrängungsassay nach Scatchard wird der Quotient von B und F, das heißt gebundener durch freier Ligand, gegen die Menge des gebundenen Liganden (bei TBG in Femtomol (fmol) angegeben) aufgetragen. Die Punkte einer solchen Geraden lassen sich aus der Radioaktivität berechnen, bei der eine konstante Menge heißes, das heißt radioaktives T_4 , mit einer steigenden Menge kaltem T_4 um die Bindungsstelle am TBG konkurriert. Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse entspricht der Menge an T_4 , die maximal gebunden werden kann (absolute Bindungskapazität). Dies entspricht der Anzahl der Bindungsstellen und damit der Menge an TBG, da TBG nur eine Bindungsstelle für T_4 hat. Die Steigung der Geraden ist umgekehrt proportional zur Affinitätskonstanten (K_d) für das untersuchte TBG. Für die Berechnung wurde eine selbst erstellte Excel Tabelle verwendet; das Prinzip und die Anwendung sind publiziert (Murata et al. 1985; Janßen et al. 1995; Janßen et al. 2002).

Folgende Lösungen werden benötigt:

Alkalische EtOH

NaOH (5 N) 4 Tropfen

EtOH 20 ml

Tris HCl 10 mM, pH 8,8 (für 1 l)

1,21g Tris einwiegen, in ca. 600 ml lösen, mit HCl pH 8,8 einstellen, Volumen auf 1 l auffüllen.

Tris-BSA-Lösung (TB-Lösung)

Tris-HCl (10 mM, pH 8,8) 100 ml

BSA-Lsg (20 mg/ml) 100 μ l

T₄-Stocklösung (2 mg/ml), (siehe Bindungstest S. 31)

T₄-Standardlösung (10 μ g/ml)

T₄-Stocklösung 100 μ l

TB-Lösung 20 ml

Die Konzentration des Thyroxins in der T₄ Standardlösung wurde mit einem TT₄ RIA überprüft, um das für die Standardreihe zuzugebende Volumen exakt zu bestimmen. Dazu wurde der TT₄-Gehalt in 200 µl eines Standardserums allein und nach Zugabe von 1 bis 4 µl des T₄-Standards bestimmt (Tab. 2).

PROBE	ng/ml	Δ T ₄	Δ T ₄ / µl Standard
Serum	65,5		
1 µl T ₄ Standard	115,1	49,6	49,6
2 µl T ₄ Standard	173,4	107,9	54,0
3 µl T ₄ -Standard	263,1	197,6	65,9
4 µl T ₄ -Standard	287,9	222,4	55,9
Mittelwert = 56,3 ng/ml			

Tab. 2: **Ergebnisse des TT₄-RIA zur Bestimmung der Konzentration der T₄-Standardlösung**

Aus dem Mittelwert von 56,3 ng/ml Delta T₄ pro µl zugegebenem Standard berechnet sich aufgrund der Messung in nur 200 µl Serum eine Konzentration des T₄-Standards von 11,26 µg/ml statt der gewünschten 10 µg/ml). Durch die errechnete Konzentration des T₄-Standards konnten die sieben T₄-Standards folgendermaßen angesetzt werden:

T₄ Standardreihe:

Vom T₄-Standard wurde eine erste Verdünnung hergestellt, die in 50 µl 2500 pM T₄ enthielt, unter Berücksichtigung der 1:3-Verdünnung im letzten Schritt des Scatchards (siehe unten), also 530 µl T₄-Standard auf 50 ml TB-Lösung. Dieser wurde sequentiell 1:2 weiterverdünnt, um Standardverdünnungen zu erhalten, die in 50 µl 1250, 625, 313, 156, 78 und 39 pM T₄ enthalten.

Die so erhaltene Standardverdünnungsreihe wurde in 500 µl große Aliquots aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt. Die Angabe von 2500 pM = 2500 fmol/ml bezieht sich dabei auf die Menge kalten T₄, dessen gebundener Anteil später gemessen wird. Es handelt sich also um die Menge kalten T₄ in pM (fmol/ml), die in 1 ml der 1:3 mit kaltem Aqua dest. verdünnten Ansatzlösung mit dem radioaktiven T₄ um die Bindung am TBG konkurriert.

T₄ Standardreihe:

- | | |
|------------------------|--|
| 1. 2500 pM entsprechen | 530 µl T ₄ -Standard ad 50 ml TB-Lösung |
| 2. 1250 pM entsprechen | 25 ml aus 1. und 25 ml TB-Lösung |
| 3. 625 pM entsprechen | 25 ml aus 2. und 25 ml TB-Lösung |
| 4. 313 pM entsprechen | 25 ml aus 3. und 25 ml TB-Lösung |
| 5. 156 pM entsprechen | 25 ml aus 4. und 25 ml TB-Lösung |
| 6. 78 pM entsprechen | 25 ml aus 5. und 25 ml TB-Lösung |
| 7. 39 pM entsprechen | 25 ml aus 6. und 25 ml TB-Lösung |

Folgende Lösungen werden benötigt (siehe Bindungstest S.31)

T₄-Stocklösung

BSA-Stammlösung

Lösung D

Lösung C

BP-Lösung 25 ml

BSA-Lösung 25 µl

¹²⁵J-T₄ ca. 15 µl

Für jede zu messende Probe wurden 10 Röhren vorbereitet. In Röhren 1-7 wurden jeweils 50 µl der T₄-Standardverdünnung pipettiert, die Röhren 8-10 wurden wie folgt besetzt:

50 µl TB-Lösung = ohne Verdrängung = Bindungstest

50 µl nur Lösung D = Displacement = Nullwert

50 µl TB-Lösung = Totalwert (T, ohne Harz)

Für den Scatchard wurden zu 12 ml Lösung C 12 µl der Serumprobe zugegeben (Verdünnung 1:1000) und anschließend je 1 ml Lösung C + Probe in die 10 Röhren gegeben. Zur Kontrolle wurde stets die Verdünnung eines Normalserums mitgemessen. Die weitere Vorgehensweise entsprach nun dem T₄-Bindungstest mit Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 30 Minuten auf Eis. Anschließend Zugabe von Ionenaustauscherharz (nicht jedoch in Probe 10) und zweiminütiges Schütteln, Zugabe von je 2 ml eiskaltem H₂O dest., kurzes Aufschütteln. Jeweils 1 ml wurde abgenommen und im Gammacounter gemessen (Murata, Refetoff et al. 1985).

3.3.1.3 Hitzedenaturierung

Das Ausmaß der Hitzedenaturierung wird durch Inkubation der Seren bei unterschiedlichen Temperaturen für unterschiedlich lange Zeit und Messung der verbleibenden T₄-Bindungskapazität im Bindungstest bestimmt. Zur Vereinfachung des Pipettierens wurden die Proben vorverdünnt, 20 µl des menschlichen Serums wurden mit 980 µl TB-Puffer verdünnt, vom Pferdeserum wurden 200 µl mit 800 µl TB-Puffer verdünnt. Für jede Probe wurde ein Displacement-Röhren und eine nicht erhitzte

Probe angelegt sowie üblicherweise 6 weitere Röhrchen für Abnahmen zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten. In das D-Röhrchen wurden 50 µl Lösung D, in alle anderen Röhrchen 50 µl BB-Lösung vorgelegt. Dann wurde in alle Röhrchen 1 ml Lösung C vorgelegt und die Röhrchen auf Eis gestellt. Schon vor Beginn der Hitzedenaturierung wurden je 50 µl der verdünnten Proben in die vorgelegten Röhrchen pipettiert, für den Displacementwert und den Ausgangswert. Anschließend setzte man die verdünnten Serumproben in den Heizblock. In 5-minütigen Abständen wurden über 30 Minuten je 50 µl davon abgenommen und in die jeweils 1 ml Lösung C enthaltenden Reagenzgläser überführt.

So wurden alle Proben auf Eis gesammelt. Die Messung der residualen T₄-Bindung erfolgte mit dem T₄-Bindungstest. Die Halbwertszeit der Denaturierung wurde durch die Berechnung der Steigung der linearen Regression der semilogarithmischen Darstellung der verbleibenden T₄-Bindungskapazität nach der Zeit bestimmt und mit der eines menschlichen Normalserums verglichen.

3.3.2 Molekularbiologische Methoden

3.3.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus EDTA- Blut

Die Präparation von genomischer DNA aus equinem EDTA-Blut erfolgte mit Qiagen Blood amp Midi Kit. Die Zusammensetzung der Puffer ist nicht deklariert. 2 ml EDTA-Blut werden in ein 15 ml Röhrchen überführt. Hierzu werden 200 µl Qiagen Protease und 2,4 ml Puffer AL pipettiert. Nach dem Vortexen wurde die Lösung für 10 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml 100% Ethanol und Vortexen wurde die Hälfte (3,3 ml) auf eine Qiagen-Säule pipettiert. Diese wurde in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen gestellt und 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Rest der Lösung (3,3 ml) wurde auf die Säule pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 rpm für 3 Minuten. Nun wurde der Durchfluss wieder verworfen und 2,2 ml Puffer AW1 auf die Säule pipettiert.

Nach erneutem Abzentrifugieren bei 5000 rpm für eine Minute wurden 2 ml des Puffers AW2 auf die Säule pipettiert und nun 15 Minuten lang 5000 rpm abzentrifugiert.

Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Röhrchen gestellt. Hiernach wurde 300 µl HPLC Wasser auf die Säule pipettiert und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 5000 rpm. Das Eluat (genomische DNA) wurde in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Die genomische DNA wurde erneut auf die Säule pipettiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und noch einmal für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C bis 8°C .

3.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA über die optische Dichte

Die Konzentration einer DNA-Lösung kann durch das Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt werden. Um die Konzentrationen zu berechnen, geht man von folgenden Werten aus:

ds DNA : 1 OD 260 = 50 µg / ml

Oligonukleotide : 1 OD 260 = 30 µg / ml

Durch Messen der Extinktion bei 280 nm kann die DNA-Probe auf Proteinverunreinigungen überprüft werden. Das Verhältnis von OD 260 zu OD 280 zeigt den Reinheitsgrad an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Protein.

3.3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) dient der selektiven Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz und ist in drei Schritte gegliedert: Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize, Annealing der DNA mit den Primern und abschließend die Elongation. Bei der Denaturierung trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Hiernach wird die Temperatur gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im massiven Überschuss vorhandenen Oligonucleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA

exakt gleich. Weil die Komplementierung an beiden Strängen abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Template-DNAs verdoppelt. Bei jedem Zyklus wird die Zielsequenz zwischen den Oligos verdoppelt.

