

# **Modulation nukleärer Rezeptoren durch Thyroidhormone und deren Metabolite**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Leonie Gellrich

aus Wiesbaden

Frankfurt (2019)

(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter:

PD Dr. Merk

Prof. Dr. Robert Fürst

Datum der Disputation:

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	6
1.1	Nukleäre Rezeptoren.....	7
1.1.1	Einteilung und Aufbau der nukleären Rezeptoren .....	7
1.1.2	Mechanismen der Funktion nukleärer Rezeptoren .....	12
1.1.3	Pharmazeutische Relevanz nukleärer Rezeptoren.....	18
1.2	THR.....	21
1.2.1	Struktur und Aktivierung des Rezeptors .....	21
1.2.2	Isoformen und Splicevarianten der THRs .....	22
1.2.3	Physiologische Funktion der THRs.....	24
1.2.4	Ligandenbindung.....	30
1.2.5	Endogene Liganden der THRs und deren pharmakologische Bedeutung.....	34
1.2.6	Synthetische Liganden der THRs und deren pharmakologische Bedeutung .....	37
1.3	PPAR $\gamma$ .....	41
1.3.1	Struktur und Aktivierung des Rezeptors .....	41
1.3.2	Isoformen und Splicevarianten von PPAR $\gamma$ .....	43
1.3.3	Physiologische Funktion von PPAR $\gamma$ .....	45
1.3.4	Ligandenbindung.....	50
1.3.5	Endogene Liganden von PPAR $\gamma$ und deren pharmakologische Bedeutung.....	54
1.3.6	Synthetische Liganden von PPAR $\gamma$ und deren pharmakologische Bedeutung.....	56
1.4	RXR.....	65
1.4.1	Struktur und Aktivierung des Rezeptors .....	65
1.4.2	Isoformen und Splicevarianten der RXRs.....	67
1.4.3	Physiologische Funktion von RXR.....	68
1.4.4	Ligandenbindung.....	74
1.4.5	Endogene Liganden der RXRs und deren pharmakologische Bedeutung .....	78
1.4.6	Natürliche Liganden der RXRs und deren pharmakologische Bedeutung.....	80
1.4.7	Synthetische Liganden der RXRs und deren pharmakologische Bedeutung .....	83
1.5	Thyroidhormone.....	87
1.5.1	Endogene Thyroidhormon-Derivate.....	87

1.5.2	Biosynthese und Transport von Thyroidhormonen .....	89
1.5.3	Die Thyroidhormon-Spiegel-Regulation.....	91
1.5.4	Metabolismus .....	94
1.5.5	Genomische Wirkmechanismen .....	102
1.5.6	Nicht-genomische Wirkmechanismen.....	102
1.5.7	Physiologische Effekte mit unbekanntem Wirkmechanismus .....	105
2.	Zielsetzung .....	108
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	109
3.1.	Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ Bindung .....	109
3.1.1	Gal4-Luciferase-Reportergen Assay .....	109
3.1.2	ITC .....	115
3.1.3	Coaktivator-Rekrutierungs-Assay .....	118
3.1.4	Kristallstrukturanalyse .....	126
3.2	Physiologische Effekte der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung ( <i>in vitro</i> ).....	130
3.2.1	Adipocyten-Differenzierung .....	130
3.2.2	Knockdown Experimente.....	133
3.2.2.1	Auswertung auf mRNA-Ebene mittels qPCR .....	135
3.2.2.1	Auswertung auf Protein-Ebene mittels <i>Western Blot</i> -Analyse .....	139
3.3	Physiologische Bedeutung der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung .....	142
3.3.1	Quantifizierung von Thyroidhormonen in HepG2 Zellen durch LC-MS/MS .....	143
3.3.2	<i>In vivo</i> pharmakologische Charakterisierung .....	145
3.4	Diskussion .....	149
3.4.1	Physiologische Bedeutung der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Interaktion .....	149
3.4.2	Pharmakologische Bedeutung der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Interaktion .....	155
3.5	Zusammenfassung, Bewertung und Ausblick .....	158
4.	Experimenteller Teil .....	164
4.1	Allgemein .....	164
4.2	Gal4-Luciferase-Reportergen Assay .....	164
4.3	ITC.....	166
4.4	Coaktivator-Rekrutierungs-Assay.....	167



4.4.1	PPAR $\gamma$ Coaktivator-Rekrutierungs-Assay.....	167
4.4.2	RXR $\alpha$ Coaktivator-Rekrutierungs-Assay.....	169
4.4.3	PPAR $\gamma$ /tRXR $\alpha$ Coaktivator-Rekrutierungs-Assay .....	169
4.5	Kristallstrukturanalyse.....	169
4.6	Adipocyten-Differenzierung.....	170
4.7	<i>Knockdown</i> Experimente .....	172
4.7.1	Auswertung mittels qPCR.....	173
4.7.2	Auswertung mittels Western Blot Analyse .....	174
4.8	Quantifizierung von Thyroidhormonen in HepG2 Zellen durch LC-MS/MS.....	175
4.9	<i>In vivo</i> pharmakologische Charakterisierung.....	179
4.10	Synthese und Charakterisierung von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93) .....	180
4.10.1	Analytik von Br-TETRAC (93) und Br-T4 (92).....	181
5.	Anhang.....	182
5.1	Abkürzungsverzeichnis .....	182
5.2.	Datensätze .....	190
5.2.1	Gal4-Luciferase-Reportergen Assay Daten .....	190
5.2.2	ITC-Daten der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung.....	196
5.2.3	ITC-Daten der Thyroidhormon-RXR $\alpha$ -Bindung.....	198
5.2.4	Kristallstrukturanalyse: Daten-Sammlung und <i>refinement</i> .....	200
5.2.5	Western Blot Daten .....	201
5.2.5.1	Knockdown-Effizienz (Protein-Ebene) .....	201
5.2.5.2	CD36-Expression (Protein-Ebene) .....	203
5.2.6	LC-MS/MS Daten .....	209
6.	Abbildungsverzeichnis .....	210
7.	Tabellenverzeichnis .....	212
8.	Bibliographie.....	213
9.	Danksagung .....	251
10.	<i>Copyrights</i> und Kooperationspartner.....	253
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	254
12.	Lebenslauf.....	255

## 1. Einleitung

Die Funktion der Thyroidhormone schien weitestgehend aufgeklärt zu sein, bis vor etwa 20 Jahren einige nicht-genomische Signalwege postuliert wurden. Zuvor war lediglich die Interaktion der Thyroidhormone mit den nukleären Thyroidhormon-Rezeptoren (THR) bekannt. Die Aktivierung der THR während der Wachstumsphase ist essentiell<sup>1,2</sup>. Doch auch der erwachsene Mensch benötigt Thyroidhormone, um Stoffwechselprozesse anzuregen, wie beispielsweise Glucose über Glykogenolyse und Gluconeogenese zu akquirieren und die Sympathikusaktivität, vor allem im Herzen zu erhöhen<sup>3,4</sup>. Interessanterweise sind es insbesondere die Metabolite von 3,3',5,5'-Tetraiodthyronin (T<sub>4</sub>, **1**) und 3,3',5-Triiodthyronin (T<sub>3</sub>, **2**), die eine essentielle Rolle bei den neu entdeckten Signalwegen spielen. Zuvor wurden diese sogenannten nicht-klassischen Thyroidhormone lange als inaktive Abbauprodukte betrachtet<sup>5</sup>. Tatsächlich besitzen Thyronamine keinerlei Aktivität an den THR<sup>6</sup>, binden allerdings einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, den *Trace Amine Associated Receptor 1* (TAAR1). Wird dieser Rezeptor aktiviert, kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einem rapiden Abfall der Körpertemperatur und zu einer akuten Bradykardie<sup>7</sup>. Die Iodthyroacetate hingegen zeigen eine Affinität zu den THR. Besonders Triiodthyroacetat (TRIAC, **3**) hat erhebliche thyromimetische Effekte<sup>8,9</sup>. Neben den THR interagieren die Iodthyroacetate auch mit einem Membran-Rezeptor, dem Integrin  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  Rezeptor<sup>10</sup>. Sowohl Tetraiodthyroacetat (TETRAC, **4**) als auch TRIAC (**3**) sind Antagonisten dieses Rezeptors, der häufig von Tumorzellen exprimiert wird. Beide Iodthyroacetate besitzen antiproliferative und pro-apoptische Eigenschaften<sup>10-12</sup>. TETRAC (**4**) hat daher eine *orphan-drug* Zulassung als Nanopartikel Formulierung bei einigen Tumorerkrankungen<sup>13</sup>.

Da Thyroidhormone also durchaus Signalwege einleiten, die unabhängig von THR sind, stellte sich die Frage, ob sie auch THR-unabhängige genomische Wirkmechanismen besitzen. Im Fokus dieser Arbeit steht deshalb die Untersuchung der Interaktion der klassischen und nicht-klassischen Thyroidhormone mit nukleären Rezeptoren.

## 1.1 Nukleäre Rezeptoren

Mitte der 1980er Jahre gelang es, die ersten Hormon-Rezeptoren zu isolieren und zu klonieren. Daraufhin entdeckte man die starke Strukturanalogie dieser Rezeptoren und fasste das Forschungsgebiet unter dem Begriff nukleäre (Hormon-)Rezeptoren zusammen<sup>14–16</sup>. Mittlerweile zählen 48 Mitglieder zur Proteinfamilie der humanen nukleären Rezeptoren<sup>17</sup>. Sie spielen bei vielen Wachstumsvorgängen und metabolischen Prozessen, aber auch im Entzündungsgeschehen und bei Krebs eine zentrale Rolle und entfalten ihre Wirkung meist über einen genomischen Wirkmechanismus<sup>18</sup>.

### 1.1.1 Einteilung und Aufbau der nukleären Rezeptoren

Tabelle 1: Einteilung der 48 humanen nukleäre Rezeptoren nach Sequenz-Homologie<sup>17,19,20</sup>.

Unterfamilie	Gruppe	NRNC Symbol	Name	Abkürzungen	Endogene Liganden
Thyroidhormon Rezeptor-ähnliche Rezeptoren	Thyroidhormon-Rezeptoren	NR1A1	Thyroidhormon-Rezeptor- $\alpha$	TR $\alpha$ , c-erbA-1, THR $\alpha$	Thyroidhormone
		NR1A2	Thyroidhormon-Rezeptor- $\beta$	TR $\beta$ , c-erbA-2, THR $\beta$	
	Retinsäure-Rezeptoren	NR1B1	Retinsäure-Rezeptor- $\alpha$	RAR $\alpha$	Vitamin A und Vitamin A Analoga
		NR1B2	Retinsäure-Rezeptor- $\beta$	RAR $\beta$ , HAP	
		NR1B3	Retinsäure-Rezeptor- $\gamma$	RAR $\gamma$ , RARD	
	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren	NR1C1	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\alpha$	PPAR $\alpha$	Fettsäuren, Leukotrien B4
		NR1C2	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\beta/\delta$	PPAR $\beta$ , NUC1, PPAR $\delta$ , FAAR	Fettsäuren
		NR1C3	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$	PPAR $\gamma$	Fettsäuren, Prostaglandin J2
	Rev-ErbA-Rezeptoren	NR1D1	Rev-ErbA $\alpha$	REVERB $\alpha$ , EAR1, EAR1A	Häme
		NR1D2	Rev-ErbA $\beta$	REVERB $\beta$ , EAR1 $\beta$ , BD73, RVR, HZF2	
	RAR-related orphan Rezeptoren	NR1F1	RAR-related orphan Rezeptor- $\alpha$	ROR $\alpha$ , RZR $\alpha$	Cholesterol, Tretinoin
		NR1F2	RAR-related orphan Rezeptor- $\beta$	ROR $\beta$ , RZR $\beta$	
		NR1F3	RAR-related orphan Rezeptor- $\gamma$	ROR $\gamma$ , TOR	
	Leber X-ähnliche Rezeptoren	NR1H2	Leber X Rezeptor $\beta$	UR, OR-1, NER1, RIP15, LXR $\beta$	Oxysterole
		NR1H3	Leber X Rezeptor $\alpha$	RLD1, LXR, LXR $\alpha$	

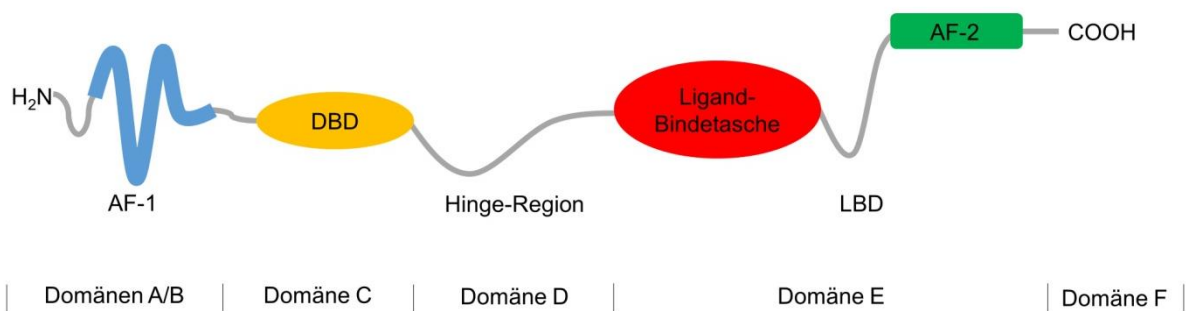
Unterfamilie	Gruppe	NRNC Symbol	Name	Abkürzungen	Endogene Liganden
Thyroidhormon Rezeptor-ähnliche Rezeptoren	Leber X-ähnliche Rezeptoren	NR1H4	Farnesoid X Rezeptoren	FXR, RIP14, HRR1	Gallensäuren, Lanosterol
	Vitamin D-ähnliche Rezeptoren	NR1I1	Vitamin D Rezeptor	VDR	Vitamin D
		NR1I2	Pregnan-X-Rezeptor	ONR1, PXR, SXR, BXR	Xenobiotika
		NR1I3	Konstitutiver Androstan Rezeptor- $\alpha$	MB67, CAR1, CAR $\alpha$	Androstan, Xenobiotika
Retinoid X Rezeptor-ähnliche Rezeptoren	Hepatocyten Kernfaktor-4- Rezeptoren	NR2A1	Hepatocyte Kern- faktor-4 $\alpha$	HNF4 $\alpha$	Fettsäuren
		NR2A2	Hepatocyte Kern- faktor-4 $\gamma$	HNF4 $\gamma$	
	Retinoid X Rezeptoren	NR2B1	Retinoid X Rezeptor- $\alpha$	RXR $\alpha$	Retinoide
		NR2B2	Retinoid X Rezeptor- $\beta$	RXR $\beta$ , H-2RIIBP, RCoR-1	
		NR2B3	Retinoid X Rezeptor- $\gamma$	RXR $\gamma$	
	<i>Testicular</i> Rezeptoren	NR2C1	<i>Testicular</i> Rezeptor 2	TR2, TR2-11	Orphan
		NR2C2	<i>Testicular</i> Rezeptor 4	TR4, TAK1	Orphan
	<i>Tailless Homolog</i> Orphan-Rezeptor und Photorezeptor- spezifischer nukleärer Rezeptor	NR2E1	<i>Tailless Homolog</i> Orphan-Rezeptor	TLL, TLX, XTLL	Orphan
		NR2E3	Photorezeptor- spezifischer nukleärer Rezeptor	PNR	Orphan
	<i>Chicken ovalbumin</i> <i>upstream promoter-</i> Transkriptions- faktoren und V-erbA- <i>related</i> Protein	NR2F1	<i>Chicken ovalbumin</i> <i>upstream promoter-</i> Transkriptionsfaktor I	COUP-TFI, COUPTFA, EAR3, SVP44	Orphan
		NR2F2	<i>Chicken ovalbumin</i> <i>upstream promoter-</i> Transkriptionsfaktor II	COUP-TFII, COUPTFB, ARP1, SVP40	Orphan
		NR2F6	V-erbA- <i>related</i> Protein	EAR2	Orphan
	Estrogen Rezeptor- ähnliche Rezeptoren	Estrogen- Rezeptoren	NR3A1	Estrogen Rezeptor- $\alpha$	ER $\alpha$
NR3A2			Estrogen Rezeptor- $\beta$	ER $\beta$	
Estrogen-Rezeptor verwandte Rezeptoren		NR3B1	Estrogen- <i>related</i> Rezeptor- $\alpha$	ERR1, ERR $\alpha$	Orphan
		NR3B2	Estrogen- <i>related</i> Rezeptor- $\beta$	ERR2, ERR $\beta$	Orphan
		NR3B3	Estrogen- <i>related</i> Rezeptor- $\gamma$	ERR3, ERR $\gamma$	Orphan
3-Ketosteroid Rezeptoren		NR3C1	Glucocorticoid-Rezeptor	GR	Cortisol
		NR3C2	Mineralocorticoid- Rezeptor	MR	Aldosteron
	NR3C3	Progesteron-Rezeptor	PR	Progesteron	
	NR3C4	Androgen-Rezeptor	AR	Testosteron	

Unterfamilie	Gruppe	NRNC Symbol	Name	Abkürzungen	Endogene Liganden
Nervenwachstumsfaktor IB-ähnliche Rezeptoren	Nervenwachstumsfaktor IB, <i>Nuclear receptor related 1</i> und <i>Neuron-derived orphan receptor 1</i>	NR4A1	Nervenwachstumsfaktor IB	NGFIB, TR3, N10, NUR77, NAK1	Orphan
		NR4A2	<i>Nuclear receptor related 1</i>	NURR1, NOT, RNR1, HZF-3, TINOR	Orphan
		NR4A3	<i>Neuron-derived orphan receptor 1</i>	NOR1, MINOR	Orphan
<i>Steroidogenic</i> Faktor ähnliche Rezeptoren	Steroidogenic Faktor 1 und Leber-Rezeptor homolog-1	NR5A1	Steroidogenic faktor 1	SF1, ELP, FTZ-F1, AD4BP	Phosphatidylinositol
		NR5A2	Leber-Rezeptor homolog-1	LRH1, xFF1rA, xFF1rB, FFLR, PHR, FTF	
<i>Germ Cell</i> Kernfaktor ähnliche Rezeptoren		NR6A1	<i>Germ cell nuclear</i> Faktor	GCNF1, RTR	Orphan
Sonstige		NR0B1	<i>Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>	DAX1, AHCH	Orphan
		NR0B2	<i>small heterodimer partner</i>	SHP	Orphan

1999 veröffentlichte das *Nuclear Receptors Nomenclature Committee* (NRNC) ein System für die Nomenklatur der Superfamilie der nukleären Rezeptoren (Tabelle 1). Basierend auf Sequenz-Homologien der hoch konservierten DNA-Bindedomäne (DBD) und Ligand-Bindedomäne (LBD) wurden sechs Unterfamilien eingeteilt. Diese sechs Unterfamilien beinhalten die Thyroidhormon Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren, die Retinoid X Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren, die Estrogen Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren, die Nervenwachstumsfaktor IB-ähnlichen Rezeptoren, die *Steroidogenic* Faktor-ähnlichen Rezeptoren und die *Germ Cell* Kernfaktor-ähnlichen Rezeptoren. Die Transkriptionsfaktoren *Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1* (DAX1) und *small heterodimer partner* (SHP) lassen sich nicht in eine entsprechende Unterfamilie einteilen<sup>17,19,20</sup>. Zudem werden Orphan-Rezeptoren und „*adopted*“ Orphan-Rezeptoren unterschieden. Orphan-Rezeptoren, auch Waisen-Rezeptoren genannt, sind Rezeptoren, bei denen der endogene Ligand noch nicht detektiert wurde. Bei einem „*adopted*“ Orphan-Rezeptor hingegen, konnte unterdessen ein endogener Ligand ermittelt werden.

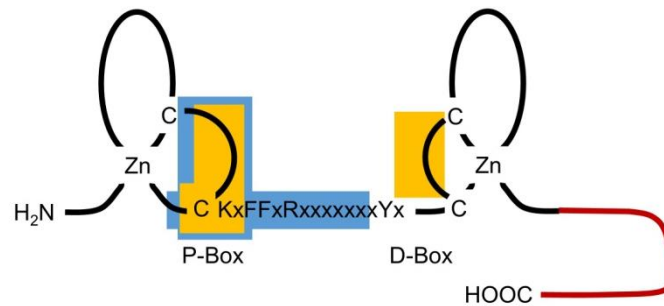
Neben diesen Klassifizierungen, besteht die Möglichkeit der Unterscheidung zwischen klassischen Steroidrezeptoren und Nicht-Steroidrezeptoren. Zu den Steroidrezeptoren zählen der Androgen-, der Estrogen-, der Glucocorticoid-, der Mineralocorticoid- sowie der

Progesteron-Rezeptor. Zu den Nicht-Steroidrezeptoren gehören die Thyroidhormon-Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren und Retinoid-X-Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren<sup>20</sup>. Die Steroidhormon-Rezeptoren bilden im nicht-ligandengebundenen Zustand einen Multi-Protein-Komplex mit Chaperonen wie den Hitzeschockproteinen (Hsp) 90 und Hsp56. Diese Komplexe liegen entweder im Cytoplasma oder im Zellkern vor, wobei der Glucocorticoid-Rezeptor nur cytosolisch vorliegt. Erst nach Bindung eines Liganden transloziert er in den Zellkern. Binden die entsprechenden Liganden an die Steroidrezeptoren, dissoziiert der Hitzeschockprotein-Komplex ab und die Steroidrezeptoren dimerisieren und binden an die DNA des Zielgens<sup>21</sup>. Diese DNA Abschnitte der Zielgene, an die nukleäre Rezeptoren mit ihrer DBD binden können, bezeichnet man als *Response* Elemente. Nicht-Steroidrezeptoren hingegen haben eine sehr hohe Affinität zur DNA und binden häufig bereits im nicht-ligandengebundenen Zustand an die *Response* Elemente der entsprechenden Zielgene. Sie bilden zudem keine Komplexe mit Hitzeschockproteinen.



**Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau der nukleären Rezeptoren in Abwesenheit eines Liganden. Nukleäre Rezeptoren bestehen aus 6 Domänen (Domäne A-F)<sup>19</sup>.**

Nukleäre Rezeptoren sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren mit sehr ähnlichem Aufbau. Insgesamt lassen sie sich in sechs unterschiedliche Domänen einteilen (Abbildung 1)<sup>19</sup>. Domäne A/B befindet sich am N-Terminus und beinhaltet die Transaktivierungsfunktion (AF)-1. Die Domäne C enthält die DBD, Domäne D die *hinge*-Region, darauf folgt Domäne E, welche die Ligand-Bindetasche und die zweite Transaktivierungsfunktion AF-2 umfasst. Domäne F ist hochvariabel und befindet sich am C-terminalen Ende des Rezeptors<sup>22</sup>.

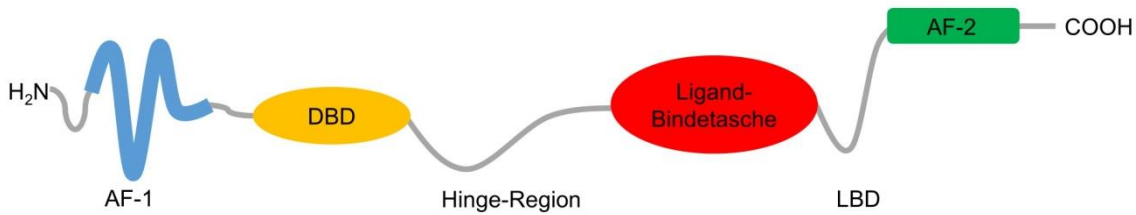


**Abbildung 2:** Die DBD der nukleären Rezeptoren weist 2 Zinkfinger-Motive und zwei  $\alpha$ -Helices auf. Die P-Box (orange, N-terminales Ende) unterscheidet verschiedene *Response Elemente*<sup>20,23</sup>. Der blaue Bereich kennzeichnet den gesamten Bereich der DBD, der für die *Response Element* Erkennung nötig ist. Die D-Box (orange, C-terminales Ende) spielt eine Rolle bei der Dimerisierung<sup>24</sup>.

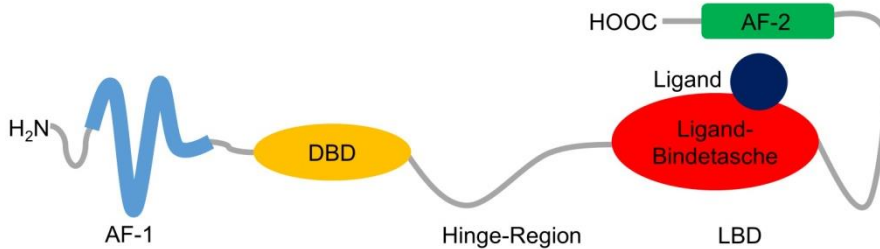
Domäne A/B (AF-1) ist am wenigsten konserviert und für Transaktivierung sowie die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Die DBD in Domäne C dagegen ist hoch konserviert und enthält zwei Zinkfinger-Motive, die jeweils von zwei Cystein-Paaren koordiniert werden, und zwei  $\alpha$ -Helices ausbilden (Abbildung 2)<sup>25</sup>. Die DBD ist für die Bindung an die Response Elemente in der Promotor-Region von Zielgenen verantwortlich. Dabei ist die P-Box für die Diskriminierung zwischen verschiedenen *Response Elementen* von Bedeutung<sup>20,23</sup>. Die D-Box kann Interaktionen mit anderen Rezeptoren eingehen und so zur Dimerisierung beitragen<sup>24</sup>. Die darauffolgende *hinge*-Region verbindet DBD und LBD und ist für die nukleäre Lokalisation des Rezeptors verantwortlich. Über eine Sequenz, reich an basischen Aminosäuren, kann eine Erkennung durch ein Kerntransport-System erfolgen. Die Domäne E umfasst die LBD und besteht aus 11-13 Helices, welche eine *sandwichartige* dreidimensionale Struktur ausbilden<sup>26,27</sup>. Sie beinhaltet eine Dimerisierungsfläche, die Ligand-Bindetasche und die Ligand-abhängige AF-2 in Helix 12. Außerdem ist in der Domäne E die Bindung von Hitzeschockproteinen möglich (Steroidrezeptoren). Auch Coaktivatoren und Corepressoren binden teilweise in der Domäne E<sup>21</sup>. Die Funktion der Domäne F ist noch weitestgehend unklar. Bekannt ist nur, dass es sich um eine hochvariable Region am C-terminalen Ende des Rezeptors handelt<sup>22</sup>.

## 1.1.2 Mechanismen der Funktion nukleärer Rezeptoren

a

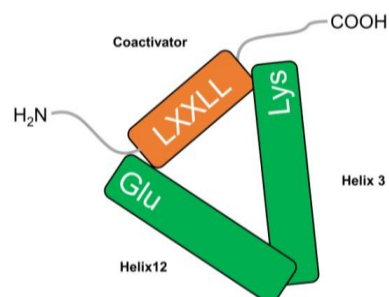


b



**Abbildung 3: Konformationsänderung der Helix 12 nach Ligandenbindung. (a) In Abwesenheit eines Liganden ist die Helix 12 von der kompakten Struktur der LBD weggerichtet. (b) Durch Ligandenbindung kommt es zur Konformationsänderung der Helix 12 (AF-2)<sup>28</sup>.**

Bindet ein Agonist in der Ligand-Bindetasche eines nukleären Rezeptors, so spielt die AF-2 (Helix 12) eine entscheidende Rolle. Im nicht-ligandengebundenen Zustand ist die AF-2 bei den meisten nukleären Rezeptoren von der kompakten Struktur der LBD weggerichtet und liegt ungeordnet in Lösung vor. Bindet aber ein Ligand, so wird eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert, die letztendlich dazu führt, dass sich die AF-2 in Form einer  $\alpha$ -Helix an die kompakte Struktur der LBD anlagert und den Liganden in der Bindungstasche einschließt. Die gebundenen Corepressoren dissoziieren ab und durch die Konformationsänderung entsteht eine neue Rezeptor-Oberfläche, an die Coaktivatoren binden können (Abbildung 3)<sup>28</sup>.



**Abbildung 4: Interaktion von Coaktivatoren mit der LBD. Coaktivatoren sind in der Lage über ihr LXXLL-Motiv Interaktionen mit Helix 12 und Helix 3 der LBD einzugehen. Diese Interaktion ist entscheidend für die Gen-Transkription<sup>29,30</sup>.**



Mittels einer sogenannten „*charge clamp*“ ist ein Coaktivator in der Lage, die Konformationsänderung der Helix 12 zu stabilisieren und gewährleistet eine exakte Positionierung der AF-2. Die Coaktivatoren der nukleären Rezeptoren besitzen mindestens ein LXXLL-Motiv. Diese Sequenz besteht aus drei Leucin-Aminosäuren, unterbrochen von zwei variablen Aminosäuren. Diese leucin-reiche Sequenz ist essentiell für die Interaktion mit den Aminosäuren Lysin der Helix 3 und Glutaminsäure der Helix 12 (Abbildung 4). Die negativ geladene Carboxyl-Gruppe der Glutaminsäure bildet Wasserstoffbrücken mit dem N-terminalen Ende des LXXLL-Motivs aus. Die basische Aminosäure Lysin in Helix 3 hingegen interagiert mit dem Carboxy-terminalen LXXLL-Motiv. Durch diese Interaktion entsteht eine  $\alpha$ -Helix mit spezifischer Länge und die AF-2 in Helix 12 wird genau positioniert<sup>29,30</sup>. Agonisten können unter anderem die Interaktion zwischen LBD und Coaktivator verstärken. Antagonisten hingegen sind z.T. in der Lage, die Bindungsstelle der Coaktivatoren zu blockieren<sup>31</sup>. Außerdem können Coaktivatoren Histon-Acetyltransferasen (HAT) rekrutieren. Manche besitzen auch selbst eine Acetyltransferase-Aktivität. Die Acetylierung der Histone erfolgt ausschließlich an Lysin-Aminosäuren und dient der Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Histonen und der negativen geladenen DNA wird dadurch deutlich verringert. Es kommt zur Chromatin-Dekondensation, wodurch die nukleären Rezeptoren sowie die Transkriptions-Maschinerie an die entsprechenden *Response* Elemente in der Promoter-Region der Zielgene binden können. Die *Response* Elemente zeichnen sich durch eine spezifische Basen-Sequenz aus<sup>32</sup>.