In PCR-geeignete Reaktionsgefäße wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

H ₂ O steril	28,5 µl
DNA	10 µl
dNTPs (A,G,C,T)	4 µl
Primer 1 (sense)	1 µl
Primer 2 (antisense)	1 µl
Puffer	5 µl
Taq Polymerase	0,5 µl

Für die Amplifikation erwies sich folgendes Programm im Thermocycler als geeignet:

Initiale Denaturierung für 3 Minuten bei 96°C, dann 25 Zyklen mit jeweils

30 sec.	96°C
45 sec.	64,8°C
1 min.	72°C.

3.3.2.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des Qiagen Purification Kits.

Dem PCR-Ansatz wurde die fünffache Menge des Puffers PB zugesetzt. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz auf eine Säule gegeben und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden 750 µl Puffer PE zugegeben und anschließend 1 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde

erneut verworfen, und nochmals wurde 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein sauberes Eppendorfgefäß gesetzt und 30 µl HPLC-Wasser hinzugegeben. Nach einer Minute und erneuter Zentrifugation befand sich das aufgereinigte Eluat in dem Eppendorfgefäß.

3.3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA auf Agarose-Gelen

Diese Methode ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht. Da DNA negativ geladen ist, wandert sie beim Anlegen einer Spannung in Richtung Anode. Dabei ist die Geschwindigkeit, mit welcher die einzelnen DNA-Fragmente wandern, abhängig von ihrem Molekulargewicht, der Konzentration des Agarosegels und der angelegten Spannung. Durch die Konzentration der Agarose wird die Durchlässigkeit des Gels bestimmt. Größere Fragmente können nicht so leicht durch die Poren des Gels wandern wie kleinere.

Um ein Gel zu gießen, wurde entsprechend der gewünschten Konzentration die benötigte Menge an Agarose in $0,5 \times$ TBE aufgeköcht. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (30 µg/ml) kann später die DNA in dem Gel sichtbar gemacht werden, da dieses in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht orange fluoresziert. Die flüssige Agarose wurde in einen abgedichteten Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen. Nachdem das Gel fest geworden war (nach ca. 30 Min.), entfernte man die Abdichtung, legte den Gelschlitten in die Elektrophoresekammer und füllte mit $0,5 \times$ TBE als Laufpuffer auf. Nach Entfernung des Kammes wurden die Proben, welche man zuvor mit 0,1 Vol. $10 \times$ DNA-Probenpuffer vermischt hatte, in die Taschen des Gels pipettiert. Der Gellauf erfolgte konstant bei 100-110 V und ca. 50 mA über etwa 30 Minuten. Anschließend wurde das Gel auf dem UV-Tisch analysiert und mit einer Videokamera (Hitachi Deutschland, Düsseldorf) mittels der Biocapt-Software (Microsoft, Redmond USA) dokumentiert.

Benötigte Lösungen:

EtBr-Stammlösung

10 mg/ml in Aqua bidest (lichtgeschützt bei 4°C lagern)

10 x TBE

109 g Tris

55 g Borsäure

9,3 g EDTA (ph 8,3)

ad 1 l Aqua bidest

3.3.2.6 RNA-Isolierung aus Gewebe

Hierfür wurde das RN easy Midi Kit der Firma Quiagen verwendet. Zunächst wurden 4 ml RLT-Puffer und 40 µl Mercaptoethanol in ein Reagenzglas vorgelegt und gevortext. Von dem in Cryoröhrchen im flüssigen Stickstoff gelagerten Gewebe wurde mit einer sterilen Pinzette und einem sterilen Skalpell ein ca. 130-250 mg schweres Stück abgetrennt und in das präparierte Reagenzglas gegeben. Hiernach erfolgte eine Homogenisierung mit Hilfe eines Ultraturrax mit sterilisiertem, RNA freiem Aufsatz (Durchmesser: 8mm). Anschließend wurde das Lysat 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Reagenzglas überführt und mit 4 ml 70% Ethanol vermischt. Anschließend wurde die im Quiagen-Kit enthaltene Ionenaustauscher-Säule mit 4 ml dieses Gemisches beladen und 5 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Rest des Gemisches auf die Säule pipetiert. Erneut wurde bei 5000 rpm 5 Min. zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Hiernach wurden 4 ml Puffer RW 1 auf die Säule pipetiert und 5 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden nun 2,5 ml RPE Puffer auf die Säule pipetiert, 2 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, nun aber mit einer

fünfminütigen Zentrifugation bei 5000 rpm. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule auf ein neues Röhrchen gestellt und 250 µl RNase-Lösung in die Mitte der Säule pipettiert. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 5000 rpm wurde der Durchfluss nochmals auf die Säule pipettiert und erneut 3 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Eluat enthielt die RNA und wurde bei -80 °C in einem sterilen Eppendorfgefäß bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.3.2.7 c-DNA-Synthese

Die präparierte equine Leber mRNA musste anschließend in c-DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Kits Superscript II von Gibco.

Um die einzelsträngige mRNA in doppelsträngige cDNA umzuformen, wird zunächst die mRNA, die an einem Ende ihren Poly(A)-Schwanz trägt, mit kurzen Oligo-d(T)-Primern inkubiert. Dabei bilden sich Poly(A)-Oligo-d(T)-Hybride aus, welche als Matrizen und Primer für das Enzym Reverse Transkriptase wirken, die bei Zugabe von dNTPs zunächst den ersten Strang entlang der mRNA und dann den zweiten Strang entlang der im ersten Schritt synthetisierten cDNA verlängert. Dabei entsteht eine DNA/RNA Hybridhelix). Mit RNase H wird der RNA-Strang zerstört.

Für diese Reaktion wurden 4 µl der zu übersetzenden Poly(A)RNA und 1 µl eines Oligo-d(T) Primers in ein steriles Reaktionsgefäß pipettiert und mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 70°C und kurzem Abkühlen auf Eis wurden 4 µl First Strandbuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl dNTP Mix zugegeben. Das Gemisch wurde nun gevortext, für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend mit 1 µl des Enzyms Superscript II versetzt und gevortext. Hiernach erfolgte eine fünfzigminütige Inkubation bei 42°C, danach 15 Minuten bei 70°C. Nach Zugabe von 1 µl des Enzyms RNase H wurde noch einmal 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.3.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR Produkte erfolgte durch die Firma SRD in Oberursel.

4 Ergebnisse

4.1 Laborchemische und proteinbiochemische Charakterisierung des TBG bei den Perissodactyla

4.1.1 Schilddrüsenhormonparameter

Zur Bestimmung der Schilddrüsenfunktion wurde mittels automatisiertem Chemilumineszenz Assay auf einem ACS:180® der Firma Bayer (Fernwald) fT_4 , TT_4 und TT_3 in menschlichen und tierischen Serumproben untersucht. Dieser Nachweis ist ein kompetitiver Immunoassay. Die Messung wurde im endokrिनologischen Routinelabor am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

	fT_4 pmol/l	TT_4 nmol/l	TT_3 nmol/l
Mensch MW	15	85	1,92
Mensch RB	10 - 25	58 - 154	1,23 – 3,08
Pferd n = 3 MW \pm SD	14 \pm 2	15 \pm 1	1,08 \pm 0,10
Esel n = 1	14	< 14	0,82
Tapir n = 1	7	16	0,45
Nashorn n = 1	25	43	0,61
Zebra n = 3 MW \pm SD	21 \pm 4	16 \pm 2	0,86 \pm 0,20

Tab. 3: **Schilddrüsenfunktionsparameter des Menschen und von Vertretern der Perissodactyla**

Das humane Serum unterscheidet sich von den Perissodactyla-Seren nur beim T_4 deutlich, als Hinweis auf eine verminderte T_4 -Bindungskapazität der Perissodactyla. Beim Menschen sind der Mittelwert (MW) und der Referenzbereich (RB) eines Normalkollektivs (N = 4000), beim Pferd und Zebra MW und Standardabweichung (SD) und bei den anderen Tieren sind Einzelbestimmungen angegeben.

4.1.2 T₄-Bindungstest

Mit dem T₄-Bindungstest wird die relative Bindungskapazität von T₄ zu TBG bestimmt. Hierbei kann nicht zwischen Veränderungen der Bindungsaffinität oder der tatsächlichen Bindungskapazität unterschieden werden. Es dient als Screening um herauszufinden, ob TBG in der zu untersuchenden Serumprobe vorhanden ist. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde bei jedem Testlauf menschliches Vergleichsserum mitgetestet. Als Vergleichsperson wurde hierbei ein gesunder männlicher Proband mit normalem TBG-Spiegel verwendet, der auch bei allen anderen Untersuchungen des Labors als Vergleich herangezogen wurde. Die untersuchten Perissodactyla-Proben hatten im Vergleich zum Menschen eine relative Bindungskapazität von 10-25% (Abb. 12).

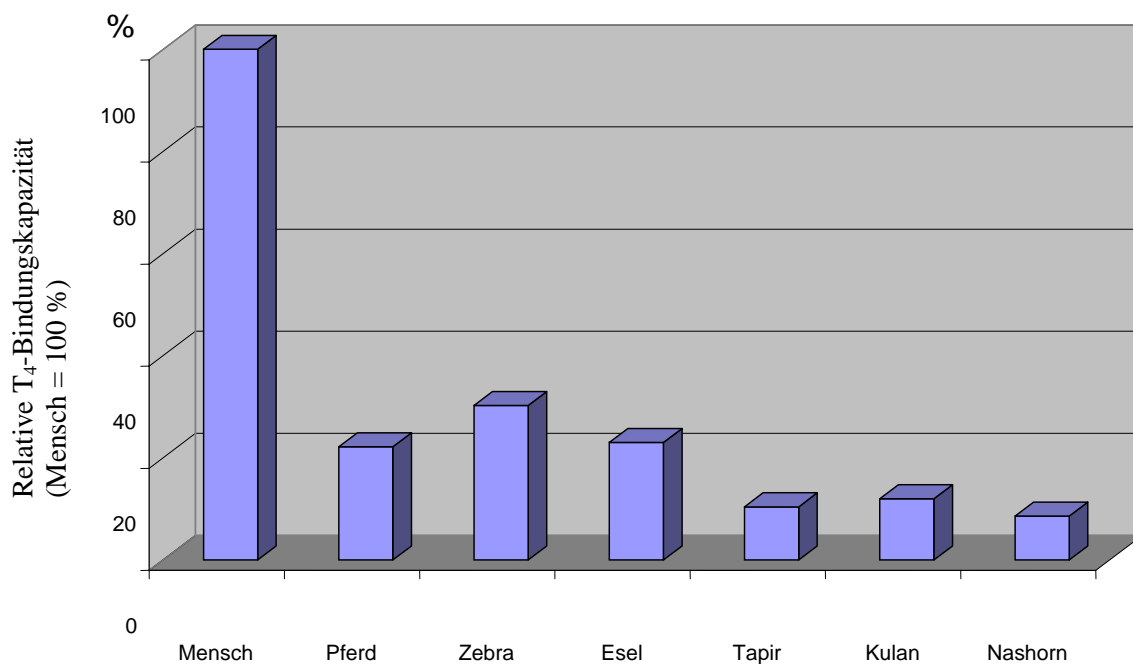


Abb. 12: T₄ Bindungstest

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob TBG in der zu untersuchenden Serumprobe vorhanden ist, wurde zunächst ein T₄ Bindungstest durchgeführt. Abbildung 12 zeigt die Bindungskapazität von T₄ zu TBG in % bei Mensch und Perissodactyla. Die untersuchten Perissodactyla-Proben hatten im Vergleich zum Menschen eine relative Bindungskapazität von 10 – 25%.

4.1.3 Kompetitiver Verdrängungsassay nach Scatchard

Um die Menge an TBG und die Bindungsaffinität von TBG zu T_4 zu bestimmen, wurde eine Scatchardanalyse durchgeführt. Es wurde ein Resin- T_4 -Bindungstest verwendet, die Auswertung erfolgte nach der 1949 von Scatchard beschriebenen Methode (Scatchard 1949). Die Bindungsaffinität des equinen TBG zu T_4 glich der des humanen TBG (Abb. 13). Die Affinitätskonstante K_a betrug beim Menschen $1,1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, und beim Pferd $1,2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Sowohl das Zebra als auch das Nashorn hatten eine deutlich reduzierte Bindungsaffinität ihres TBG. Die Absolutwerte der Affinitäten sind in der Tabelle 4 dargestellt. Die TBG-Serumkonzentration der untersuchten Perissodactyla war erheblich niedriger als beim Menschen (Tab. 4).

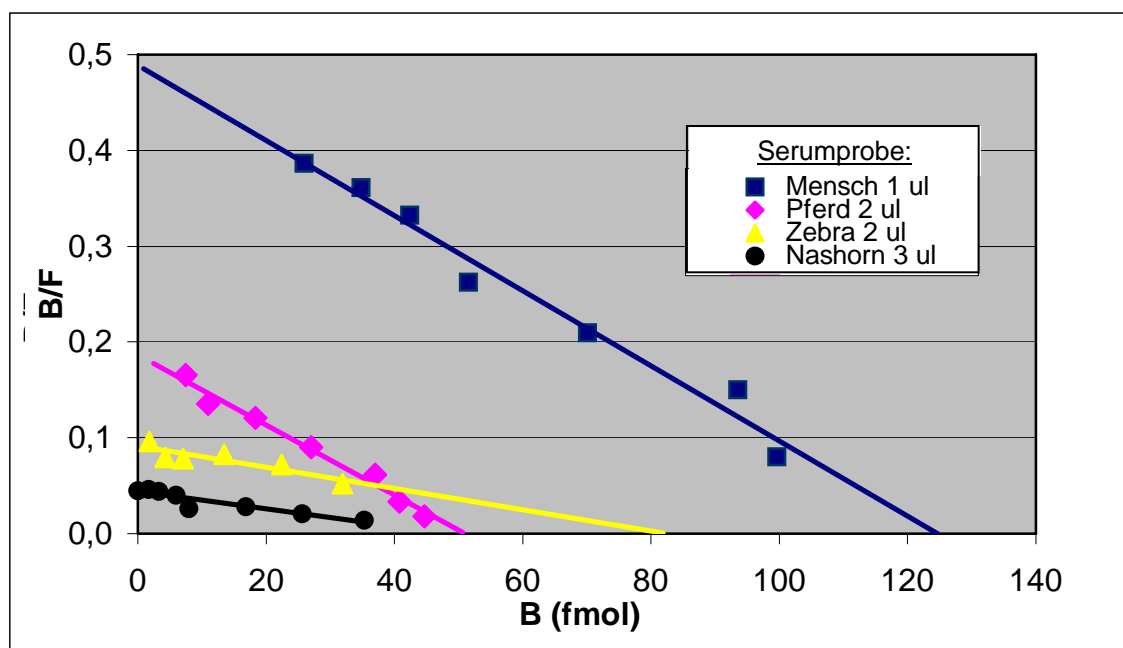


Abb. 13: Scatchardanalyse der T_4 -Bindung von humanem Serum im Vergleich zu Pferd, Zebra und Nashorn

(repräsentative Darstellung von jeweils mindestens drei Experimenten). Von den verschiedenen Serumproben wurden unterschiedliche Mengen eingesetzt, um alle Proben im optimalen Messbereich des Scatchards zu bestimmen. Die Mengenangabe (B in fmol) entspricht $950 \mu\text{l}$ des Testansatzes von 3 ml , so dass die tatsächliche TBG-Menge dem 3,16 fachen des dargestellten Messwertes entspricht.

Probe	Ka [10^{10} M^{-1}]	n
Mensch	1,11	9
Pferd	1,20	7
Zebra	0,42	9
Nashorn	0,27	1

Tab. 4: **Bindungsaffinität nach Scatchard**

Die Bindungsaffinität wurde aus dem Scatchardassay (siehe Abb 11) als reziproke Steigung der Kurve ermittelt. Die unterschiedliche Anzahl der Messungen ergab sich aus der Zahl der verschiedenen Serumproben (Mensch: nur eine Referenzprobe neunmal gemessen; Pferd: 3 Tierseren ein - bis dreimal gemessen; Zebra: 3 Tierseren je 3 mal gemessen; Nashorn: nur eine Probe für eine Messung vorhanden).

Probe	TBG MW \pm SD in fmol/ μ l = nmol/l	%	n
Mensch	330 \pm 64	100	9
Zebra	103 \pm 63	31	9
Pferd	90 \pm 18	27	7
Nashorn	49	15	1

Tab. 5: **TBG Serumkonzentration nach Scatchard**

Die Serumkonzentration des TBG errechnet sich als maximale T_4 Bindungskapazität im Scatchardassay pro 950 μ l (siehe Abb 11) mal 3,16 wegen des Gesamtvolumens von 3 ml geteilt durch die eingesetzte Serummenge (1,2 oder 3 μ l). Die molare Konzentration in nmol/l kann durch Multiplikation mit 0,054 in mg/l umgerechnet werden.

4.1.4 Analyse der Hitzestabilität von TBG der Hippomorpha

Als empfindlichster Parameter für die Stabilität des TBG wurden Hitzedenaturierungen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Dazu wurde die residuale T_4 -Bindungskapazität nach Erhitzen der Proben auf eine definierte Temperatur nach verschiedenen Zeitspannen bestimmt. Die Halbwertszeit der Denaturierung entspricht der Steigung der linearen Regression der Abnahme der T_4 -Bindung.

Zuerst wurde eine Hitzedenaturierung bei 50°C mit Serum von einem Wallach (Pferd L), einer Stute (Pferd D) und einem Menschen durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass das menschliche Serum sowie das des Wallachs weitgehend stabil bleiben, während das der Stute diskret instabiler ist (Abb. 14).

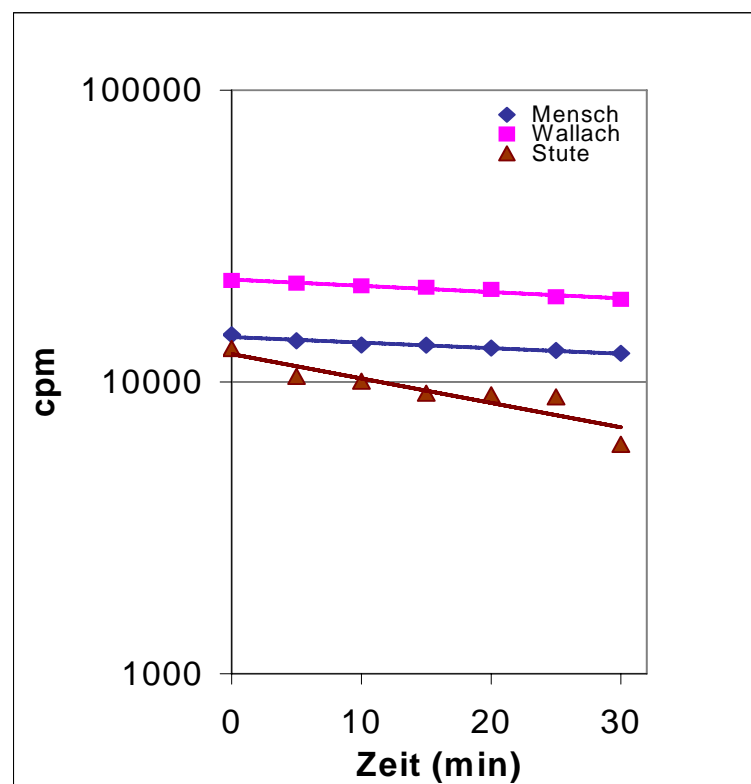


Abb. 14: Hitzestabilität von TBG von Mensch, Wallach und Stute bei 50°C

Die Serumproben wurden für die angegebenen Zeiten von 0 bis 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde im T_4 Bindungstest die residuale Bindungskapazität bestimmt. Der Abfall der Bindungskurve entspricht der Instabilität des TBG; je steiler, desto weniger stabil. Bei 50°C fand sich beim Pferd nur eine geringe Instabilität des TBG.

Anschließend wurde eine Hitzedenaturierung mit denselben Serumproben bei 60°C durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, daß das Pferdeserum bereits nach 10 Minuten völlig denaturiert ist (Abb. 15). Die HWZ des equinen TBG ist im Vergleich zum Menschen auf 15% reduziert. Erwartungsgemäß ist auch das menschliche Serum bei 60°C deutlich instabiler als bei 50°C.