Tabelle 2: Nukleäre Rezeptoren und ihre *Response Elemente*<sup>32</sup>

Nukleärer Rezeptor (Homo-/Heterodimer od. Monomer)	Aminosäure-Sequenz des <i>Response Elements</i> (5'→3')	Bezeichnung
Glucocorticoid-Rezeptor (Homodimer)	AGAACA nnn TGTTCT	<i>Inverted repeat</i> (IR)
Mineralocorticoid-Rezeptor (Homodimer)		
Progesterone-Rezeptor (Homodimer)		
Androgen-Rezeptor (Homodimer)		
Estrogen Rezeptor (Homodimer)	AGGTCA nnn TGACCT	
Retinoid X Rezeptor (Homodimer)	AGGTCA n AGGTCA	<i>Direct repeat 1</i> (DR1)
Retinsäure-Rezeptor (Heterodimer)		
Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (Heterodimer)		
<i>Chicken ovalbumin upstream promoter-</i> Transkriptionsfaktor (Heterodimer)		
Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (Heterodimer)	AGGTCA nn AGGTCA	<i>Direct repeat 2</i> (DR2)
Rev-ErbAβ (Homodimer)		
Vitamin D Rezeptor (Heterodimer)	AGGTCA nnn AGGTCA	<i>Direct repeat 3</i> (DR3)
Vitamin D Rezeptor (Homodimer)		
Thyroidhormon-Rezeptor (Heterodimer)	AGGTCA nnnn AGGTCA	<i>Direct repeat 4</i> (DR4)
Leber X Rezeptor (Heterodimer)		
Konstitutiver Androstan Rezeptor (Heterodimer)		
Retinsäure-Rezeptor (Heterodimer)	AGGTCA nnnnn AGGTCA	<i>Direct repeat 5</i> (DR5)
Nervenwachstumsfaktor IB (Heterodimer)		
Nervenwachstumsfaktor IB (Monomer)	AAA AGGTCA	<i>Monomeric site</i>
Rev-ErbA (Monomer)	ACT AGGTCA	

Ein *Response Element* beinhaltet entweder eine einfache hexamere Basen-Abfolge (z.B. AGGTCA) oder eine Basen-Abfolge, die direkt wiederholt wird (*direct repeat*, DR) (z.B. AGGTCA  $n_x$  AGGTCA) oder invers wiederholt wird (*inverted repeat*, IR) (z.B. AGGTCA  $n_x$

TGACCT). Diese Sequenz kann durch eine Helix der DBD erkannt werden. Diese Helix befindet sich direkt nach dem ersten Zinkfinger am N-terminalen Ende der Domäne C (Abbildung 2, blauer Bereich). Besonders die P-Box ist wichtig für die Diskriminierung unterschiedlicher *Response* Elemente. Die Abfolge der Basen-Sequenz kann bei der direkten Wiederholung sowie bei der inversen Wiederholung von null bis fünf Nukleotiden ( $n_x$ ) unterbrochen sein. Die Anzahl der Nukleotide, welche die Wiederholung unterbrechen, entscheidet dabei von welchem nukleären Rezeptor Homo- oder Heterodimer das *Response* Element erkannt wird (*spacer rule*)<sup>33</sup>. Retinoid X Rezeptor (RXR)-Homodimere erkennen beispielsweise ein DR1 *Response* Element. Das bedeutet, dass eine direkte Wiederholung einer bestimmten Basenabfolge, in diesem Fall AGGTCA, von einem Nukleotid unterbrochen wird. Bisher ungeklärt ist, wie bei unterschiedlichen nukleären Rezeptoren, welche die gleiche Basen-Abfolge mit gleicher Anzahl an Unterbrechungen erkennen, die Diskriminierung der *Response* Elemente gewährleistet wird. Vermutet wird, dass am 5'- oder 3'-Ende der jeweiligen Sequenz, bestimmte Aminosäuren die Basen-Abfolge flankieren und ebenfalls einen Einfluss auf die Rezeptor-Bindung haben. Dies ist beispielsweise beim Nervenwachstumsfaktor IB und Rev-ErbA, welche die DNA als Monomer binden, der Fall (Tabelle 2)<sup>34</sup>. Eine wichtige Rolle bei der DNA-Bindung nehmen außerdem Wassermoleküle ein, die sich zwischen Transkriptionsfaktor und DNA anordnen und die spezifischen Protein-DNA Interaktionen verstärken<sup>32</sup>. Für eine Diskriminierung zwischen verschiedenen *Response* Elementen ist neben der Basen-Sequenz auch die Geometrie der Bindungspartner entscheidend. Die exakte geometrische Anordnung kann durch Homodimer- oder Heterodimer-Bindung erfolgen. Kommt es zu Heterodimer-Bindung, dient der RXR häufig als Dimerisierungspartner. Durch die Dimerisierung wird die Bindung an das entsprechende *Response* Element verstärkt, wodurch die Genexpression maßgeblich beeinflusst wird<sup>35,36</sup>. Es gibt permissive und nicht-permissive RXR-Heterodimere. Die permissiven Heterodimer-Partner von RXR sind die Leber X Rezeptoren (LXRs), der Farnesoid X Rezeptor (FXR) und die Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs). Sie können zu einer Zielgen-Transkription führen, wenn ein Ligand an RXR gebunden hat, wenn der permissive Partner von RXR an seinen Liganden gebunden vorliegt oder wenn beide Heterodimer-Partner an einen Liganden gebunden vorliegen. Nicht-permissive Heterodimere können dagegen nicht durch reine RXR Liganden-Bindung aktiviert werden. Man unterscheidet zudem noch die konditionell-permissive Heterodimere von den nicht-permissiven Heterodimeren, die ebenfalls nur durch Bindung des Heterodimer-Partners von RXR aktiviert werden können, aber bei einer Bindung beider Partner eine additive Transkriptionsrate aufweisen, während eine RXR-Ligandenbindung keinen Einfluss auf die Transaktivierungs-Effizienz nicht-permissiver Heterodimere hat<sup>37-39</sup>.

Zu den nicht-permissiven Heterodimer-Partnern gehören die THR<sub>s</sub> und der Vitamin D Rezeptor (VDR) und zu den konditionell-permissiven Heterodimer-Partnern die Retinsäure-Rezeptoren (RAR<sub>s</sub>)<sup>40</sup>. Aber auch durch Homodimer-Bildung kann es zu einer verbesserten Transkriptionsrate kommen. Ein Glucocorticoid-Rezeptor-Homodimer bindet an sein *Response* Element z.B. 100-fach effizienter verglichen mit einer Bindung als Monomer. Die Bedeutung der Unterbrechungen durch eine bestimmte Anzahl an Nukleotiden lässt sich auf geometrische Einflüsse zurückführen. Die Unterbrechung durch ein einzelnes Nukleotid, bewirkt eine Verschiebung der sich wiederholenden Sequenz um 3,4 Å und eine räumliche Neuorientierung um etwa 35°. Dieser geometrische Einfluss spielt daher ebenfalls eine Rolle, bei der Erkennung der *Response* Elemente durch Homo- und Heterodimere. Aus sterischen Gründen z.B. besteht das Thyroidhormon *Response* Element (TRE) aus einer DR4 Sequenz. Durch eine Unterbrechung, bestehend aus vier Nukleotiden, ist die geometrische Voraussetzung gegeben, das THR-RXR-Heterodimer zu binden<sup>32</sup>.

Coregulatoren, wie Corepressoren und Coaktivatoren, haben einen großen Einfluss auf die Genexpression. Mittlerweile sind über 400 Coregulatoren bekannt, die sich stark in ihrer Gewebeverteilung und Funktion unterscheiden<sup>41</sup>.

Coaktivatoren können auf unterschiedliche Art und Weise die Transkriptionsrate von Zielgenen erhöhen. Zum einen besitzen alle ein LXXLL-Motiv, das zur Stabilisierung der Konformationsänderung der Helix 12 beiträgt und für die exakte geometrische Positionierung der Helix wichtig ist. Zum anderen sind Coaktivatoren in der Lage, die gesamte Transkriptions-Maschinerie zu rekrutieren. Außerdem besitzen viele Coaktivatoren eine HAT-Aktivität und ermöglichen der Transkriptions-Maschinerie, an die *Response* Elemente in der Promoter-Region der Zielgene zu binden. Das CREB-Bindeprotein (CBP) ist z.B. ein Coaktivator mit HAT-Aktivität. Auch die Histon Acetyltransferase (p300) gehört zu den Coaktivatoren mit HAT-Aktivität. Coaktivatoren können auch Ubiquitin-Ligasen sein. Die Transkription ist eng mit einer Ubiquitylierung verknüpft. Das Umschalten der RNA-Polymerase von Initiations- zur Elongationsphase wird beispielsweise über eine Ubiquitylierung vermittelt. Die RNA Polymerase gehört zum Transkriptionsapparat und ist für die Synthese von RNA ausgehend von einer DNA-Matrize verantwortlich. Während der Transkription werden drei Phasen durchlaufen: die Initiations-Phase, die Elongations-Phase und die Terminations-Phase. Bei der Initiationsphase lagert sich der Transkriptionsapparat an die DNA an. Es folgt die Elongation, bei der die RNA synthetisiert wird und schließlich endet die RNA-Synthese in der Terminations-Phase. Ein Coaktivator mit Ubiquitin-Ligase-Aktivität ist z.B. die Ubiquitin-Protein Ligase (E6AP)<sup>42,43</sup>. Eine Protein-Methylierung stellt eine zusätzliche Funktion dar, die ein Coaktivator ausführen kann. Ein Coaktivator mit einer solchen Funktion ist z.B. die Proteinargininmethyltransferase (PRMT4). Durch Protein-

Methylierung kann ebenfalls die Transkriptionsrate verbessert werden<sup>42</sup>. Die bisher am meisten untersuchten Coaktivatoren sind die p160 Proteine, die zur Familie der Steroid Rezeptor Coaktivatoren (SRC) gehören. SRC-1, SRC-2 und SRC-3 besitzen eine Acetyltransferase-Domäne. SRC-2 wird zusätzlich als Thyroidhormon-Rezeptor-Aktivator-Molekül 1 (TRAM-1) oder *amplified in breast 1* (AIB1) bezeichnet. SRC-3 wird auch *transcriptional mediators/intermediary factor 2* (TIF2) oder *Glucocorticoid receptor-interacting protein-1* (GRIP1) genannt<sup>44</sup>. Die Familie der SRC interagiert mit einer Vielzahl an nukleären Rezeptoren, vor allem mit Steroidhormon-Rezeptoren. Es gibt aber auch Coaktivatoren, die sehr selektiv mit einem bestimmten nukleären Rezeptor interagieren, wie z.B. der Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  Coaktivator 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ).

Corepressoren haben einen gegenteiligen Effekt und können mit Coaktivatoren um dieselben Bindungsstellen am Transkriptionsfaktor konkurrieren. Sie verhindern außerdem die Expression von Zielgenen, indem sie Enzyme rekrutieren, welche die Transkription inhibieren. Die geschieht z.B. durch Histondeacetylierung. Die Chromatinstruktur wird so verstärkt und unzugänglich für den Transkriptionsapparat. Zu der Familie der nukleären Rezeptor Corepressoren (NcoR) gehören z.B NcoR1, auch *thyroid-hormone- and retinoic-acid-receptor-associated co-repressor 1* (TRAC-1) genannt, und NcoR2, der auch als *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors* (SMRT) bezeichnet wird<sup>42</sup>.

### 1.1.3 Pharmazeutische Relevanz nukleärer Rezeptoren

Tabelle 3: Endogene und synthetische Liganden<sup>45</sup>.

Nukleärer Rezeptor	Endogene Liganden	Synthetische Liganden	Indikation
Estrogen-Rezeptor	Estrogen	Ethinylestradiol	Empfängnisverhütung
		Tamoxifen (SERM)	Brustkrebs
		Raloxifen(SERM)	Osteoporose bei postmenopausalen Frauen
		konjugierte equine Estrogene	Hormonersatztherapie in der Postmenopause der Frau
		Tibolon (STEAR)	Hormonersatztherapie in der Postmenopause der Frau
		Clomifen (SERM)	Ovulationsauslöser bei Frauen mit Kinderwunsch, Amenorrhoe
		Fulvestrant (Antiestrogen)	Brustkrebs
Glucocorticoid-Rezeptor	Cortisol	Systemische wirkende Glucocorticoide: z.B. Prednisolon, Dexamethason, Betamethason	Entzündungshemmung und Immunsuppression (z.B. bei Rheuma, chronisch entzündlich Darmerkrankungen, Organtransplantationen), Hormonersatztherapie bei Nebennierenrindeninsuffizienz, Allergien, Krebs
		Lokal wirkende Glucocorticoide: z.B. Fluticasonpropionat, Mometasonfuroat	Dermale und inhalative Anwendung: z.B. Hauterkrankungen, Asthma, Chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
Mineralocorticoid-Rezeptor	Aldosteron	Agonist: Fludrocortison	Zur Behandlung der primären Nebenniereninsuffizienz (Morbus Addison, Kongenitale Nebennierenhyperplasie)
		Antagonisten: Spironolacton, Canrenon, Eplerenon	Diuretika: Herzinsuffizienz, Ödeme
Progesteron-Rezeptor	Progesteron	Synthetische Gestagene: z.B. Chlormadinonacetat, Dyhydrogesteron, Dienogest, Levonorgestrel	z.B. Empfängnisverhütung, Dysmenorrhö, Uterus-Mamma- und Nierenkarzinome
		Antigestagen: Mifepriston (auch Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist)	Schwangerschaftsabbruch, Cushing-Syndrom
		Ulipristalacetat (SPRM)	Notfallkontrazeptika
Androgen-Rezeptor	Testosteron	Agonisten: z.B. Testosteron-undecanoat	Androgenmangel beim Mann (Hypogonadismus) bei Frauen: inoperable Mammakarzinome
		Antagonisten (Antiandrogene): Flutamid, Bicalutamid	fortgeschrittenes Prostatakarzinom
		Antagonisten (Antiandrogene): Cyproteronacetat	schwere Akne, Hirsutismus, androgenetische Alopezie, Hypersexualität, Hormontherapie bei metastasierendem Prostatakarzinom