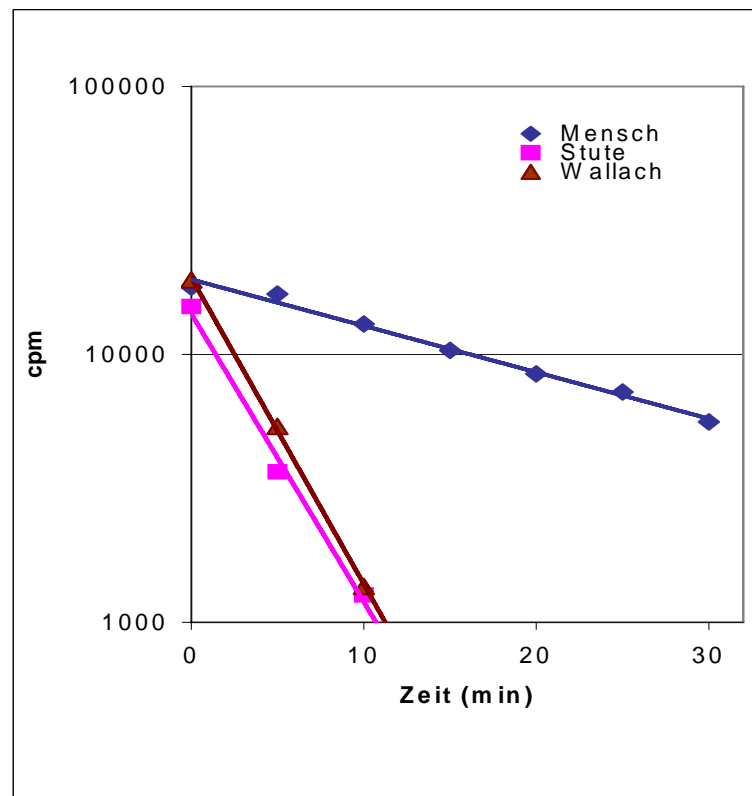


Abb. 15: **Hitzestabilität von TBG von Mensch, Wallach und Stute bei 60°C**

Die Stabilität der TBG – Proben wurde wie in Abb 14 bestimmt, allerdings bei 60°C. Dabei fand sich beim Pferd eine auf 15% reduzierte Stabilität des TBG, verglichen mit den Referenzproben vom Menschen.

Als optimale Denaturierungstemperatur der Perissodactyla-Seren konnte somit 55°C etabliert werden, bei der die Hitzestabilität der verschiedenen Proben am besten diskriminiert werden konnten. Bei dieser Temperatur ist menschliches TBG weitgehend stabil, alle Tier-TBGs wiesen eine Hitzeinstabilität auf.

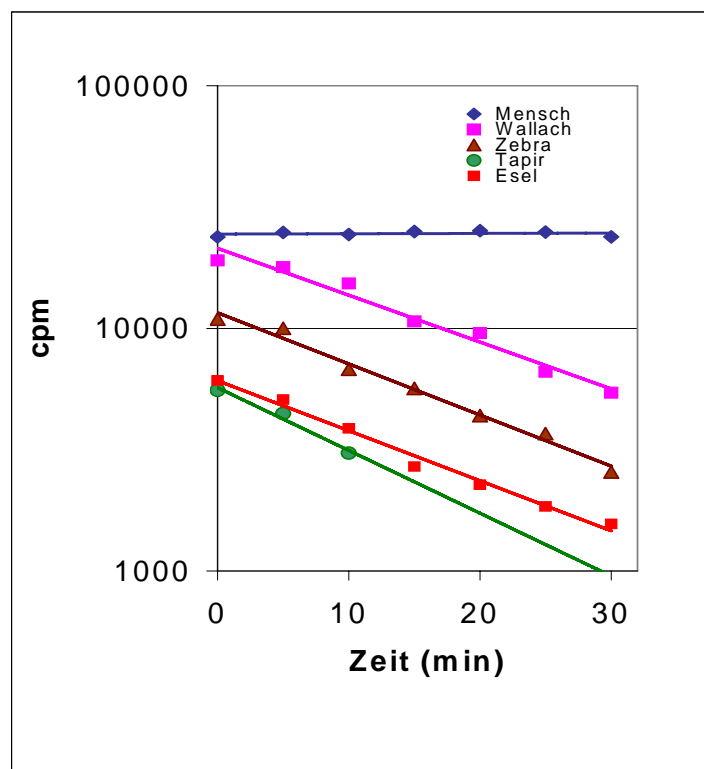


Abb. 16: **Hitzestabilität des TBG vom Menschen im Vergleich zu den Perissodactyla bei 55°C.**

Die Messung erfolgte wie in Abb. 14 beschrieben. Während das TBG im menschlichen Serum bei dieser Temperatur weitgehend hitzestabil war, wiesen Pferd, Zebra und Esel eine deutlich geringere Hitzestabilität auf. Die geringste Hitzestabilität hatte das TBG vom Tapir.

Um den Einfluss unbekannter Störfaktoren auszuschließen, die sich in dem equinen, nicht jedoch im humanen Serum befinden und die reduzierte Hitzestabilität erzeugen können, wurden humanes und equines Serum im Verhältnis 1:10 gemischt. Die resultierende Kurve verläuft zweiphasig. Zunächst zeigt die Kurve einen Mittelwert aus humaner und equiner Rest-Bindungskapazität. Nach etwa 6,8 Minuten, wenn das equine TBG kaum mehr T_4 bindet, verläuft die Kurve parallel der des ungemischten humanen Serums. Daraus folgt, dass die reduzierte Hitzestabilität des equinen TBG nicht durch beeinflussende Serumfaktoren bedingt sein kann, da diese bei gleichen immunologischen Eigenschaften von equinem und humanem TBG (van der Walt und van Jaarsveld 1978) auch mit dem humanem interagieren würden. Die verminderte Hitzestabilität des equinen TBG ist also auf unterschiedliche Struktureigenschaften

zurückzuführen. Ähnliche Untersuchungen haben dies auch für Rinder- und Schweine-TBG zeigen können (Lahner et al. 2000).

Im Analogieschluss sind auch die veränderten Hitzestabilitäten der anderen Perissodactyla-TBG auf strukturelle Unterschiede der Proteine und nicht auf Serumfaktoren zurückzuführen. In Tabelle 6 sind die Halbwertzeiten der Denaturierung menschlicher und equiner TBGs bei verschiedenen Temperaturen in einer Übersicht dargestellt.

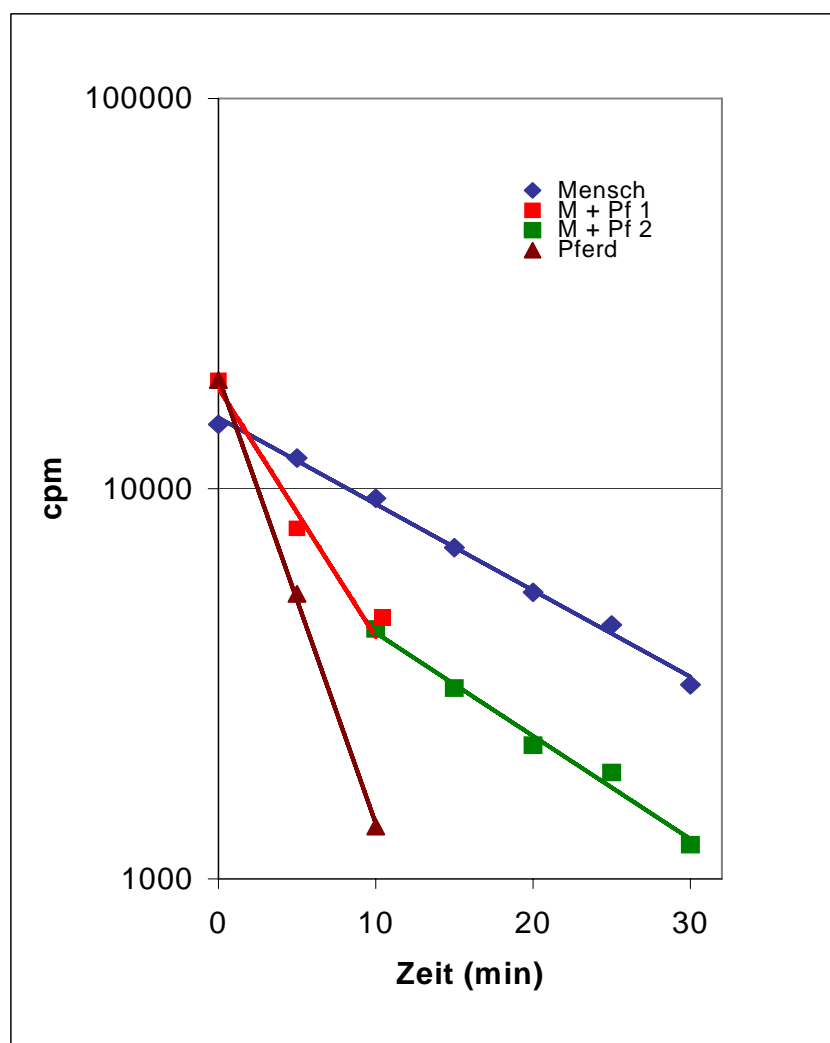


Abb. 17: Hitzestabilität des TBG aus equinem und humanem Serum und einer Mischprobe zum Ausschluss von Störfaktoren im equinem Serum

Die gemischte Probe Mensch und Pferd (M + Pf) enthielt humanes und equines Serum im Verhältnis 1:10. Die Messung der Hitzestabilität erfolgte wie in Abb.14 dargestellt. Die zwei Anteile der „gemischten“ Scatchardkurve (M+Pf 1 und M+Pf 2) beweisen den Unterschied der beiden TBGs, da sie Serumfaktoren als Ursache der unterschiedlichen Hitzestabilität ausschließen, da sich dann eine Kurve mit nur einer Bindungsaffinität und nicht wie hier zwei Kurven mit zwei unterschiedlichen Affinitäten ergeben hätte.

Probe	Halbwertzeit (min)	
50°C		
Mensch	227,0	
Pferd L	204,0	
Pferd D	51,8	
55°C		
Mensch	stabil	
Pferd L	22,4	
Zebra	20,2	
Esel	21,0	
Tapir	16,7	
60°C		
Mensch	25,0	
Pferd L	3,7	= 15%
Pferd D	4,0	= 16%
60°C, gemischtes Serum (Mensch und Pferd)		
Mensch	19,6	
Pferd	3,8	auf 1/5 reduziert
Mensch und Pferd	16,4 und 6,8	

Tab. 6: Ergebnisse der Hitzedenaturierungen bei 50°C, 55°C und 60°C

4.2 Molekularbiologische Charakterisierung des equinen TBG

Ausgehend von einem Alignment der bekannten TBG-Sequenzen von Mensch, Ratte, Schaf und Rind wurden Regionen möglichst hoher Sequenz-Homologie bestimmt. Aus diesen Regionen wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 25 bp synthetisiert. Diese Primer wurden in PCRs eingesetzt, die als Matrize genomische DNA aus equinem Vollblut bzw. c-DNA aus equiner Leber enthielten. Diesem Vorgehen liegt der Gedanke zugrunde, daß das TBG-Gen in Regionen großer Homologie zwischen Menschen, Ratten, Schafen, Schweinen und Rindern wahrscheinlich auch bei Pferden eine gut konservierte Sequenz aufweist und die Oligonukleotide damit TBG-spezifische, jedoch Spezies-unspezifische Primer in der PCR darstellen.

Das Vorgehen zur Sequenzierung der cDNA ist in Abb. 18 dargestellt. Die Primer und ihre Lokalisation sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Exon-Intron Grenzen wurden durch Sequenzierung der genomischen DNA bestimmt, sie waren mit denen beim menschlichen TBG und der anderer Tier-TBGs identisch.