Nukleärer Rezeptor	Endogene Liganden	Synthetische Liganden	Indikation
Thyroidhormon-Rezeptor	Thyroidhormone	-	Hypothyreose
Retinsäure-Rezeptor	Vitamin A und Vitamin A Analoga	systemische Anwendung: Acitretin, Alitretinoin, Isotretinoin	Hyper- und Dyskeratosen: z.B. Akne verschiedene Krebsarten
		lokale Anwendung: Adapalen, Tazaroten, Tretinoin	verschiedene Krebsarten
Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\alpha$	Fettsäuren, Leukotrien B4	Fibrate: z.B. Fenofibrat (5) Bezafibrat (6) Gemfibrozil	Hyperlipidämie
Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$	Fettsäuren, Prostaglandin J2	Glitazone: z.B. Pioglitazon (7)	Diabetes mellitus Typ 2
Farnesoid X Rezeptoren	Gallensäuren, Lanosterol	Obeticholsäure	primäre biliäre Cholangitis
Vitamin D Rezeptor	Vitamin D (Colecalciferol, Calcitriol)	Alfacalcidol	Rachitis, Osteomalzie, Osteoporoseprophylaxe
		Dyhydrotachysterol	Hypoparathyreoidismus
		Calcipotriol, Tacalcitol	Psoriasis
Retinoid X Rezeptor- $\alpha$	Retinoide	Bexaroten (8)	kutanes T-Zell-Lymphoms ( <i>orphan drug</i> )

Endogene Liganden der nukleären Rezeptoren sind häufig kleine lipophile Substanzen sogenannte „*small molecules*“. Bisher sind vor allem die Liganden der Steroidhormon-Rezeptoren gut erforscht. Sie binden mit hoher Affinität an ihren Rezeptor ( $EC_{50}$  im nM Bereich)<sup>46</sup>. Bei 16 der 48 nukleären Rezeptoren konnte jedoch noch kein endogener Ligand detektiert werden. Zudem wird kontrovers diskutiert, ob einige bereits postulierte Liganden, wie z.B. die 9-cis-Retinsäure (9), tatsächlich in der Lage sind, unter physiologischen Bedingungen den entsprechenden nukleären Rezeptor, in diesem Fall RXR, zu binden<sup>47</sup>. Die physiologische Konzentration der postulierten endogenen Liganden ist oft geringer als die *in vitro* bestimmte Bindungs-Affinität. Substanzen können aber auch in bestimmten Kompartimenten akkumulieren und trotz niedriger Plasmaspiegel in entsprechenden Organen in einer Konzentration vorliegen, die relevant ist für eine Modulation des entsprechenden Rezeptors. Bei einigen oxidierten Lipoproteinen, die *in vitro* eine nM Potenz an PPAR $\gamma$  besitzen, stellt sich außerdem die Frage, ob die Bedingungen der Oxidation physiologisch sind<sup>48–50</sup>.

Für viele nukleäre Rezeptoren, werden mehrere verschiedene endogene Liganden beschrieben. Möglicherweise kann es tatsächlich mehrere endogene Liganden geben, abhängig davon, welches Gewebe und welcher Zelltyp betrachtet wird.

Da die Funktion der Steroidhormon-Rezeptoren und der Bindungsmodus der endogenen Liganden weitestgehend aufgeklärt ist, ist die Arzneistoffentwicklung weiter fortgeschritten als bei anderen nukleären Rezeptoren (Tabelle 3). Es gibt beispielsweise eine Vielzahl an Estrogen-Derivaten mit sehr unterschiedlichen Indikations-Gebieten. Zum einen werden Estrogene als orale Kontrazeptiva verwendet, zum anderen als Hormonersatztherapie in der Postmenopause der Frau, bei Brustkrebs und Osteoporose. Da nukleäre Rezeptoren oft eine Vielzahl an Zielgenen regulieren, besteht häufig die Gefahr, dass Nebenwirkungen auftreten können<sup>45</sup>. Deshalb wurden selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs) entwickelt. Raloxifen (SERM) hat beispielsweise an dem Estrogen Rezeptor- $\beta$  eine antagonistische Wirkung. Auf Grund des Expressionsmusters des Estrogen Rezeptor- $\beta$  hat Raloxifen eine antagonistische Wirkung in Uterus und Brust. An Estrogen Rezeptor- $\alpha$  hingegen wirkt Raloxifen agonistisch. Im Knochen hat der Arzneistoff deshalb eine osteoanabole Wirkung. Daraus ergibt sich die Indikation bei Osteoporose mit einem minimierten Risiko für ein Uterus- oder Mammakarzinome<sup>51</sup>. Tibolon wird bei der Hormonersatztherapie während der Postmenopause der Frau eingesetzt und hat eine gewebespezifische Wirkung (*selective tissue estrogenic activity regulator*, STEAR). Tibolon ist ein Prodrug und wird erst durch Hydroxylierung in Position 3 aktiviert. Danach findet in den meisten Geweben eine schnelle Inaktivierung durch Sulfotransferasen statt. Da im Knochen wenig Sulfotransferasen exprimiert sind, ergibt sich eine gewebespezifische Wirkung<sup>52</sup>.

Interessanterweise werden diese Wirkmechanismen bei der Arzneistoffentwicklung für andere nukleäre Rezeptoren kopiert. Um das Nebenwirkungsprofil von PPAR $\gamma$  Agonisten zu minimieren, befinden sich z.B. einige sogenannte selektive PPAR $\gamma$  Modulatoren (SPPARMs) in der Entwicklung. Diese Substanzen sind teilweise gewebespezifisch oder beeinflussen nur bestimmte Zielgene<sup>53</sup>.

Der Markt für Arzneistoffe, die nukleäre Rezeptoren modulieren ist groß und das Feld der nukleären Rezeptoren bietet noch viel Platz für weitere Entwicklungen. Erst kürzlich wurde Obeticholsäure zur Behandlung der primären biliären Cholangitis (PBC) zugelassen. Es handelt sich dabei um den ersten Vertreter der selektiven FXR-Agonisten<sup>54</sup>. Nachdem man die Gallensäuren als endogene Liganden des FXRs detektieren konnte, hat nun ein synthetisches Gallensäure-Derivat eine Zulassung erhalten. Auch deshalb ist die Suche nach endogenen Liganden weiterhin von großer Bedeutung.



## 1.2 THRs

Insgesamt gibt es zwei Isoformen der THRs:  $\text{THR}\alpha$  und  $\text{THR}\beta$ . Die THRs spielen bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine zentrale Rolle. Sie sind essentiell während der Wachstumsphase und auch beim erwachsenen Menschen erfüllen die THRs viele Aufgaben<sup>1,2</sup>. Die Organogenese, die Knochenausbildung und vor allem auch die Entwicklung des Gehirns stehen unter dem Einfluss der THRs<sup>55,56</sup>. Später werden die THRs benötigt, um katabole Stoffwechselprozesse einzuleiten. Dies führt in der Regel zu einem gesteigerten Grundumsatz, vermehrtem Sauerstoffverbrauch und einer erhöhten Körpertemperatur<sup>12</sup>.

### 1.2.1 Struktur und Aktivierung des Rezeptors

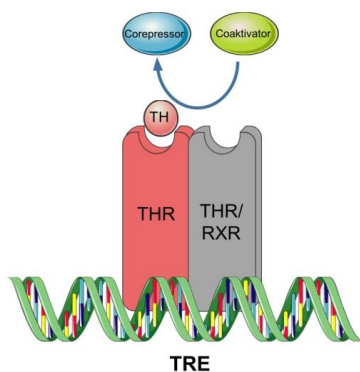


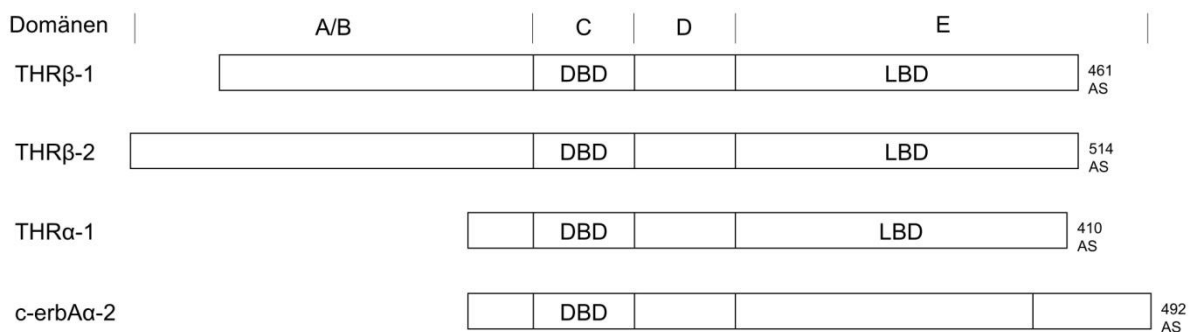
Abbildung 5: Transkriptionsapparat der THRs<sup>40</sup>.

Die THRs gehören zu den Nicht-Steroidrezeptoren und liegen häufig im Nukleus vor, sind jedoch auch im Cytoplasma zu finden. Sie können als Homodimer oder als Heterodimer mit RXR an die entsprechenden TREs binden (Abbildung 5). Die Heterodimere sind nicht-permissiv und können daher nicht durch eine reine RXR Liganden-Bindung aktiviert werden<sup>40</sup>. Die Bindung als Heterodimer ist allerdings deutlich stärker verglichen mit der Homodimer-Bindung an das TRE<sup>12,31</sup>. Auch im nicht-ligandengebundenen Zustand binden die Rezeptoren häufig bereits an das entsprechende *Response* Element, das meist aus direkten Wiederholungen der Basen-Abfolge AGGTCA (DR4) besteht. TREs können neben einer DR-Sequenz auch aus einer IR-Sequenz bestehen. Das inverted palindrom (IP6) mit 6 Nukleotid-Unterbrechungen dient ebenfalls als TRE<sup>57,58</sup>. Sehr selten findet man auch ein Palindrom ohne Unterbrechung (TREpal0) als *Response* Element<sup>59</sup>. Außer den TREs gibt es zudem negative Thyroidhormon *Response* Elemente (nTRE), die die Genexpression von Zielgenen supprimieren. Es ist wahrscheinlich, dass diese negativen *Response* Elemente eine Rolle bei der negativen Rückkopplung über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse spielen, da nTRE z.B. in der Promoter-Region des Thyreotropin (auch

Thyreoidea-stimulierendes Hormon, TSH)  $\beta$ - und Thyreotropin-*Releasing*-Hormon (auch Thyroliberin, TRH)-Gens zu finden sind<sup>60,61</sup>.

Ohne Ligandenbindung fungieren die THR $\alpha$ s als transkriptionelle Repressoren<sup>62-64</sup>. Die Corepressoren NCoR1 (TRAC-1) und NCoR2 (SMRT) liegen in diesem Zustand gebunden an den Rezeptor vor. Sobald ein Thyroidhormon an den Rezeptor bindet, dissoziieren die Corepressoren vom Rezeptor ab und es werden Coaktivatoren wie z.B. SRC-1, SRC-3 (auch TIF2 oder GRIP1) oder das Rezeptor interagierendes Protein 140 (RIP140, auch nukleärer Rezeptor-interagierendes Protein 1, NRIP1) rekrutiert<sup>65-67</sup>. Außerdem lösen Histondeacetylasen die Chromatinstruktur der Target-Gen-DNA auf, um die Transkription der DNA zu ermöglichen<sup>68</sup>.

### 1.2.2 Isoformen und Splicevarianten der THR $\alpha$ s



**Abbildung 6: Vergleich der Isoformen und deren Splicevarianten<sup>69</sup>. Die THR $\alpha$ - und THR $\beta$ -Isoform kann jeweils in zwei Splicevarianten transkribiert werden. Allerdings sind nur die Isoformen THR $\alpha$ 1, THR $\beta$ 1 und THR $\beta$ 2 in der Lage T3 (2) zu binden.**

Das THR $\alpha$ -Gen (c-erbA $\alpha$ ) ist auf dem Chromosom 17 und THR $\beta$ -Gen (c-erbA $\beta$ ) auf dem Chromosom 3 codiert<sup>70-72</sup>. Die Bezeichnung c-erbA steht für ein Protoonkogen, die definiert sind als Gene, die für Proteine codieren, welche Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren. Mutiert ein Protoonkogen, kann dies dazu führen, dass Differenzierungs- und Wachstumsprozesse unkontrolliert ablaufen. Entweder kommt es zu einer Apoptose oder die Zellteilung wird unkontrolliert gefördert. In diesen Fällen werden Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert und ein Tumor kann entstehen. Das „c“ in c-erbA steht dabei für ein zelleigenes Gen. Handelt es sich beispielsweise um ein virales Onkogen, kürzt man dieses als v-Onkogen ab.

Beide THR-Isoformen besitzen unterschiedliche Splicevarianten. THR $\alpha$  kann nach der Transkription die beiden Splicevarianten THR $\alpha$ 1 und c-erbA $\alpha$ -2 bilden. THR $\beta$  existiert in den Varianten THR $\beta$ 1 und THR $\beta$ 2 (Abbildung 6). Dabei sind nur die Isoformen THR $\alpha$ 1, THR $\beta$ 1 und THR $\beta$ 2 in der Lage T3 (2) zu binden. Die fehlende Bindungs-Affinität von T3 (2) zu c-

erbA $\alpha$ -2 lässt sich damit erklären, dass die LBD von c-erbA $\alpha$ -2 am C-terminalen Ende durch 122 Aminosäuren, die essentiell für eine Thyroidhormon-Bindung sind, ersetzt wird. Die Aminosäuren 1-370 sind bei beiden Splicevarianten identisch, jedoch fehlt beispielsweise die gesamte Helix 12, ohne die eine Transaktivierung nicht möglich ist<sup>73</sup>. c-erbA $\alpha$ -2 ist aber trotzdem in der Lage, wenn auch nur schwach, an TREs zu binden und konkurriert deshalb mit anderen THR-Isoformen bzw. Splicevarianten um diese Bindungsstelle. Da c-erbA $\alpha$ -2 die entsprechenden THR responsiven Gene aber nicht transaktiviert, kann man diese Splicevariante des THR $\alpha$  auch als Inhibitor der Thyroidhormon abhängigen Genexpression betrachten<sup>74,75</sup>.

Das THR $\alpha$  Gen kann auch revers abgelesen werden. Dies führt zu der Expression von rev-erbA $\alpha$ . Die mRNA von rev-erbA $\alpha$  ist komplementär zu c-erbA $\alpha$ -2. rev-erbA $\alpha$  ist vor allem im Fettgewebe und Muskel zu finden und kann wie c-erbA $\alpha$ -2 auch an TREs binden. Zudem interagiert rev-erbA $\alpha$  auch mit Retinsäure *Response* Elementen (RARE) und supprimiert Gene mit diesen *Response* Elementen. rev-erbA $\alpha$  spielt eine Rolle bei der Adipogenese und fungiert als Häm-Rezeptor<sup>76</sup>. Außerdem scheint rev-erbA $\alpha$  einen Einfluss auf den circadianen Rhythmus zu haben<sup>77</sup>.

Die beiden Splicevarianten von THR $\beta$  ähneln sich sehr stark. Sie unterscheiden sich nur im N-terminalen Ende, während die DBD, die *hinge*-Region und die LBD identisch sind.

THR $\alpha$  ist, genauso wie THR $\beta$ , ubiquitär exprimiert. Hauptsächlich jedoch findet man THR $\alpha$ 1 im Skelettmuskel, Herz, braunen Fettgewebe, Knochen sowie im zentralen Nervensystem (ZNS) und c-erbA $\alpha$ -2 in Hoden sowie im Gehirn<sup>72</sup>. THR $\beta$ 1 und THR $\beta$ 2 sind generell stärker exprimiert als THR $\alpha$ 1, wobei THR $\beta$ 1 die systemische Splicevariante der THR $\beta$ -Isoform darstellt und THR $\beta$ 2 vorwiegend in der Hypophyse exprimiert wird. Hauptsächlich findet man THR $\beta$ 1 in Leber und Niere, aber auch im braunen Fettgewebe<sup>78</sup>. THR $\beta$ 2 findet man neben der Hypophyse auch im Innenohr<sup>79</sup> und in der Retina<sup>56</sup> sowie in einigen anderen Hirnarealen<sup>80-86</sup>.

### 1.2.3 Physiologische Funktion der THR

Tabelle 4: Physiologische Funktionen der THR und molekularer Wirkmechanismus.

Allgemeine physiologische Funktion	Gewebe und spezielle Funktion	Molekularer Wirkmechanismus	Beteiligung THR $\alpha$ /THR $\beta$
Wachstum und Entwicklung des Körpers	Gehirn: ➤ Neuronale Entwicklung ➤ Förderung der Dendritenbildung und Myelinisierung	Neuronale Entwicklung wird reguliert im Zusammenspiel mit den RARs <sup>87,88</sup> Zielgen: <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i> Typ IV (CamK IV) <sup>89</sup> → Differenzierung und Proliferation von Gamma-Aminobuttersäure (GABA)ergen Interneuronen <sup>90</sup>	THR $\alpha$ 1
	Knochen: ➤ Wachstum <sup>92-94</sup>	Differenzierung und Entwicklung von parvalbuminergen Neuronen (regulieren kardiovaskuläre Funktionen) <sup>91</sup>	THR $\alpha$ 1 und THR $\beta$ 2
	Darm: ➤ Ausbildung des Intestinal-Traktes <sup>92-94</sup>	u.a. Förderung der Differenzierung des intestinalen Epithelgewebes ➤ Protein-Arginin-N-methyltransferase 1 (PRMT1) wird durch Thyroidhormone induziert <sup>96</sup>	THR $\alpha$ 1 <sup>95</sup>
	Ohr: ➤ auditorischen Funktionen <sup>80</sup>	genauer molekularer Mechanismus ist noch unbekannt	THR $\beta$ 2 <sup>95</sup>
Erhöhung des Grundumsatzes	Nervenzellen ➤ erhöhter Adenosin-triphosphat (ATP) Verbrauch <sup>97-99</sup>	Beeinflussung des Membranpotentials durch die Erhöhung der Expression der Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase: ➤ Ruhezustand wird beibehalten, keine unkontrollierte Depolarisierung ➤ Wiederherstellung des Ruhepotentials <sup>100-102</sup>	THR $\alpha$ 1 und THR $\beta$ 1 und THR $\beta$ 2 (im ZNS THR $\alpha$ 1)
	Skelettmuskelzellen ➤ erhöhter ATP Verbrauch <sup>97-99</sup>	Erhöhung der Expression der <i>sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase</i> (SERCA) <sup>103</sup> : ➤ essentiell für die Regeneration des Calcium-Spiegels nach der Muskelkontraktion ➤ Muskelkontraktion: Ryanodin-Rezeptoren setzen Calcium-Ionen frei → Muskelkontraktion → SERCAs katalysieren unter Hydrolyse von ATP den primär aktiven Transport von Ca <sup>2+</sup> -Ionen zurück in das sarkoplasmatische Retikulum <sup>104-106</sup>	THR $\alpha$ 1 und THR $\beta$ 1
	braunes Fettgewebe (Mitochondrien) ➤ Thermogenese	Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung von der Atmungskette <sup>107</sup> : ➤ Atmungskette: Elektronen werden auf Cofaktoren übertragen → Elektronen werden über mehrere Proteinkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran auf Sauerstoff übertragen → ein Protonengradient wird im Intermembranraum der Mitochondrien aufgebaut → der Protonengradient wird genutzt für die oxidative Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP ➤ Thyroidhormone entkoppeln die oxidative Phosphorylierung von der Atmungskette über <i>uncoupling protein</i> (UCP)1 und UCP3 → Thermogenese	THR $\beta$ 1 reguliert UCP1 Expression <sup>108</sup>
		Noradrenalin-Wirkung wird verstärkt <sup>109</sup>	THR $\alpha$ 1 <sup>108</sup>

Allgemeine physiologische Funktion	Gewebe und spezielle Funktion	Molekularer Wirkmechanismus	Beteiligung THR $\alpha$ /THR $\beta$
Beeinflussung des Lipoprotein-Stoffwechsels	Leber: <ul style="list-style-type: none"> <li>insgesamt kommt es zu niedrigeren Lipoprotein-Spiegeln</li> </ul>	<p>katabole Prozesse:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Erhöhung der Expression von <i>low-density</i> Lipoprotein (LDL)-Rezeptoren<sup>110</sup></li> <li>Induktion von <i>sterol response element binding protein</i> (SREBP)-2 → erhöht ebenfalls LDL-Rezeptor-Expression<sup>111</sup></li> <li>Senkung der Apolipoprotein (Apo) B48 und ApoB11 Expression → auf Chylomikronen exprimiert → assoziiert mit Atherosklerose<sup>112</sup></li> <li>verringerte HDL-Synthese → <i>ATP-binding cassette</i> Transporter (ABC)A1-Gen enthält <i>Response</i> Elemente für LXR und SREBP-2 um das THR<math>\beta</math> konkurriert → verminderte ABCA1 Expression → kein Transport des Cholesterols an die Zelloberfläche → keine Bildung von Prä-<math>\beta</math>-<i>high density</i> Lipoprotein (HDL) bzw. HDL<sup>113,114</sup></li> </ul> <p>anabole Prozesse:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA Reduktase) wird induziert → Cholesterol-Biosynthese<sup>111</sup></li> </ul>	vorwiegend THR $\beta$ 1
Beeinflussung des Gallensäure-Stoffwechsels	Leber <ul style="list-style-type: none"> <li>Gallensäuren-Synthese wird gehemmt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>die Cholesterol 7-Hydroxylase (CYP7A1) Expression wird gehemmt → geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensäuren-Biosynthese wird inhibiert<sup>115,116</sup></li> </ul>	vor allem THR $\beta$ 1
Beeinflussung des Fettsäure-Metabolismus	Fettgewebe: <ul style="list-style-type: none"> <li>Lipolyse überwiegt Liponeogenese</li> </ul>	<p>katabole Prozesse:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>T3 (2) erhöht die Expression an <math>\beta</math>-adrenergen Rezeptoren im Fettgewebe → erhöhte Katecholamin-induzierte Lipolyse</li> <li><math>\beta</math>-Oxidation wird gefördert → Carnitin-Palmitoyltransferase 1<math>\alpha</math> (CPT-1<math>\alpha</math>) Expression wird erhöht → CPT-1<math>\alpha</math> ist ein wichtiges Enzym bei der <math>\beta</math>-Oxidation von Fettsäuren → CPT-1<math>\alpha</math> transportiert langkettige Fettsäuren in die Mitochondrien-Matrix<sup>117</sup></li> </ul> <p>anabole Prozesse:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>de novo Lipogenese<sup>118</sup>: Enzyme, die für die Fettsäure-Synthese wichtig sind, werden induziert: <ul style="list-style-type: none"> <li>Acetyl CoA Carboxylase 1 (ACC1)</li> <li>Fettsäure-Synthase (FAS)</li> <li><i>carbohydrate response element binding protein</i> (ChREBP)</li> <li>SREBP-1c</li> </ul> </li> <li>bei der Adipocyten-Differenzierung spielen Thyroidhormone ebenfalls eine Rolle<sup>119</sup></li> </ul>	THR $\alpha$ 1 und THR $\beta$ 1
Beeinflussung des Glucose-Stoffwechsels	Leber: <ul style="list-style-type: none"> <li>Gluconeogenese</li> <li>Glykogenolyse</li> </ul> Muskulatur und Fettgewebe: <ul style="list-style-type: none"> <li>Glucoseaufnahme in die Zelle</li> </ul> Pankreas: <ul style="list-style-type: none"> <li>Differenzierung von Inselzellen</li> </ul>	<p>Gluconeogenese:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Alanin-Transport in die Hepatocyten<math>\uparrow</math>: L-Alanin → Pyruvat → Oxalacetat → → Glucose<sup>120</sup></li> <li>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) wird induziert → geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gluconeogenese<sup>121</sup></li> </ul> <p>Glucoseaufnahme in die Zelle:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Glucosetransporter (GLUT)-4-Gen trägt ein TRE → Glucoseaufnahme in Zellen wird ermöglicht<sup>122</sup></li> </ul> <p>Differenzierung von Inselzellen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Aktivierung des Transkriptionsfaktors MafA → Inselzellen differenzieren aus und sind in der Lage Glucose-abhängig Insulin zu sezernieren<sup>123</sup></li> </ul>	überwiegend THR $\beta$ 1
Beeinflussung der Herzleistung <sup>3,4</sup>	Herz: <ul style="list-style-type: none"> <li>positive inotrope und chronotrope Wirkung</li> </ul>	Erhöhung der $\beta_1$ -Rezeptor-Dichte → verstärkte Katecholamin-Wirkung	THR $\alpha$ 1

Die THRs sind an vielen physiologischen Prozessen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Menschen beteiligt. Hauptsächlich werden über die THRs genomische Signaltransduktionswege eingeleitet. Wirkmechanismen der Thyroidhormone, die unabhängig von den THRs ablaufen, werden in Kapitel 1.5.6 behandelt. Obwohl die

Aktivierung der verschiedenen Isoformen und Splicevarianten des THR identisch und somit der Ablauf bis zur Transkription der entsprechenden Zielgene gleich ist, ergeben sich verschiedene Funktionen<sup>124,125</sup>. Ursache ist das deutlich unterschiedliche Expressionsmuster. Beide Isoformen sind zwar ubiquitär exprimiert, sie unterscheiden sich jedoch in ihren Hauptexpressions-Orten und werden auch in der Wachstumsphase zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert.

Während der Wachstumsphase spielen die THRs eine essentielle Rolle<sup>1,2</sup>. Ohne Thyroidhormone wäre eine normale Entwicklung von Organen und die Organanlage unmöglich. Besonders bei der Entwicklung des Gehirns werden Thyroidhormone und THRs benötigt. Wenn es zu einem nicht therapierten pränatalen Hormonmangel kommt, entstehen irreversible Hirnschäden. Diese führen zu unterschiedlichen neurologischen und physischen Defiziten, welche man als Kretinismus bezeichnet<sup>126–128</sup>. Unter anderem tritt ein verzögerter Knochenaufbau und Epiphysen-Schluss auf. Auch das Nerven- und Skelett-System sind betroffen<sup>129,130</sup>. Wird ein Thyroidhormon-Mangel des Fötus zwar während der Schwangerschaft ausgeglichen, aber in der Kindheit nicht erkannt, kann dies zu Kleinwuchs und einer verminderten Intelligenz führen. Dadurch wird eine lebenslange T4 (1) Substitution notwendig. Meist ist der RAR im Zusammenspiel mit den THRs an der neuronalen Entwicklung beteiligt<sup>87,88</sup>. *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase* Typ IV (CamK IV) ist einer der wichtigsten Zielgene der THRs bei der Hirnentwicklung<sup>89</sup>. CamK IV ist verantwortlich für die Differenzierung und Proliferation von Gamma-Aminobuttersäure (GABA)ergen Interneuronen<sup>90</sup>. Auch die Differenzierung und Entwicklung von parvalbuminergen Neuronen steht unter dem Einfluss der THRs. Diese Neuronen sind im Hypothalamus lokalisiert und regulieren kardiovaskuläre Funktionen<sup>91</sup>. Knockout-Modelle beweisen zudem, dass THR $\alpha$ 1 einen wesentlichen Beitrag zu THR vermittelten Wachstumsprozessen leistet. Im Knockout-Modell kam es speziell zu Wachstumsstörungen der Knochen und einer verzögerten Ausbildung des Darms<sup>92–94</sup>. Auch neurologische Funktionen waren beeinträchtigt<sup>131</sup>. Der Einfluss auf den Knochenaufbau lässt sich vor allem auf die Thyroidhormon vermittelte Förderung der Differenzierung und Proliferation der Chondrozyten zurückführen. Im intestinalen Epithelgewebe induzieren Thyroidhormone die Protein-Arginin-N-methyltransferase 1 (PRMT1). Dies führt zur Differenzierung und Proliferation des Darmepithels<sup>96</sup>. Über THR $\beta$ 2 werden in der Wachstumsphase und Entwicklung des Fötus vor allem die auditorischen Funktionen ausgebildet<sup>80</sup>. Weitestgehend scheint aber die Isoform THR $\alpha$ 1 für die Embryo- und Fötus-Entwicklung verantwortlich zu sein. Während THR $\alpha$ 1 schon in frühen embryonalen Entwicklungsstadien exprimiert wird, spielt THR $\beta$  erst in späteren Stadien eine Rolle<sup>95</sup>.