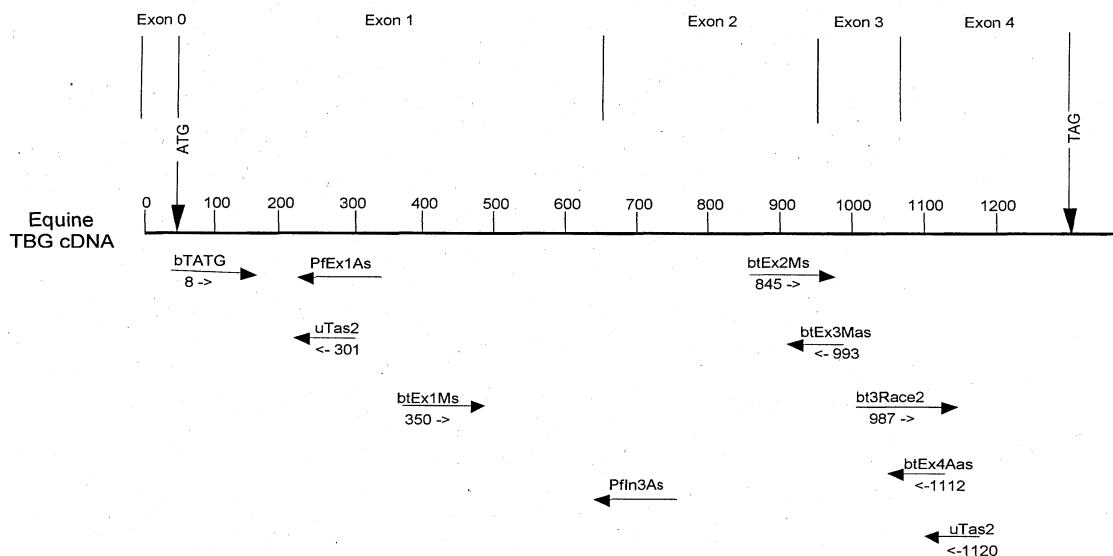


Abb. 18: Schematische Darstellung der cDNA-Sequenzierungsreaktionen

Die equine TBG cDNA ist zur besseren Darstellung in Blöcke à 100 bp gegliedert. Darüber sind die Exon-Intron-Grenzen angegeben. Die einzelnen Primer und ihre Lokalisation nach Basenpaaren werden durch Pfeile symbolisiert (Länge nicht maßstabsgetreu). Dabei bedeuten: bT = bovines TBG, Pf = equines TBG, uT = Spezies-unspezifisches TBG, Ex (gefolgt von einer

Zahl) = entsprechendes Exon, ATG = Startcodon, A = Anfang, M = Mitte, (des Exons), s = sense, as = antisense, TAG = Stop Codon

Primer	Sequenz	Lokalisation
Bt ATG (s)	5'-ATTAACCTTCCTTCCAAAATG-3'	Exon 1, 8
Pf Ex1As	5'-CCACATGACTATTGATCTCCTGC-3'	Exon 1, 322
Bt Ex1 M s (s)	5'-GCTTCCAGCACCTGATCTGTTC-3'	Exon 1, 350
Bt Ex2 M s (s)	5'-AGATGGAGTGGGTGGAAGGG-3'	Exon 2, 845
Bt Ex3 M as (as)	5'-GATGCCCATCTTCAGAAGGA-3	Exon 3, 993
Bt3Race 2 (s)	5'-GGGCATCCAGGATGCTTTTGCTGAC-3	Exon 3, 987
Pf In3 As	5'-CTCAGTCTCACCTGTACCGTTATGC-3'	Intron 3, 737
Bt Ex4 A as (as)	5'-ACGGCTTCAGTCCCTTTTCAC-3'	Exon 4, 1112
UT as 2 (as)	5'-ACTACGCTTCCGTTGGGTTCACAACCTT-3	Exon 1, 1120

Tab. 7: als Primer verwendete Oligonukleotide

Die Zahlenangaben der Lokalisation beziehen sich auf die erste komplementäre Base in 5'-Richtung.

4.3 Glykosilierungsstellen des equinen TBG

Die potentiellen Glykosilierungsstellen des equinen TBG, die bei N-glykosidischer Verknüpfung (an Asparagin) durch die Sequenz Asn-Xxx-Ser/Thr gekennzeichnet sind, befinden sich an denselben Stellen wie bei den anderen bekannten TBGs, wenn die Verschiebung um drei Aminosäuren berücksichtigt wird, die sich aus der Insertion dreier Aminosäuren bei allen Tieren nach Position 3 der humanen TBG-Aminosäuresequenz ergibt (s. Tab. 8). Die Insertion ermöglicht bei Schweinen, Ratten und Pferden eine zusätzliche potentielle Glykosilierungsstelle. Position 391 wird im humanen TBG nicht benutzt (Zinn et al. 1978). Das equine reife TBG besteht demnach

aus drei Aminosäuren mehr als das humane. Das TBG des Pferdes setzt sich aus 398 Aminosäuren zusammen.

	Potentielle Glykosilierungsstellen					
Mensch	-	16	79	145	233	391
Rind	-	19	82	148	236	-
Schwein	4	19	82	148	236	-
Schaf	-	19	82	148	236	-
Ratte	4	19	82	148	236	-
Pferd	4	19	82	148	236	-

Tab. 8: **Glykosilierungsstellen bekannter TBG**

Die Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen nach Abspaltung des Signalpeptids.

4.4 Sequenzvergleich des equinen TBG mit anderen Spezies

Ausgehend von dem als Grundlage benutzten Alignment der TBG-Sequenzen von Mensch, Schaf, Ratte und Rind kann nach erfolgreicher Aufklärung der Primärstruktur des equinen TBG ein Sequenzvergleich vorgenommen werden.



Abb. 19: Alignment bekannter TBG-Sequenzen

Die Numerierung über den Sequenzen entspricht der des menschlichen TBG mit Signalpeptid, die Zahlen an der linken Seite stellen die fortlaufende Aminosäure positiv der verschiedenen TBGs dar. Im Alignment sind alle Aminosäuren, die den menschlichen identisch sind gelb hinterlegt. Interessanterweise gibt es etliche Positionen, die bei allen Tieren gleich, aber anders als beim menschlichen TBG sind.

Eine statistische Auswertung der Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen bekannten TBG-Aminosäure-Sequenzen gibt die Tab. 9 wieder.

	Mensch	Beluga	Delphin	Schwein	Rind	Schaf	Ratte	Pferd
Mensch		82,3	80,4	82,1	81,6	81,1	74,6	83,5
Beluga			95,7	90,2	91,4	91,6	75,6	87,8
Delphin				87,8	89,3	89,0	76,8	86,9
Schwein					89,2	89,5	74,2	87,3
Rind						95,9	75,6	86,9
Schaf							74,9	85,9
Ratte								76,6

Tab. 9: **Homologievergleich bekannter TBG-Nukleinsäure-Sequenzen**

Als Homologie ist der Prozentsatz identischer Nukleinsäuren angegeben.

Der Sequenzvergleich der verschiedenen TBGs ermöglicht die Konstruktion eines phylogenetischen Baumes, bei dem die Ähnlichkeit anhand der Anzahl notwendiger Aminosäuresubstitutionen ermittelt werden

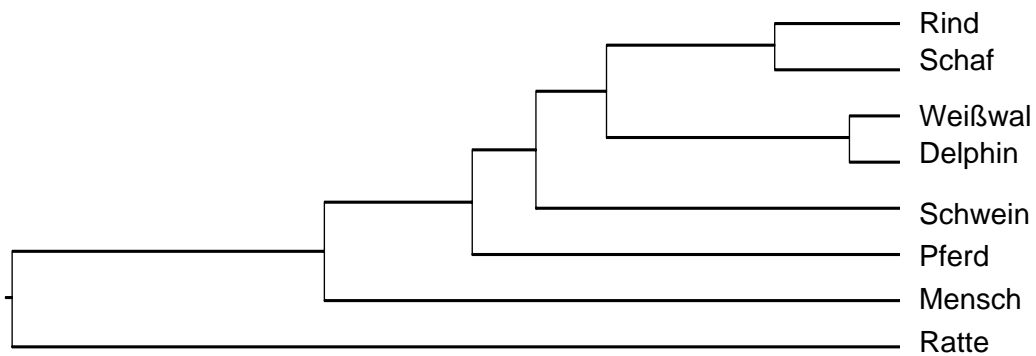


Abb. 20: **Phylogenetischer Baum des TBG**

Je höher der Verwandtschaftsgrad, desto weniger Substitutionen und desto näher bilden sich die Arten in der graphischen Darstellung ab.

5 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das TBG der Perissodactyla proteinbiochemisch sowie das equine TBG molekularbiologisch charakterisiert.

Anhand der dargestellten Ergebnisse sind folgende Fragen von Interesse:

- 5.1. Welche Aufgaben besitzt TBG ?
- 5.2. Welche strukturellen Eigenschaften sind für seine Funktion verantwortlich?
- 5.3. Wie sind die Ergebnisse im Zusammenhang mit dem derzeitigen Stand der Systematik zu interpretieren?
- 5.4. Können die gewonnenen Erkenntnisse über TBG einen Beitrag zur Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der Säugetiere (Phylogenesevergleich) leisten?

5.1 Aufgaben des TBG

Die Primärstruktur des TBG wurde bei den Spezies Mensch, Schwein, Rind, Ratte, Weißwal, Delphin und in der vorliegenden Arbeit auch für das Pferd aufgeklärt. Dabei zeigt sich ein hoher Grad an Homologie (vgl. Tab. 9 u. 10). Eine derartige Konservierung der Struktur eines Proteins zwischen einzelnen Spezies zeigt normalerweise eine hohe funktionelle Wertigkeit dieses Proteins an. Auch die beiden anderen Schilddrüsenhormontransportproteine, Transthyretin und Albumin, zeigen eine ähnlich hohe Konservierung ihrer Primärstrukturen (Peters 1985, Duan et al. 1995).

Angesichts der in Kapitel 2 beschriebenen Funktionen des TBG ist es einleuchtend, dass ein System dreier Schilddrüsenhormonbindungsproteine mit jeweils verschiedenen Affinitäten und Kapazitäten für T_4 und T_3 sowie unterschiedlichen Regulationen der Genexpression der Verwendung eines einzigen Proteins zur Sicherung einer ausreichenden Schilddrüsenhormonspeicherung und -verteilung überlegen ist. In der

Evolution scheint dieser Selektionsvorteil für die gute Konservierung der Primärstruktur des TBG bei verschiedenen Spezies verantwortlich zu sein. Die drei Bindungsproteine stellen ein Mehrkomponenten-Puffersystem dar, das eine gleichmäßige freie Schilddrüsenhormonkonzentration über einen weiten Bereich von Gesamtschilddrüsenhormonen gewährleistet und stellt damit ein optimiertes Puffersystem dar (Richardson und Schreiber 1997)

5.2 Struktur-Funktions-Korrelationen im TBG-Molekül

Bei der biochemischen Charakterisierung des *Perissodactyla*-TBG findet sich eine auf etwa 20-30% reduzierte Serumkonzentration im Vergleich zum Menschen. Die Bindungsaffinität für Thyroxin entspricht der humanen, wohingegen eine dem humanen in etwa vergleichbare Hitzestabilität nur bei 50 °C festgestellt werden konnte. Bei höheren Temperaturen zeigte sich eine deutlich verminderte Hitzestabilität.

TBG gehört aufgrund des hohen Grades der Homologie seiner DNA-Sequenz zu α_1 Proteinaseninhibitor (α_1 -PI, 53%), α_1 -Antichymotrypsin (ACT, 58%) und Corticosteroid-bindenden Globulin (CBG, 55%) wie diese zur Superfamilie der Serpine (siehe Kap. 2), in welcher das α_1 -PI das am besten untersuchte Protein ist (Flink et al. 1986, Hammond et. al. 1987). Im Gegensatz zu α_1 -PI konnte bei TBG bisher keine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden, weil die bisher erhaltenen TBG-Kristalle nicht für eine solche Untersuchung geeignet waren. Daher wird die Struktur des TBG vom α_1 -PI abgeleitet. Es wird vermutet, dass TBG drei β -Faltblattstrukturen, bezeichnet mit A1-A6, B1-B4 und C1-C3 besitzt. Die Bindungstasche für T_4 bzw. T_3 liegt zwischen den β -Faltblättern B und C, die zusammen eine Fass-Struktur (β -barrel) bilden (Haber und Carrell, 1989). Die Bindungsaffinität für T_4 aller bisher untersuchten TBGs ist in etwa gleich. Konservierte Bereiche entsprechen somit sehr wahrscheinlich Residuen mit einer hohen Bedeutung für die hochaffine T_4 -Bindung, nicht homologe Sequenzabschnitte haben wohl keine wesentliche Bedeutung für die Bindung des Thyroxin. Dies gilt insbesondere für die Ligandenbindungsregion des TBG, der von den Residuen 215-291 und 363-395 (hTBG ohne Signalpeptid) gebildeten β -barrel-Struktur (Huber und Carrell 1989, Grasberger et al. 1999).

Bei der Hitzestabilität zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen Perissodactyla und Paarhufern (Artiodactyla): während bei 55 °C das bovine TBG bereits nach knapp 4 Minuten auf die Hälfte reduziert ist, beträgt die HWZ in der Perissodactylagruppe etwa 20 Minuten. Auch beim Schwein beträgt die HWZ bei dieser Temperatur nur 5 Minuten. Der Wildtyp des menschlichen TBG hat eine Halbwertszeit von etwa 55 Minuten bei 55 °C. Die Chicago-Variante des menschlichen TBG hat eine erhöhte Hitzestabilität mit einer Halbwertszeit von 190 Minuten bei 56 °C. Die erhöhte Hitzestabilität korreliert mit einer Punktmutation, bei der im humanen TBG an Position 309 Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt ist. Im Vergleich mit dem Strukturmodell von α_1 -PI liegt dieser Tyrosin bzw. Phenylalaninrest in einer tiefen intramolekularen Tasche. Dort findet das Phenylalanin optimal Platz, während das Tyrosin des Wildtyp-TBG aufgrund seiner zusätzlichen Hydroxylgruppe mit der daraus resultierenden Hydrophilie und Notwendigkeit der Anlagerung eines zusätzlichen Wassermoleküls nicht in diese Tasche passt. Am Strukturmodell ist daher verständlich, dass der Wildtyp des menschlichen TBG weniger stabil ist als die Chicago-Variante. Alle bisher untersuchten Tier-TBGs und auch das Pferd haben an der entsprechenden Position ein Phenylalanin, so dass eigentlich eine höhere Hitzestabilität zu erwarten wäre als es tatsächlich der Fall ist. Da jedoch alle Tier-TBGs eine verminderte Hitzestabilität haben, muss es andere Bereiche im Molekül geben, die das Molekül destabilisieren.

Die im Vergleich mit allen Serpinen hochkonservierten Bereiche gehören mit größter Wahrscheinlichkeit zum Serpingrundgerüst. Sie sollten keine wesentliche Bedeutung für TBG-spezifische Funktionen haben. Dabei handelt es sich um 40% der Aminosäuren, die bei den in Abb. 8 dargestellten Serpinen identisch, und um weitere 20%, die zumindest ähnlich sind. Für die Untersuchung TBG-spezifischer Eigenschaften ist damit eine Fokussierung auf die restlichen 40% des Aminosäuregrundgerüsts möglich.

Bei allen Tieren befindet sich nach Residuum 3 der humanen TBG-Aminosäuresequenz eine Insertion dreier Aminosäuren. Bei Schwein, Ratte und auch Pferd befindet sich an Position 4 eine potentielle Glykosilierungsstelle. Durch die Insertion der drei Aminosäuren beträgt deren Gesamtanzahl beim Pferd und bei der Ratte 398, bei Schwein, Rind, Schaf, Delphin und Weißwal nur 396, da innerhalb der Sequenz zwei Aminosäuren fehlen. Die humane Aminosäuresequenz besteht aus 395 Aminosäuren. Die potentielle Glykosilierungsstelle an Position 4 bei den genannten Tieren und die an

Position 309 bei Mensch und Tier unterschiedliche Aminosäureabfolge (3 Aminosäuren) könnten in einem folgenden Projekt als Ansatzstelle für eine Mutagenese zur Untersuchung der Hitzestabilität dienen. An Position 309 befindet sich beim Menschen Tyrosin, anschließend Serin und Glutamat. Bei den Tieren ist die Reihenfolge Phenylalanin, Alanin und Aspartat.

Der Homologievergleich der einzelnen TBG-Sequenzen zwischen Mensch, Weißwal, Delphin, Schwein, Rind, Schaf und Pferd ergab einen sehr hohen Homologiegrad. Der phylogenetische Baum zeigt deutlich, dass sich das TBG der Ratte am meisten von den anderen untersuchten TBGs unterscheidet. Bei der Betrachtung des phylogenetischen Baumes fällt weiter auf, dass Weißwal und Delphin (Cetacea), Rind und Schaf (Artiodactyla) am ähnlichsten sind.

5.3 Interpretation der Ergebnisse im Zusammenhang mit dem derzeitigen Stand der Systematik

Der hohe Grad der Homologie zwischen doch sehr unterschiedlich erscheinenden Tieren wie Pferd, Weißwal, Delphin, Schwein, Schaf und Rind erfordert eine genauere Betrachtung der Ordnungen Perissodactyla, Artiodactyla (Paarhufer) und Cetacea (Wale und Delphine) bzw. ihre Stellung zueinander innerhalb der Systematik. Sowohl über die Stellung der Cetacea als auch über die Vertreter der Ordnung Perissodactyla herrscht keine einhellige Meinung.

In dem derzeitigen Standardwerk der Systematik der Säugetiere „Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference“ wird die Ordnung der Perissodactyla wie in Kapitel 2 dargestellt. Ursprünglich jedoch enthielt diese Ordnung, nach der Definition von Owen 1847 noch die so genannten Schliefer (Hyracoidea) (Fischer und Tassy 1988). Dies sind kaninchengroße murmeltierartige Pelztiere, deren Eigentümlichkeiten eindeutig die Huftierverwandtschaft nachweisen: der Bau der Krallen, der nashornähnliche Aufbau der Backenzähne sowie die wie bei Elefanten ständig nachwachsenden Schneidezähne. Sie besitzen keine Eckzähne, an den Vorderpfoten befinden sich vier, an den Hinterpfoten drei Zehen. An den abgerundeten Fingerbeeren sitzen flache schwarze Nägel, die sich teilweise deutlich bis auf die Unterseite der Zehen ausdehnen, so dass man erkennen kann, wie sich einmal der echte Huf der

Huftiere entwickelt haben könnte. Schliefer leben in Afrika. Die Kletterschliefer (Procaviidae) sind die einzige noch lebende Familie dieser Ordnung. Es werden drei Gattungen unterschieden: Baum-, Busch- und Klippschliefer.

Einige Autoren (Shoshani 1986, de Jong und Goodman 1982, Novacek 1982, 1986, Novacek und Wyss 1986) haben vermutet, dass die Hyracoidea näher verwandt sind mit den Tethytheria Sirenia (Seekühe) und Proboscida (Rüsseltiere) als mit den Perissodactyla (Prothero et al. 1988).

Prothero, Manning und Fischer weisen in „The phylogenie and classification of the tetrapods, Vol 2“ ausdrücklich auf die Tatsache hin, dass sowohl Dentalbefunde als auch andere Eigenschaften beweisen, dass Hyracoidea und Perissodactyla eine monophyletische Gruppe bilden. Ihren Untersuchungen zufolge finden sich mehrere Eigenschaften, die die These unterstützen, dass die Affinität der Hyracoidea zu den Perissodactyla größer ist als zu den Tethytheria (Sirenia und Proboscidea). Auch in einer Untersuchung zu den stammesgeschichtlichen Beziehungen zwischen Huftieren und Walen anhand der vergleichenden Anatomie des Verdauungstraktes (Langer 2000) werden Schliefer und Equidae als eine monophyletische Gruppe behandelt.

Die Debatte über die Zugehörigkeitsverhältnisse der Hyracoidea wurde durch ein Ungleichgewicht der anatomischen Beweise erzeugt. Die Paenungulata, bestehend aus Hyracoidea, Proboscidea und Sirenia, weisen eine Verwachsung der Karpalelemente, die Reduktion von Schädelbasisknochen und andere Besonderheiten auf. Einige lebende Perissodactyla teilen jedoch mit den Hyracoidea bemerkenswerte und sehr bizarre Spezialisierungen wie die Ausweitung der Eustachschen Röhre (Luftsack) in der Mittelohrregion. Molekulare Ergebnisse wie die Aminosäuresequenz des α -crystallin der Linse und andere Proteine unterstützen wiederum die Gruppierung mit den Paenungulata.