Kommt es erst im Erwachsenenalter zu einem Mangel an Thyroidhormonen, sind die meisten Symptome reversibel und durch eine Substitutionstherapie reparabel<sup>132,133</sup>. Beim Erwachsenen greifen die THR's hauptsächlich in metabolische Abläufen ein und führen insgesamt zu einer katabolen Stoffwechsellage<sup>12,85</sup>. Protein-, Kohlenhydrat-, Fett- und Vitamin-Stoffwechsel werden beeinflusst<sup>134,135</sup>. Es kommt zu einer Erhöhung des Grundumsatzes<sup>136,137</sup>. Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt<sup>138</sup>. Man nimmt an, dass der Grundumsatz durch einen Thyroidhormon induzierten Adenosintriphosphat (ATP) Verbrauch erhöht wird. Die gesteigerte ATP Produktion ist nötig, um Ionen-Gradienten aufrecht zu erhalten bzw. zu generieren und um metabolische Prozesse einzuleiten. Vor allem die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und die *sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase* (SERCA) werden durch Thyroidhormone vermehrt exprimiert<sup>97-99</sup>. Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase hat eine besondere Bedeutung für die Funktion von Nervenzellen. Um den Ruhezustand beizubehalten und keine unkontrollierte Depolarisation auszulösen, ist ein aktiver Transport von Natrium-Ionen gegen das Konzentrationsgefälle zurück ins Cytoplasma nötig. Da trotz vorwiegend geschlossener Natriumkanäle, einige Natrium-Ionen entlang des Konzentrationsgefälles in die Zelle strömen und dies nicht zu einer Erregung der Zelle führen soll, müssen die Natrium-Ionen aktiv aus der Zelle transportiert werden. Auch nach Beendigung eines Aktionspotentials ist die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wichtig und trägt zur Wiederherstellung der Ionen-Verhältnisse bei. Dieser aktive Na<sup>+</sup>-Transport verbraucht ATP<sup>100-102</sup>. Auch in Skelettmuskelzellen induzieren Thyroidhormone einen ATP-verbrauchenden Ionen-Transporter der essentiell für die Muskelkontraktion ist. Um eine Muskelkontraktion auszulösen ist eine Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytosol nötig. Dies wird über Ryanodin-Rezeptoren reguliert. Thyroidhormone erhöhen die Rezeptor-Dichte und die Rezeptor-Aktivität der Ryanodin-Rezeptoren. Zum ATP Verbrauch kommt es bei der Calcium-Regeneration im sarkoplasmatischen Retikulum über SERCAs. SERCAs werden ebenfalls von Thyroidhormonen induziert<sup>103</sup> und katalysiert unter Hydrolyse von ATP den primär aktiven Transport von Ca<sup>2+</sup>-Ionen zurück in das sarkoplasmatische Retikulum<sup>104-106</sup>.

Thyroidhormone bewirken zudem eine Entkopplung der Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung und verhindern so die ATP-Synthese. Bei der Atmungskette, werden Elektronen, die durch die Oxidation von Glucose und Fettsäuren entstehen, von Cofaktoren, wie NAD und FAD, aufgenommen. Die Elektronen werden über mehrere Proteinkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran auf Sauerstoff übertragen und ein Protonengradient wird im Intermembranraum der Mitochondrien aufgebaut. Dieser Protonengradient wird normalerweise für die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt. Die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung sind somit chemiosmotisch gekoppelt. Thyroidhormone sind in der Lage diese beiden Prozesse zu entkoppeln. Dies führt dazu,

dass zwar der Protonengradient abgebaut, aber statt ATP Wärme produziert wird<sup>107</sup>. Außerdem kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch<sup>117</sup>. Die Thermogenese findet im braunen Fettgewebe statt<sup>139</sup>, das sich in Brust- und Schulterblatt-Bereichen befindet<sup>140,141</sup>. Bei jüngeren Menschen ist das braune Fettgewebe deutlich ausgeprägter. Reguliert wird die Thermogenese vor allem durch das sympathische Nervensystem und durch Thyroidhormone<sup>142</sup>. Bei der Thermogenese spielt Thermogenin bzw. *uncoupling protein* (UCP) 1 eine essentielle Rolle. Die Expression von UCP1 wird synergistisch von Noradrenalin und Thyroidhormonen induziert. Neben UCP1 wird auch UCP3 durch Thyroidhormone induziert<sup>143</sup>. Noradrenalin und T3 (2) alleine können die Expression von UCP1 verdoppeln. Eine synergistische Induktion von UCP1 führt jedoch zu einer 20-fachen Expression des Proteins<sup>109</sup>. Sowohl THR $\alpha$ 1 also auch THR $\beta$ 1 spielen eine Rolle bei der Thermogenese. Während THR $\beta$ 1 die UCP1 Expression reguliert, verstärkt THR $\alpha$ 1 die Katecholamin-Wirkung<sup>108</sup>.

Außerdem haben die THRs einen Einfluss auf den Lipoprotein-Stoffwechsel. Durch die vermehrte Expression an *low-density* Lipoprotein (LDL)-Rezeptoren in den Hepatozyten wird Cholesterin abgebaut und umgesetzt zu Gallensäuren oder Steroiden<sup>110</sup>. Zudem induzieren Thyroidhormone das *sterol response element binding protein* (SREBP)-2. SREBP-2 reguliert viele Stoffwechselprozesse. Neben dem Cholesterin-Stoffwechsel greift SREBP-2 auch in den Glucose- und Fettsäure-Metabolismus ein. SREBP-2 ist ebenfalls in der Lage die LDL-Rezeptor-Dichte in Hepatozyten zu erhöhen<sup>111</sup>. Außerdem senken Thyroidhormone die Apolipoprotein (Apo) B48 und ApoB11 Expression. Apo B48 und Apo B11 sind auf Chylomikronen lokalisiert und mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko assoziiert<sup>112</sup>. Zudem wird die Expression von ATP-*binding cassette* Transporter (ABC) A1 gehemmt. ABCA1 ist für den reversen Cholesterin-Transports aus dem Cytosol an die Zelloberfläche verantwortlich. Apo A1 kann das Cholesterin auf der Zelloberfläche binden, wodurch sog. Lipid-Domänen entstehen, aus denen prä- $\beta$ -*high density* Lipoprotein (prä- $\beta$ -HDL) bzw. HDL gebildet wird. Das ABCA1-Gen enthält *Response* Elemente für LXR und SREBP-2<sup>113</sup>. THR $\beta$  ist jedoch in der Lage, um diese Bindungsstelle zu konkurrieren (DR4-Element) und sorgt somit für eine verringerte HDL-Synthese<sup>114</sup>. Thyroidhormone haben auch einen direkten Einfluss auf die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA Reduktase)<sup>111</sup>. Die HMG-CoA Reduktase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterin-Biosynthese. Im Gegensatz zu den genannten LDL- und HDL-senkenden Eigenschaften wird durch die Stimulation der HMG-CoA Reduktase die Cholesterin-Biosynthese induziert. Insgesamt überwiegen jedoch die Cholesterin-senkenden Effekte<sup>144</sup>.

Auch auf die Gallensäure-Biosynthese haben die Thyroidhormone einen Einfluss. Cholesterin 7-Hydroxylase (CYP7A1) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt



der Gallensäuren-Biosynthese. Thyroidhormone können die CYP7A1 Expression in der Leber hemmen und somit auch die Gallensäure-Synthese<sup>115,116</sup>.

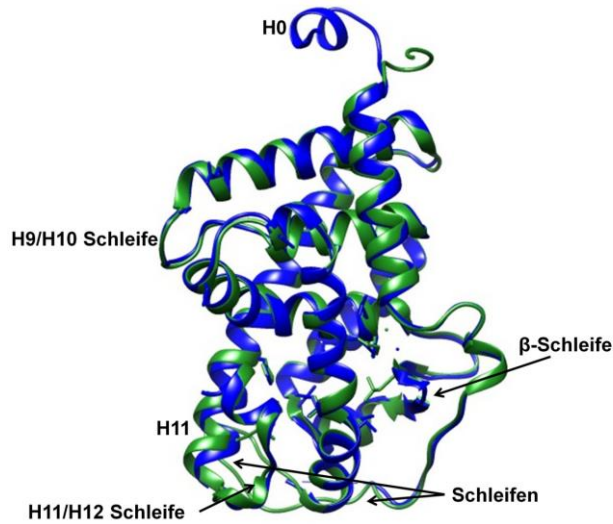
Auch die Enzyme der Fettsäure-Synthese und Fettsäure-Oxidation werden direkt durch die THR<sub>s</sub> beeinflusst<sup>134,135,145</sup>. Einerseits führen Thyroidhormone zu einer Induktion der Liponeogenese in der Leber, andererseits wird die Lipolyse verstärkt. Jedoch überwiegt die im Plasma und Fettgewebe induzierte Lipolyse<sup>3,4</sup>. Die *de novo* Lipogenese findet in der Leber statt und wird durch die Induktion der Acetyl CoA Carboxylase 1(ACC1), der Fettsäure-Synthase (FAS), des *carbohydrate response element binding* Proteins (ChREBP) und des SREBP-1c verstärkt<sup>118</sup>. Bei der Differenzierung von Adipocyten-Zellen aus Präadipocyten spielen Thyroidhormone ebenfalls eine Rolle<sup>119</sup>. Die Lipolyse im Fettgewebe wird durch die Erhöhung der Expression  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren im Fettgewebe vermittelt. Außerdem wird die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 $\alpha$  (CPT-1 $\alpha$ ) induziert. CPT-1 $\alpha$  ist eines der wichtigsten Enzyme der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren. CPT-1 $\alpha$  transportiert langkettige Fettsäuren in die Mitochondrien-Matrix, den Ort der  $\beta$ -Oxidation. Das CPT-1 $\alpha$  Gen enthält neben einem PPAR-Response Element (PPRE) unter anderem ein TRE<sup>117</sup>. Darüber hinaus sind die Fettsäuren, die durch Thyroidhormon-abhängige Lipolyse gebildet werden, Substrate für die Thermogenese<sup>146</sup>.

In der Leber kommt es zudem bei einer Aktivierung von THR $\beta$ 1 durch eine verstärkte Gluconeogenese und Glykogenolyse zu einer vermehrten Bildung von Glucose. Man spricht von einem Insulin-antagonistischen Effekt. T3 (**2**) fördert die Gluconeogenese durch erhöhten Alanin-Transport in die Hepatocyten. In der Leber wird L-Alanin zu Pyruvat desaminiert und dient damit als Quelle für Oxalacetat und letztendlich Glucose<sup>120</sup>. Außerdem beeinflussen Thyroidhormone die Gluconeogenese durch die Induktion der Expression von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), dem Enzym, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gluconeogenese katalysiert<sup>121</sup>. Allerdings haben Thyroidhormone auch bezüglich des Glucose-Stoffwechsels anabole Effekte. Zum einen wird in der gestreiften Muskulatur und in Fettzellen vermehrt der Glucosetransporter (GLUT) -4 exprimiert und somit der Transport von Glucose in die Zellen gefördert<sup>122</sup>. Zum anderen wird im Pankreas die Differenzierung von Inselzellen durch Thyroidhormone gefördert. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors MafA reifen die Zellen aus und sind in der Lage, Glucose-abhängig Insulin zu sezernieren<sup>123</sup>.

Die Effekte auf das Herz werden über THR $\alpha$ 1 vermittelt. Durch eine Aktivierung des Rezeptors wird die sympathische Aktivität im Herzen erhöht. Dies geschieht durch eine Erhöhung der  $\beta$ <sub>1</sub>-Rezeptor-Dichte und somit einer verstärkten Katecholamin-Wirkung. Letztendlich führt dies zu einem gesteigertem Herzzeitvolumen und einer erhöhten Herzfrequenz<sup>3,4</sup>. Außerdem spielen die THR<sub>s</sub> eine Rolle bei der negativen Rückkopplung. Dieses Thema wird in Kapitel 1.5.3 behandelt.

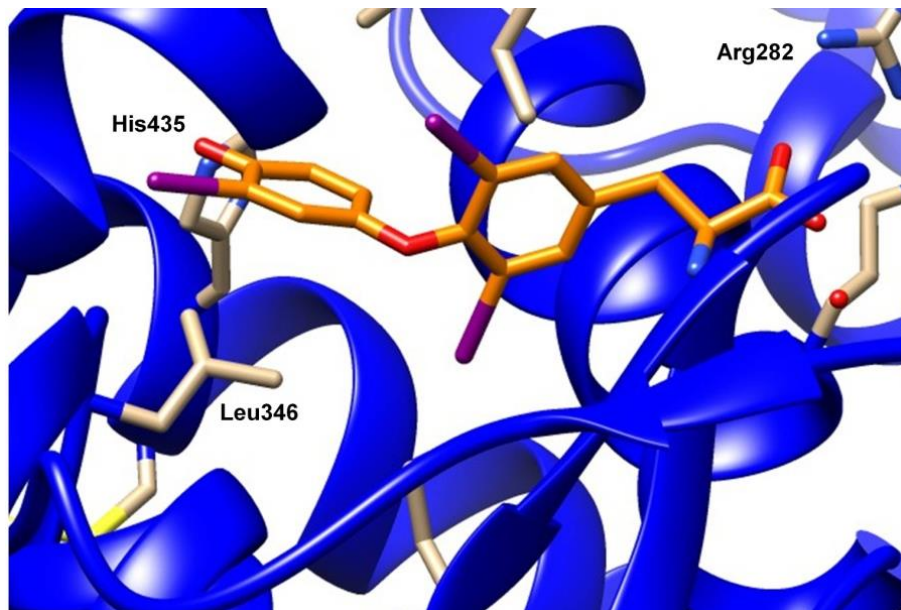
### 1.2.4 Ligandenbindung

Die LBD der THR $\alpha$ s besteht, wie bei den meisten nukleären Rezeptoren, aus 12 Helices und ist *sandwichartig* in drei Schichten gefaltet. Dabei bilden Helix 5, 6, 9 und 10 die mittlere Schicht. Helix 1, 2, 3, 4 sowie Subdomäne 1 und Helix 7, 8, 11 sowie 12 formen jeweils die anderen beiden Schichten<sup>147</sup>. Die Bindungstasche besteht größtenteils aus hydrophoben Aminosäuren und hat ein kalkuliertes Volumen von 600 Å<sup>3</sup>. T3 (2) nimmt ein Volumen von 530 Å<sup>3</sup> ein und füllt damit die Bindetasche fast vollständig aus.



**Abbildung 7: Vergleich der beiden LBDs von THR $\alpha$  (grün, PDB-ID: 2H77) und THR $\beta$  (blau, PDB-ID: 1XZX)<sup>148</sup>. Die  $\beta$ -Schleife, die Schleife zwischen Helix 9 und 10, sowie zwischen 11 und 12 und Teile der Helix 11 sind verschieden. THR $\beta$  hat außerdem eine zusätzliche Helix am N-terminalen Ende (H0). THR $\alpha$  zeichnet sich zudem durch unterschiedliche Schleifen zwischen Helix 1 und 3 aus.**

Ein Vergleich der Kristallstrukturen von THR $\alpha$  und THR $\beta$  wurde von Wagner *et al.* mit rTHR $\alpha$  und hTHR $\beta$  durchgeführt. Grundsätzlich sind die Ergebnisse auf den humanen Rezeptor übertragbar, da die Aminosäure-Sequenz der LBD des THR $\alpha$  einer Ratte sich nur in einer Aminosäure der Helix 1 von der Sequenz des humanen THR $\alpha$  unterscheidet<sup>148</sup>. Röntgenkristall-Untersuchungen, bei denen die LBD des rTHR $\alpha$  mit hTHR $\beta$  verglichen wurden, zeigen, dass die Bindungstaschen der beiden Isoformen THR $\alpha$  und THR $\beta$  fast identisch aufgebaut sind (Abbildung 7). Unterschiede zwischen den beiden Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  bestehen lediglich in der  $\beta$ -Schleife, der Schleife zwischen Helix 9 und 10, sowie 11 und 12 und in Teilen der Helix 11. THR $\beta$  hat außerdem eine zusätzliche Helix am N-terminalen Ende, die als Helix 0 bezeichnet wird. THR $\alpha$  besitzt außerdem unterschiedliche Wendungen zwischen Helix 1 und 3.