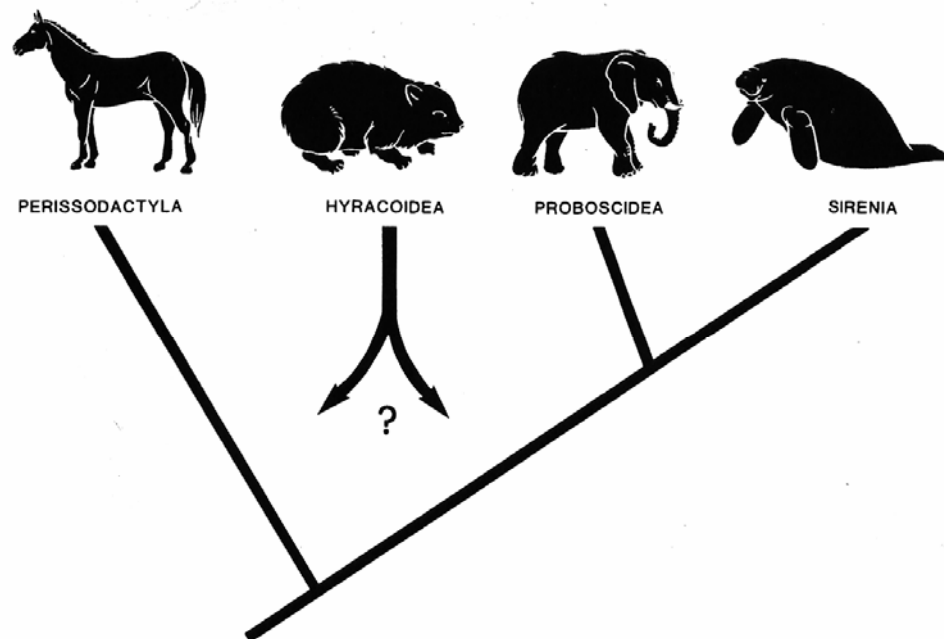


Abb. 21: Stellung der Hyracoidea in der Systematik (aus: Nature 356 [1992])

Es wäre daher interessant, das TBG-Gen des Schliefers zu sequenzieren und nachfolgend einen Vergleich mit den anderen Säugetier-TBGs durchzuführen, um den Homologiegrad zu bestimmen. Vielleicht könnte damit ein Beitrag zur Klärung der Stellung der Hyracoidea innerhalb der Systematik geleistet werden.

In verschiedenen Studien wird die Meinung vertreten, dass Artiodactyla und Cetacea eng verwandt sind innerhalb der noch vorhandenen Taxa und eine monophyletische Gruppe bilden (Novacek 1992, Graur 1993, Honeycutt und Adkins 1993, Irwin und Arnason 1994, Milinkovitch et al. 1994, Hasegawa et al. 1997, de Jong 1998, Broham et al. 1999, Berta und Sumich 1999).

Einige Studien ordnen die Cetacea sogar den Paarhufern zu: Graur und Higgins (1994), Gatesy (1997), Ursing und Arnason (1998), Milinkovitch et al. (1998), Nikaido et al. (1999). Kumar und Hedges (1998) postulieren auf der Basis einer molekularen Zeitleiste, dass die Certartiodactyla (Wale plus fossile Mesonychien [ausgestorbene Gruppe großer landlebender Säugetiere, die vor 65-55 Millionen Jahren lebten] plus Artiodactyla) sich vor 80 Millionen Jahren von den Carnivora und Perissodactyla getrennt haben.

Ein Vergleich des Verdauungstraktes von Huftieren und Walen (Langer 2000), bei dem 20 morphologische Merkmale sowie die Produktion oder Nichtproduktion von Methan berücksichtigt wurde, zeigte jedoch deutlich, dass alle Huftiere (Sirenia, Proboscidea, Hyracoidea, Equidae und Artiodactyla) von den Cetacea getrennt sind.

Morphologische kladistische Analysen wiederum haben gezeigt, daß die Cetacea eng verwandt mit einem oder mehreren Mesonychien sind; molekulare Analysen haben aber gezeigt, dass sie die Schwester-Gruppe der Hippopotamiden (Flusspferde) sind. (Thewissen et al. 2001). Das Ergebnis einer von Thewissen, Williams, Roe und Hussain an Fossilfunden von ausgestorbenen terrestrischen Cetacea in Pakistan durchgeführten Untersuchung war, dass die Cetacea näher mit den Artiodactyla als mit Mesonychien verwandt und keine Schwestergruppe der Flußpferde sind.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des Sequenzvergleichs der vorliegenden Arbeit kann, wie im phylogenetischen Baum dargestellt, die Nähe von Rind und Schaf zu den Cetacea dokumentiert werden. Es fällt jedoch auf, dass das Schwein weiter entfernt ist.

5.4 Können die gewonnenen Erkenntnisse über TBG einen Beitrag zur Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse der Säugetiere (Phylogensevergleich) leisten?

Aussagen der molekularen Phylogenie sind Teil der Evolutionsgeschichte. Da alle Aussagen zur Evolutionsgeschichte strenggenommen Hypothesen bleiben, kann man sie nicht experimentell beweisen. Diese Einschränkung gilt natürlich auch für die molekularen Ergebnisse. Je länger aber die Sequenz und je vollständiger die Datensätze sind, die untersucht werden, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, über solche Analysen die realen Evolutionsereignisse zu rekonstruieren. Es gibt einige experimentelle Befunde, welche die Validität molekularer Daten belegen. Walter Fitch und William Atchley untersuchten Allozymvariationen in einer Linie von Labormäusen, die seit 70 Jahren kontrolliert gezüchtet wird und von der man die Phylogenie der letzten 70 Jahre genau kennt. Die molekularen Daten konnten die bekannte zugrunde liegende Phylogenie exakt rekonstruieren, während streng kladistisch ausgewertete morphologische Daten zu gänzlich anderen Ergebnissen kamen (Storch et al. 2001).

1963 beschrieb Zuckerkandl die Molecular Clock-Hypothese, die besagt, dass die Anzahl von Mutationen in zwei verwandten Genen abhängig von der Zeit ist, die seit dem gemeinsamen Vorläufergen vergangen ist. Man kann also Aussagen treffen, wie viele Millionen Jahre zwei Gene phylogenetisch voneinander entfernt sind. Auf diese Weise erstellt man einen Stammbaum für ein einziges Merkmal (s. Kap. 3) Es wird jedoch immer wichtig bleiben, die so erstellten Stammbäume mit Hilfe anderer Methoden wie der Morphologie zu vergleichen, um sichere phylogenetische Aussagen treffen zu können.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse und die sich anschließenden denkbaren weiteren Projekte wie die Sequenzierung des TBG-Gens der Schliefer können einen Beitrag bei der Untersuchung der evolutiven Zusammenhänge der Säugetiere leisten.

6 Zusammenfassung

Das TBG ist das wichtigste Transportprotein für Schilddrüsenhormone im Blut der meisten Säugetiere. Unter physiologischen Bedingungen sind mehr als 99% des im Blut zirkulierenden Thyroxins an Trägerproteine, in erster Linie an das TBG, gebunden. Es besitzt zum einen eine außergewöhnlich hohe Bindungsaffinität zu Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3), zum anderen eine große Spezifität für diese Moleküle und ist daher zum Studium der komplexen Interaktion zwischen einem Transportprotein und seinem physiologischen Liganden hervorragend geeignet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration des Perissodactyla-TBG auf etwa 10-25% im Vergleich zum Menschen reduziert ist. Die Bindungsaffinität für T_4 entspricht der des humanen, wohingegen eine vergleichbare Hitzestabilität nur bei 50°C festgestellt werden konnte. Bei Temperaturen über 50°C wurde eine deutliche Hitzeinstabilität des Perissodactyla-TBG gegenüber dem humanen nachgewiesen.

TBG gehört aufgrund des hohen Grades der Homologie seiner DNA-Sequenz zu α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1 -PI), α_1 -Antichymotrypsin und Cortisol-bindendem Globulin wie diese zur Superfamilie der Serpine. Die Struktur des TBG wird daher vom α_1 -PI abgeleitet. Eine exakte Charakterisierung der Eigenschaften des TBG würde die Aufklärung seiner Röntgenkristallstruktur erfordern, die bisher jedoch noch nicht gelang. Der Schlüssel zum genauen Verständnis der hochaffinen Bindung des TBG ist die Analyse seiner Primärstruktur, insbesondere im Bereich der Ligandenbindungsstelle.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Sequenzierung des equinen TBG durchgeführt und diese anschließend mit anderen bereits sequenzierten Säugetier-TBGs verglichen. In der molekularbiologischen Analyse ergibt sich ein sehr hoher Homologiegrad zwischen equinem TBG, dem der bereits sequenzierten Säugetiere und dem Menschen. Das equine TBG weist – wie auch das der Ratte und des Schweins – eine zusätzliche Glykosilierungsstelle auf.

Als dritter Aspekt der Arbeit wurde anhand der Sequenzdaten ein phylogenetischer Baum konstruiert, der die Verwandtschaft von Rind und Schaf (Artiodactyla) sowie von Beluga (Weißwal) und Delphin (Cetacea) und auch der Artiodactyla mit den Cetacea

zeigt. Das Pferd und damit die Perissodactyla stellen erwartungsgemäß eine eigene Ordnung dar. Die molekulare Phylogenie ist eine Ergänzung der morphologischen Systematik.

7 Summary

TBG is the most important transport protein for thyroid hormones in the blood of mammals. Under physiological conditions more than 99% of the circulating thyroxine are bound to transport-proteins, primarily to TBG. TBG has an exceptionally high binding affinity to T₄ and T₃ and a high specificity for these molecules.

Therefore TBG is especially suited for the investigation of the complex interaction between a transport protein and its physiological ligand.

In the present dissertation it was found that the serum concentration of TBG in *Perissodactyla* was reduced to about 10-25% of the human serum TBG concentration. The binding affinity of *Perissodactyla* TBG for T₄ was comparable to human TBG. While the heat stability of *Perissodactyla* TBG was similar to human TBG at a temperature of 50°C, it was strongly reduced at temperatures above 50°C.

Because of its high DNA sequence homology, TBG belongs to the superfamily of the serpins, like α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -PI), α_1 -antichymotrypsin and cortisol binding globulin. For this reason the structure of TBG can be deduced from that of α_1 -PI. In order to characterize the properties of TBG the analysis of its cristall structure would be very helpfull, but unfortunately didn't succeed yet. The key for a correct understanding of the high binding affinity of TBG is the analysis of its primary structure, especially in the proximity of the ligand binding site. Therefore, in the second part of the dissertation, the sequence of equine TBG was obtained and compared to known mammalian TBG sequences. Alignment analysis revealed a very high level of homology of equine, human and the other mammalian TBGs. Equine TBG shows – like TBG of the rat and the pig – an additional glykosylation site.

As a third aspect of this dissertation a phylogenetic tree was created by using sequential data which shows the relationship between cattle and sheep as well as between beluga (white whale) and dolphin and also between artiodactyla and cetacea. Horses and therefore perissodactyla represent an order of its own. Molecular phylogeny has to be considered as an addition to the morphologic systematic of mammals.