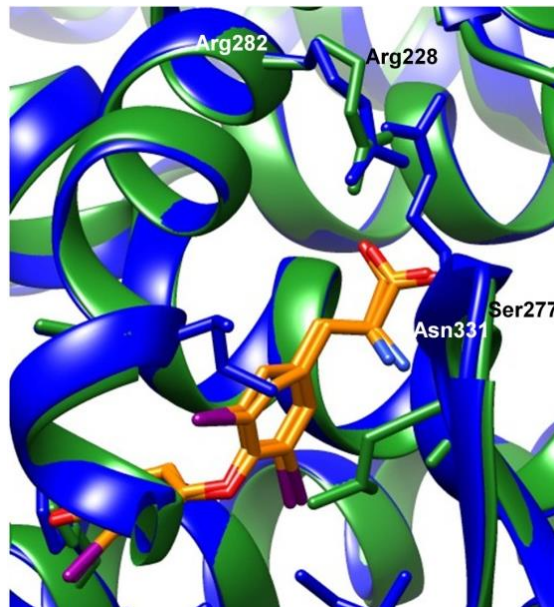
**Abbildung 8: T3 (2) Interaktion mit der Bindungstasche der THRs (hier abgebildet THRβ, PDB-ID: 1XZX)<sup>149</sup>.**

Bei der Interaktion zwischen T3 (2) und der LBD der THRs werden nur zwei ionische Wechselwirkungen ausgebildet (Abbildung 8). Die Iod-Atome befinden sich in einem hydrophoben Bereich und die äußeren Phenyl-Ringe ragen jeweils in hydrophilere Bereiche der LBD. Die Carboxyl-Gruppe bildet Wasserstoffbrücken mit der Guanidin-Funktion von Arginin (THRα: Arg228, THRβ: Arg282) aus und die Hydroxyl-Gruppe des Phenol-Restes bildet Wasserstoffbrücken mit Histidin (THRα: His381, THRβ: His435) aus. Über Wassermoleküle interagiert die Carboxyl-Gruppe zudem mit zwei anderen Arginin Resten und Asparagin (THRα: Arg262, Arg266, and Asn277, THRβ: Arg316, Arg320 und Asn331). Die Konformation von Histidin wird stabilisiert durch Phenylalanin und Methionin (nicht abgebildet, THRα: Phe405, Met256, THRβ: Phe459, Met310)<sup>147</sup>.

Die Amino-Gruppe hingegen bildet keine Wasserstoffbrücken-Bindung aus. Eine schwache polare Wechselwirkung mit Ser277 (THRα) bzw. Asn331 (THRβ) tritt auf. Dies erklärt die fast identische Bindungs-Affinität von TRIAC (3) im Vergleich zu T3 (2), bei dem die Amino-Gruppe durch oxidative Deaminierung fehlt.

Die Diphenylether-Gruppe der Thyroidhormone befindet sich in einem hydrophoben Bereich der Bindungstasche (Helix 3, 5, 6 und Subdomäne 6). Ein Phenylalanin und drei Leucin-Aminosäuren (THRα: Leu276, Leu287, Leu292 und Phe401, THRβ: Leu330, Leu341, Leu346 und Phe455) definieren diesen Bereich und interagieren mit der Diphenylether-Gruppe. Das Sauerstoffatom der Ether-Gruppe bildet keine Wasserstoffbrücken aus, ist jedoch für die Stereochemie des Liganden von Bedeutung. Die 3- und 5-Iod-Substituenten werden von hydrophoben Aminosäuren umgeben. 2 Isoleucin-Aminosäuren umgeben den 3-

Iod-Substituenten (THR $\alpha$ : Ile221 und Ile222, THR $\beta$ : Ile275 und Ile276) und Methionin, Alanin, sowie Isoleucin (THR $\alpha$ : Met256, Ala263 und Ile299, THR $\beta$ : Met310, Ala317 und Ile353) interagieren mit dem 5-Iod-Substituenten. 3'-Iod-Substituenten interagieren mit Glycin, Phenylalanin und Methionin (THR $\alpha$ : Gly290, Phe215, und Met388, THR $\beta$ : Gly344, Phe269, und Met442) (Die Interaktion von Iod-Substituenten in 5'-Position wird nachfolgend erläutert, siehe Abbildung 10).



**Abbildung 9: Vergleich der Bindung von T3 (2) in der THR $\alpha$  (grün, PDB-ID: 2H77) und THR $\beta$  (blau, PDB-ID: 1XZX) Bindungstasche<sup>149</sup>.**

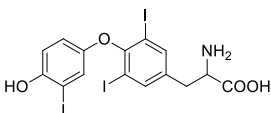
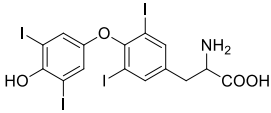
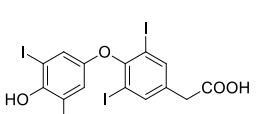
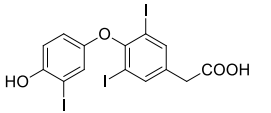
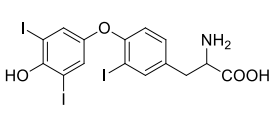
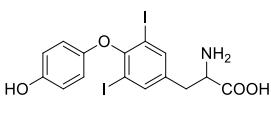
Der THR $\alpha$  und der THR $\beta$  unterscheiden sich auch bei der Bindung der Thyroidhormone nur wenig (Abbildung 9). Die Asparagin-Aminosäure von THR $\beta$  (Asn331) ist bei THR $\alpha$  mit Serin (Ser277) ersetzt. Die Abweichungen der Bindungs-Affinität zwischen den beiden Isoformen scheint allein auf dem Austausch dieser beiden Aminosäuren zu beruhen. Die  $\beta$ -Schleife wird bei der THR $\beta$ -LBD deshalb verschoben und rückt näher an die Carboxyl-Gruppe des Thyroidhormons. Außerdem ist der Torsionswinkel der Aminosäure Arginin bei beiden Isoformen leicht verschoben (THR $\alpha$ : Arg228, THR $\beta$ : Arg282).

Die unterschiedliche Bindungs-Affinität zwischen T4 (1) und T3 (2) (aktive Form) lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass der THR-T4 Komplex weniger stabil als der THR-T3 ist.



## 1.2.5 Endogene Liganden der THR $\alpha$ s und deren pharmakologische Bedeutung

Tabelle 5: endogene Liganden der THR $\alpha$ s.

Endogener Ligand	Bindungs-Affinität THR $\alpha$ 1 (EC $_{50}$ )	Bindungs-Affinität THR $\beta$ 1/2 (EC $_{50}$ )	Testsystem
<b>T3 (2)</b> 	1,5nM <sup>150</sup> 0,5 nM <sup>151</sup> 3,4 nM (CHO) <sup>152</sup> 1,9 nM (HeLa) <sup>152</sup> 1,8 nM (3T3-L1) <sup>152</sup> 2,2 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 0,77 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	4,2nM <sup>150</sup> 1,5nM <sup>151</sup> 6,2 nM (CHO) <sup>152</sup> 2,6 nM (HeLa) <sup>152</sup> 4,2 nM (3T3-L1) <sup>152</sup> 2,2 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 1,2 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	Luciferase-Reportergen Assay (HeLa) Luciferase-Reportergen Assay (CV-1) Luciferase-Reportergen Assay (verschiedene Zelllinien) Fluoreszenz basierter Coactivator Recruitment Assay ( mit den Coaktivatoren SRC3-2 und SRC1-2)
<b>T4 (1)</b> 	37nM (CHO) <sup>152</sup> 33 nM (HeLa) <sup>152</sup> 39 nM (3T3-L1) <sup>152</sup> 1,7 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 7,9 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	135 nM (CHO) <sup>152</sup> 99 nM (HeLa) <sup>152</sup> 472 nM (3T3-L1) <sup>152</sup> 12,3 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 22,7 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	Luciferase-Reportergen Assay (verschiedene Zelllinien) Fluoreszenz basierter Coactivator Recruitment Assay ( mit den Coaktivatoren SRC3-2 und SRC1-2)
<b>TETRAC (4)</b> 	27,3 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 19,9 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	21 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 12,5 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	Fluoreszenz basierter Coactivator Recruitment Assay ( mit den Coaktivatoren SRC3-2 und SRC1-2)
<b>TRIAC (3)</b> 	1,5nM <sup>150</sup> 1,5 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 0,74 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	0,5nM <sup>150</sup> 1,3 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 1,1 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	Luciferase-Reportergen Assay (HeLa) Fluoreszenz basierter Coactivator Recruitment Assay ( mit den Coaktivatoren SRC3-2 und SRC1-2)
<b>rT3 (10)</b> 	696 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 57,1 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	1784 nM (SRC3-2) <sup>153</sup> 176,3 nM (SRC1-2) <sup>153</sup>	Fluoreszenz basierter Coactivator Recruitment Assay ( mit den Coaktivatoren SRC3-2 und SRC1-2)
<b>3,5-T2 (11)</b> 	7200 nM <sup>154</sup>	400 nM <sup>155</sup> 870 nM <sup>154</sup>	Luciferase-Reportergen Assay (GH3) Reportergen Assay (Hefe)

Die endogenen Liganden der THR $\alpha$ s sind die Thyroidhormone. Als aktive Form wird T3 (2) beschrieben, da es im Vergleich zu T4 (1) eine deutlich höhere Rezeptor-Affinität aufweist<sup>152,153</sup>. Neben T3 (2) und T4 (1) sind aber auch einige Thyroidhormon-Metabolite in der Lage, den Rezeptor zu aktivieren. Die Iodthyroacetate TETRAC (4) und TRIAC (3) sind ebenfalls potente THR-Agonisten. Vor allem TRIAC (3) zeigt eine besonders hohe THR-



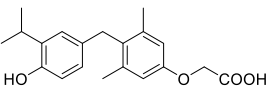
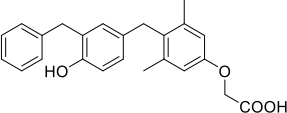
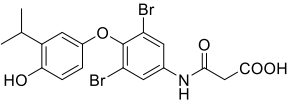
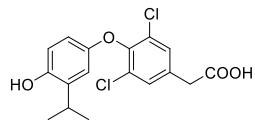
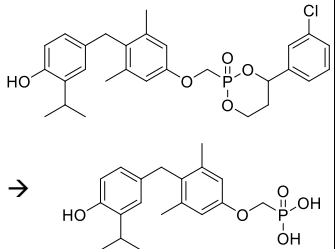
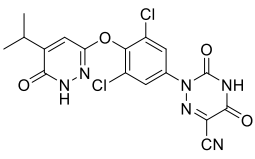
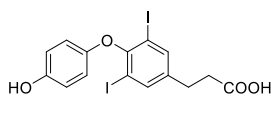
Affinität. Während die  $EC_{50}$ -Werte am  $THR\alpha$  vergleichbar sind mit T3 (**2**)<sup>150,153</sup>, ist die Affinität von TRIAC (**3**) an  $THR\beta$  im Durchschnitt etwa 1,5-fach höher<sup>8,9</sup>. Bei der ersten Detektion von TRIAC (**3**) in den 1950er Jahren wurde das Iodthyroacetat-Derivat daher zunächst als die eigentliche aktive Wirkform der Thyroidhormone betrachtet. Aufgrund der geringen endogenen Spiegel wurde diese Theorie jedoch bald widerlegt<sup>156–158</sup>. TETRAC (**4**) hat im Vergleich dazu eine wesentlich schwächere Affinität zu beiden  $THR$ -Isoformen. Neben den Iodthyroacetaten gibt es noch weitere Thyroidhormon-Metabolite mit Aktivität am  $THR$ . Allerdings zeichnen sich diese lediglich durch eine geringe Potenz am Rezeptor aus. 3,3',5'-Triiodthyronin (reverses T3, rT3, **10**) beispielsweise wird als biologisch inaktive Form der 3-fach Iod substituierten Thyroidhormone angesehen. *In vitro* lässt sich zwar ein  $EC_{50}$ -Wert für die Aktivität an  $THR\alpha$  und  $THR\beta$  ermitteln, biologisch betrachtet ist rT3 (**10**) aber inaktiv<sup>159</sup>. Weitere Deiodierungen werden als metabolische Inaktivierungswege beschrieben. Für den Hauptmetaboliten der Diiodthyronine, 3,3'-Diiodthyronin (3,3'-T2, **12**) ist keine  $THR$ -Aktivität detektierbar. Für das 3,5-Diiodthyronin (3,5-T2, **11**) wurde eine schwache  $THR\beta$ -Aktivität belegt<sup>160,161</sup>. Monoiodthyronine und auch die decarboxylierten Thyronamine weisen ebenfalls keine  $THR$ -Affinität auf<sup>6</sup>. Neben der physiologischen Bedeutung der Thyroidhormone, finden einige Derivate auch in der Pharmakotherapie Verwendung. Thyroidhormone werden hauptsächlich zur Behandlung der Hypothyreose eingesetzt. Man unterscheidet zwischen einer angeborenen, konnatalen Hypothyreose und einer erworbenen Hypothyreose. Etwa ein Kind von 3.000-4.000 Neugeborenen kommt mit einer angeborenen Hypothyreose zur Welt. Ursachen sind beispielsweise, eine fehlende oder nur teilweise ausgebildete Schilddrüse, eine dysplastische, ektope Anlage der Schilddrüse oder sehr selten eine Störung der Thyroidhormon-Synthese. Eine erworbene Hypothyreose kann in eine primär, sekundär und tertiär erworbene Hypothyreose unterteilt werden. Der primären Hypothyreose kann eine Autoimmunkrankheit, wie die Hashimoto-Thyreoiditis zugrunde liegen oder sie wurde iatrogen nach einer Schilddrüsenoperation oder nach einer Radioiodtherapie erworben. Auch nach einer Therapie mit Thionamiden, Amiodaron oder Lithium kann es zur primären Hypothyreose kommen. Eine sekundäre Hypothyreose tritt in Folge einer Hypophysenvorderlappen-Insuffizienz auf, die z.B. durch einen Tumor ausgelöst wird. Eine tertiäre Hypothyreose wird hingegen durch eine Hypothalamus-Insuffizienz verursacht<sup>162,163</sup>. Eine Hypothyreose zeichnet sich allgemein durch eine Unteraktivität des Stoffwechsels und Ablagerung von Glykosaminoglykanen aus. Es kommt zu Symptomen wie Müdigkeit, Kälteempfindlichkeit durch geringe periphere Blutzirkulation, Belastungsdyspnoe, Gewichtszunahme, trockene Haut und einer Myxödem-Bildung. Ursache des Myxödems ist wahrscheinlich ein gestörter Abbau von Glykosaminoglykanen, wie z.B. Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat durch eine verminderte Expression der Hyaluronidase in Folge eines Thyroidhormon-Mangels<sup>164</sup>. Behandelt wird die Hypothyreose durch eine