8 Literaturverzeichnis

Ain, K. B. and S. Refetoff (1988)

Relationship of oligosaccharide modification to the cause of serum thyroxine-binding globulin excess.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 66, 1037-1043

Ashwell, G. and J. Harford (1982)

Carbohydrate-specific receptors of the liver.

Annu. Rev. Biochem. 51, 531-554

Benvenga, S. (1997)

A thyroid hormone binding motif is evolutionarily conserved in apolipoproteins.

Thyroid. 7, 605-611

Carrell, R. W., P. A. Pemberton, D.R. Boswell (1987)

The Serpins: Evolution and Adaption in a Family of Protease Inhibitors.

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. L. II, 527-535

Dahme, E. und E. Weiss (1999)

Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5. Auflage.

Enke Verlag

Dietz, O. und B. Huskamp (1999)

Handbuch Pferdepraxis, 2. Auflage.

Enke Verlag

Döcke und Friedemann (1994)

Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Auflage.

Gustav Fischer Verlag

Ekins, R. P., A. K. Sinha, M.R. Pickardt; J.M. Evans, F. Al Jatama (1994)

Transport of thyroid hormones to target tissues.

Acta Med. Austriaca 21, 26

- Emerson, C., C. Seiler; S. Alex, S.L. Fang, Y. Mori, W.J. DeVito (1993)
Gene expression and serum thyroxin-binding globulin are regulated by adrenal status and corticosterone in the rat.
Endocrinology 133, 1192-1196
- Fischer, M.S. and P. Tassy (1993)
The interrelation between Proboscidea, Sirenia, Hyracoidea, and Mesaxonia: The morphological evidence. In: Szalay, F.S., M.J. Novacek and M. C. McKenna (eds.)
Mammal Phylogenie – Placentals.
Springer Verlag
- Flink, I.L., T.J. Bailey, T.A. Gustafsson, B.E. Markham, E. Morkin (1986)
Complete amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin deduced from cloned DNA: Close homology to the serine antiproteases.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 83, 7708-7712
- Gärtner, R., R. Henze, K. Horn, C.R. Pickardt, P.C. Scriba (1981)
Thyroxine-binding globulin: Investigation of microheterogeneity.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 657-664
- Gersherngorn M. C., R. E. Lippoldt, Edelhoeh H, Robbins, J (1977)
Structure and stability of human thyroxine-binding globulin.
J. Biol. Chem. 252, 8719-8723
- Gershengorn, M. C., S. Y. Cheng; R. E. Lippoldt, R. S. Lord, J. Robbins (1977)
Characterization of human thyroxine-binding globulin. Evidence for a single polypeptide chain.
J. Biol. Chem. 252, 8713-8718
- Grasberger, H., C. Buettner and O. E. Janßen (1999)
Modularity of serpins. A bifunctional chimera possessing α_1 -proteinase inhibitor and thyroxin-binding globulin properties.
J. Biol. Chem. 274, 15046-15051

- Green, A. M., J. S. Marshall, J. Pensky, and J. B. Stanbury (1972)
Thyroxine-binding globulin: characterization of the binding site with a fluorescent dye as a probe.
Science 175, 1378-1380
- Hammond, G. L., C. L. Smith, J. S. Groping, D. A. Underhill, M. J. Harley, J. Reventos, N. A. Musto, G. L. Gunsalus, C. W. Bardin (1987)
Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84, 5153-5157
- Huber, R. and R. W. Carrell (1989)
Implications of the three-dimensional structure of α 1-antitrypsin for structure and function of the serpins.
Biochemistry 28, 8951-8966
- Hunt, L. T. and M. O. Dayhoff (1980)
A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and α ₁-proteinase inhibitor".
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 864-871
- Imamura, S., Y. Mori; Murata Y, Yamamori I., Miura Y., Oiso Y., Seo, H., Matsui N., Refetoff, S.(1991)
Molecular cloning and primary structure of rat thyroxine-binding globulin.
Biochemistry 30, 5406-5411
- Janßen O. E., Chen B., Buttner C., Refetoff S., Scriba PC. (1995)
Molecular and structural characterization of the heat-resistant thyroxine-binding globulin-Chicago
J Biol Chem. 270: 28234-8
- Janßen O. E., Golcher H.M., Grasberger H., Saller B., Mann K., Refetoff S. (2002)
Characterization of T(4)-binding globulin cleaved by human leukocyte elastase
J Clin Endocrinol Metab. 87: 1217-22

Joest, E. (1968)

Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 3. Auflage, Band III.
Paul Parey Verlag

Kambe, F., Seo H., Murata Y., Matsui N. (1988)

Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid coding for human thyroxine-binding globulin (TBG): existence of two TBG messenger ribonucleic acid species possessing different 3'-untranslated regions.
Mol Endocrinol 2: 181-5

Kraft, W. und U. M. Dürr (1999)

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 5. Auflage.
Schattauer Verlag

Kreil, G. (1981)

Transfer of proteins across membranes.
Annu. Rev. Biochem. 50, 317-348

Kwieceński, G., D. Damassa, Gustafson, AW. (1991)

Patterns of plasma sex hormone-binding globulin, thyroxine and thyroxine-binding globulin in relation to reproductive state and hibernation in female little brown bats.
J. Endocrinol. 128, 63-70

Lahner, H. (2000)

Proteinbiochemische und molekularbiologische Charakterisierung des bovinen TBG
Dissertation, angefertigt an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lahner, H., O.E. Janßen et al. (1998)

Primary Structure of Pig Thyroxine-binding Globulin and Characterization of the Protein. 25th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Athen

Langer, P. (2000)

Evidence from the digestive tract on phylogenetic relationships in ungulates and whales.
J. Zool. Syst. Evol. Res. 39, 77-90

- Murata Y., Refetoff S., Sarne DH., Dick M., Watson F. (1985)
Variant thyroxine-binding globulin in serum of Australian Aborigines: its physical, chemical and biological properties.
J Endocrinol Invest. 8: 225-32
- Nickel, R., A. Schummer und E. Seiferle (1992)
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I, 6. Auflage.
Paul Parey Verlag
- Otte, M. (1994)
Geschichte des Reitens. Von der Antike bis zur Neuzeit.
FN Verlag
- Owen, M. C., S. O. Brennan, J. H. Lewis, R. W. Carrell (1983)
Mutation of antitrypsin to antithrombin; α 1-Antitrypsin Pittsburgh (358 Met→Arg), a fatal bleeding disorder.
N. Engl. J. Med. 309, 694-698
- Peters, T. (1985)
Serum Albumin.
Adv. Protein Chem. 37, 161-245
- Refetoff, S. (1989)
Inherited Thyroxine-Binding Globulin Abnormalities in Man.
Endocr. Rev. 10, 143-161
- Robbins, J. (1996)
Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding.
In: Braverman, L. E. and R. D. Utiger (eds.) Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. Kap. 6, 96-110.
Lippincott-Raven Publishers Philadelphia, New York
- Robbins, J. and J. E. Rall (1952)
Zone electrophoresis in filter paper of serum I^{131} after radioiodide administration".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81, 530-536

Savu, L., R. Vranckx, M. Rouaze-Romet, M. Maya, E.A. Nunez, J. Treton, J.L. Flink (1991)

A senescence up-regulated protein: the rat thyroxin-binding globulin (TBG).

Biochim. Biophys. Acta 1097, 19-22

Schnorr, B. (1989)

Embryologie der Haustiere, 2. Auflage.

Enke Verlag

Schreiber, G. and S. Richardson (1997)

The Evolution of Gene Expression, Structure and Function of Transthyretin“.

Comp. Biochem. Physiol. 116B(2), 137-160

Silhavy, T. J., S. A. Benson, Emr, SD (1983)

Mechanisms of protein localization.

Microbiol. Rev. 47, 313-344

Skjoldebrand, L., J. Brundin, A. Carlstrom, T. Pettersson (1986)

Thyroxine-binding globulin in spontaneous abortion.

Gynecol. Obstet. Invest. 21, 187-192

Snyder, S. M., R. R. Cavalieri, I. D. Goldfine, S. H. Ingbar and E. C. Jorgensen (1976)

Binding of thyroid hormones and their analogues to thyroxine-binding globulin in human serum.

J. Biol. Chem. 251, 6489-6494

Storch, V. und U. Welsch (1997)

Systematische Zoologie, 5. Auflage.

Gustav Fischer Verlag

Storch, V., U. Welsch und Wink (2001)

Evolutionsbiologie.

Springer Verlag

The Systematics Association; M.J. Benton (1988)

Special Volume Nr.35B: The Phylogeny and Classification of Tetrapods, Vol 2:

Mammals. Clarendon Press

- Thewissen, J. G. M., E. M. Williams, L. J. Roe and S. T. Hussain (2001)
Skeletons of terrestrial cetaceans and the relationship of whales to artiodactyls.
Nature 413
- Tsykin, A. and G. Schreiber (1993)
Sheep thyroxine-binding globulin: cDNA sequence and expression.
Mol. Cell. Endocrinol. 98, 91-97
- Vranckx, R., M. Rouaze, L. Savu, E.A. Nunez, C. Beaumont, J.L. Flink (1990)
The Hepatic Biosynthesis of Rat Thyroxine Binding Globulin (TBG): Demonstration,
Ontogenesis, and Up-Regulation in Experimental Hypothyroidism.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 167, 317-322
- Wilson, D. E. and D.E. Reeder (1993)
Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference, 2nd edition.
Smithsonian Institution Press
- Wöckener, G. und L. Beerbaum (2001)
Lexikon für Pferdefreunde.
Bassermann Verlag
- Zinn, A. B., J. S. Marshall, D.M. Carlson (1978)
Carbohydrate structures of thyroxine-binding globulin and their effects on hepatocyte
membrane binding.
J. Biol. Chem. 253, 6768-6773

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, sehr herzlich bedanken.

Besonders danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. O.E. Janßen für die Überlassung des Themas sowie für seine Diskussionsbereitschaft und sein Verständnis. Die hervorragende Betreuung hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. R. Gerstberger für die freundliche Übernahme und Vertretung dieser Dissertation in der Veterinärmedizin.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Anja Fingerhut für die Betreuung während der Laborarbeit, für ihre Geduld und die kritische Durchsicht der Dissertation.

Ein „Danke-schön“ auch an Jacky Klein und Michael Stratmann für die freundliche Hilfe beim Erwerb der Methoden.

Für die Unterstützung in allen Computerfragen und für die Durchsicht danke ich Herrn David Heise, Herrn Eberhard Wolff und Frau Sandra Wolff sehr herzlich.

Herrn Dr. med. vet Gudjon Kristinsson danke ich für Rat und Tat.

Meinen Eltern Dr. med. Ulrich und Angela Skubella sowie meiner Großmutter Margarete Hillefeld danke ich für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5026-6



®