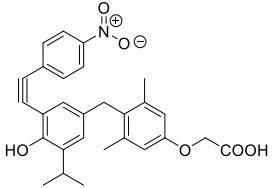
Substitutionstherapie mit T4 (1). Dosierte wird T4 (1) meist zwischen 1,5-25 µg pro kg Körpergewicht. Andere Thyroidhormone kommen selten zum Einsatz<sup>164</sup>. TRIAC (3, Tiratricol®) wird auf Grund seiner THRβ-Selektivität verwendet, um eine Schilddrüsenhormon-Resistenz (RTH) zu behandeln. Die RTH ist eine seltene Erkrankung („*orphan disease*“), der häufig eine Mutation im THRβ-Gen zugrunde liegt. In Kombination mit T4 (1) wird TRIAC (3) auch eingesetzt, um die TSH Freisetzung bei Schilddrüsenkarzinomen zu hemmen<sup>165,166</sup>. Außerdem wird TRIAC (3) häufig als Nahrungsergänzungsmittel zur Gewichtsreduktion verwendet. TETRAC (4) wird genutzt, um einen Thyroidhormon-Mangel zu substituieren. Beispielsweise ist TETRAC (4) bei der Behandlung des Myxödems<sup>167</sup> und RTH<sup>168</sup> indiziert. Jedoch sind höhere Dosen erforderlich als bei der Verwendung von TRIAC (3) auf Grund der geringeren Potenz und der kürzeren Halbwertszeit<sup>169,170</sup>. Eine Hyperthyreose wird bisher noch nicht mit Arzneistoffen behandelt, die mit den THRs interagieren. Die Ursachen für eine Hyperthyreose kann eine Autoimmunerkrankung, wie Morbus Basedow oder eine Autonomie der Schilddrüse sein. Eher selten sind entzündliche Erkrankungen der Schilddrüse, eine Überdosierung von Schilddrüsenhormonen oder Tumore Ursache einer Hyperthyreose. Häufig treten als Symptome ein Struma, Tachykardie und ein Exophthalmus, ein pathologisches Hervortreten des Augapfels, auf. Diese drei Symptome werden auch als Merseburger Trias bezeichnet. Außerdem kommt es zu einem erhöhten Grundumsatz und damit zu einer Gewichtsabnahme, Durchfall, Hyperhidrosis, Müdigkeit und Nervosität. Eine krisenhafte, lebensbedrohliche Verschlimmerung einer Schilddrüsenüberfunktion bezeichnet man als thyreotoxische Krise. Es kommt zu Tachykardie, Arrhythmien, hohem Fieber, schweren Durchfällen und Erbrechen, Bewusstseinsstörungen und letztendlich zum lebensbedrohlichen Koma. Therapiert wird medikamentös mit Thyreostatika. Perchlorate verhindern die Aufnahme von Iod in die Schilddrüse und sind somit Iodinations-Hemmer. Thiouracile, wie Propylthiouracil und Mercaptoimidazol-Derivate, wie Carbamazol hemmen die Thyreoperoxidase und damit hauptsächlich die Oxidation des Iodids zu Iod und den Einbau von Iod in das Thyrosin-Gerüst (Biosynthese der Thyroidhormone siehe Kapitel 1.5.2). Eine Radioiodtherapie mit <sup>131</sup>Iod ist ebenfalls möglich. Dabei wird durch die β-Strahlung des Iod-Isotopes umliegendes Schilddrüsengewebe zerstört. Das sogenannte Plummern durch die Substitution mit Iodid oder Iod stellt eine weitere Therapieoption dar. Eine hohe Dosis Iod kann die Iodid-Aufnahme, Hormon-Synthese und Hormonausschüttung hemmen. Dieser Effekt hält nur wenige Tage an und wird deshalb nur noch kurz vor einem operativen Eingriff verwendet, da in Folge der Iod- oder Iodid-Therapie das Schilddrüsengewebe weniger stark durchblutet wird und deshalb besser operabel ist. Die operative Therapie bezeichnet man als Thyreoidektomie. Sie hat das Ziel, das Wiederauftreten einer Hyperthyreose dauerhaft zu verhindern<sup>171</sup>.



## 1.2.6 Synthetische Liganden der THRs und deren pharmakologische Bedeutung

Tabelle 6: synthetische Liganden des THRs.

synthetischer Ligand	Bindungs-Affinität	Physiologische Effekte	Indikation/ Status der klinischen Studie
<p>Sobetirome (GC1, <b>13</b>) 145,172</p> 	<p>10-fache THRB Selektivität: EC<sub>50</sub>(THRB) ~ 20 nM EC<sub>50</sub>(THRA) ~ 200nM<sup>173</sup> Akkumulation in der Leber</p>	<p>senkt LDL, Gesamt- cholesterol- Spiegel und Serum- Triglyceride, reduziert hepatische Steatose und regeneriert Leber (Tier-Modell)</p>	<p>Adrenoleukodystrophie →Phase 2 abgebrochen → wird nicht weiter finanziert</p>
<p>GC-24 (<b>14</b>)</p> 	<p>THRB selektiv K<sub>D</sub> (THRB) = 0,33 ± 0,06 nM, K<sub>D</sub>(THRA) = 13,4 ± 0,4 nM<sup>174</sup></p>	<p>Triglycerid- Spiegel werden gesenkt</p>	<p>bisher keine klinischen Studien („tool compound“)</p>
<p>Eprotriome (KB-2115, <b>15</b>) 145,172</p> 	<p>THRB Selektivität K<sub>i</sub> (THRB) = 0,43 nM, K<sub>i</sub>(THRA) = 9,6 nM<sup>175</sup>  Akkumulation in der Leber</p>	<p>senkt LDL, Gesamt- cholesterol- Spiegel und Serum- Triglyceride</p>	<p>Heterozygote familiäre Hypercholesterinämie (Phase 3) Primäre Hypercholesterinämie (Phase 2 abgeschlossen) in Kombination mit Ezetimib bei Hypercholesterinämie (Phase 2 abgeschlossen)</p>
<p>KB141 (<b>16</b>)</p> 	<p>THRB selektiv<sup>173</sup> EC<sub>50</sub>(THRB) = 1,1 nM EC<sub>50</sub>(THRA) = 23,9 nM</p>	<p>Triglycerid- Spiegel werden gesenkt</p>	<p>bisher keine klinischen Studien („tool compound“)</p>
<p>MB07811 (<b>17</b>) Prodrug von MB0734 (<b>18</b>) 145,176</p> 	<p><i>Prodrug</i> THRB Selektivität K<sub>i</sub> (THRB) = 2,95 nM, K<sub>i</sub>(THRA) = 35,2 nM<sup>177</sup></p>	<p>reduziert LDL und Gesamt- cholesterol- Spiegel Triglycerid- Spiegel werden gesenkt, Reduktion der hepatischen Steatose</p>	<p>Hypercholesterinämie (Phase 2 abgebrochen)</p>
<p>MGL-3196 (<b>19</b>)</p> 	<p>THRB selektiv EC<sub>50</sub>(THRB) = 0,21 µM EC<sub>50</sub>(THRA) = 3,74 µM<sup>178</sup></p>	<p>Reduktion des Gesamt- cholesterol- Spiegels ohne kardiale Nebenwirkungen</p>	<p>Heterozygote familiäre Hypercholesterinämie (Phase 2 abgeschlossen) Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) (Phase 2 gestartet)</p>
<p>Diiodthyro- propionsäure (DITPA, <b>20</b>) 179</p> 	<p>kein aktiver Transport in Zelle nötig K<sub>D</sub> (THRB) = 24,63 nM, K<sub>D</sub>(THRA) = 41,67 nM<sup>180</sup></p>	<p>verbessert die Herzleistung (Tiermodell) reduziert LDL und Gesamt- cholesterol- Spiegel, reduziert Körpergewicht</p>	<p>systolische Herzinsuffizienz (zwei Phase 2 Studien → beide abgebrochen  Hypercholesterinämie →Phase 2 abgebrochen</p>

synthetischer Ligand		Bindungs-Affinität	Physiologische Effekte	Indikation/ Status der klinischen Studie
NH3 (21)		THR Antagonist (keine Subtypen- Selektivität) $IC_{50}(THR\beta) = 105 \text{ nM}$ $IC_{50}(THR\alpha) = 377 \text{ nM}^{181}$	in hohen Dosen (ab 924 nmol/kg/Tag bei Ratten) zum Teil partial- agonistische Eigenschaften <sup>181</sup>	bisher keine, nur als „tool compound“ genutzt

Durch die unterschiedlichen Expressionsmuster von  $THR\alpha$  und  $THR\beta$  und damit verbundene unterschiedliche physiologische Effekte scheint es sinnvoll, vor allem  $THR\beta$ -selektive Thyroidhormon-Analoga zu entwickeln. Durch die Selektivität erhofft man sich, kardiale Nebenwirkungen, die durch  $THR\alpha$  vermittelt werden, zu umgehen und so einen Arzneistoff mit einem besseren Nebenwirkungsprofil zu entwickeln<sup>182,183</sup>. Potenzielle Indikationen könnten beispielsweise Hypercholesterinämie und hepatische Steatose, sowie damit assoziierte Erkrankungen wie die Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) und die Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) sein.

Der erste entwickelte  $THR\beta$ -selektive Agonist war 1998 Sobetirome (GC-1, **13**)<sup>184</sup>. Da der Sauerstoff des Diphenylethers der Thyroidhormone keine Wasserstoffbrückenbindung eingeht, sondern nur für die korrekte Stereochemie der Verbindung sorgt, wurde der Sauerstoff in Sobetirome (**13**) mit einer Methyl-Gruppe ersetzt<sup>149</sup>. Auch die Iod-Atome wurden mit Alkyl-Substituenten ersetzt. Außerdem wurde die Amin-Gruppe analog zum  $THR\beta$ -selektiven TRIAC (**3**) entfernt. Der Vergleich der Kristallstrukturen von  $THR\alpha$  und  $THR\beta$  zeigt, dass sich die Bindungstaschen in der Position der Amin-Gruppe deutlich unterscheiden. Während  $THR\beta$  in dieser Position eine Asparagin-Aminosäure besitzt, ist beim  $THR\alpha$  das Asparagin mit Serin ersetzt. Die Interaktion von Serin mit dem Amin trägt geringfügig zur Bindungs-Affinität bei. Dieser Unterschied in der Aminosäure-Sequenz reicht aus, um eine  $THR\beta$ -Selektivität durch das Entfernen der Amin-Gruppe zu erzeugen<sup>185</sup>. Insgesamt ergab sich eine 10-fache  $THR\beta$ -Selektivität für Sobetirome (**13**,  $EC_{50}(THR\beta) \sim 20 \text{ nM}$ ,  $EC_{50}(THR\alpha) \sim 200 \text{ nM}$ )<sup>173</sup>. Sobetirome (**13**) soll sich in der Leber anreichern und senkt LDL, Gesamtcholesterol-Spiegel und Serum-Triglyceride. Außerdem zeigten sich im Tiermodell eine Reduzierung einer induzierten hepatischen Steatose und eine Regeneration der Leber<sup>145,172</sup>. Die Firma QuatRx Pharmaceuticals startete 2005 die erste klinische Studie. Nachdem die Entwicklung für die Anwendung bei Hypercholesterinämie scheiterte, wurde mittlerweile auch die Phase 2 Studie zur Behandlung der Adrenoleukodystrophie aus finanziellen Gründen abgebrochen. Die Adrenoleukodystrophie ist eine sehr seltene Erkrankung, der eine Mutation des peroxisomalen Transporters ABCD1 zugrunde liegt. Dieser Transporter sorgt für die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren, sog. *very long chain fatty acids* (VLCFAs), in die Peroxisomen. Können die VLCFAs nicht mehr in den

Peroxisomen abgebaut werden, kommt es zu erhöhten VLCFA-Spiegeln. VLCFAs werden in Zellmembranen eingelagert und können vermutlich zu einer Veränderung der Membranstruktur des Myelins führen und so Nervenschädigungen hervorrufen. Erste Tiermodelle zeigten für die Behandlung der Adrenoleukodystrophy mit Sobetirome (**13**) vielversprechende Ergebnisse<sup>186,187</sup>.

Bei der Entwicklung des noch selektiveren GC-24 (**14**) nutzte man zudem die Unterschiede von THR $\alpha$  und THR $\beta$  in der Helix 11 aus. Die THR $\beta$ -Bindungstasche scheint in dieser Position deutlich flexibler zu sein. Die Substitution mit einem Benzenring am äußeren Ring verbesserte somit die Selektivität ( $K_D$  (THR $\beta$ ) = 0,33  $\pm$  0,06 nM,  $K_D$ (THR $\alpha$ ) = 13,4  $\pm$  0,4 nM)<sup>174</sup>. GC-24 (**14**) wurde allerdings nur zu *in vitro* Untersuchungen thyromimetischer Substanzen genutzt und nie in einer klinischen Studie untersucht<sup>187</sup>.

Ein weiteres THR $\beta$ -selektives Derivat, das entwickelt wurde, ist Eprotriome (KB-2115, **15**). Auch dieses Derivat basiert auf der Struktur von TRIAC (**3**) und wurde 2004 von Bristol-Myers Squibb patentiert. Dabei diente die von Karo Bio 2003 veröffentlichte Substanz KB-141 (**16**) als Leitstruktur<sup>188</sup>. Der Vorteil von Eprotriome (**15**) ist neben der THR $\beta$ -Selektivität ( $K_i$  (THR $\beta$ ) = 0,43 nM,  $K_i$ (THR $\alpha$ ) = 9,6 nM<sup>175</sup>) die hohe Verteilung in der Leber. Die Leber-Selektivität stellt eine weitere Substanzeigenschaft dar, die genutzt werden kann, um das Nebenwirkungsprofil zu minimieren<sup>189</sup>. In einer Phase 1 Studie konnte gezeigt werden, dass Eprotriome (**15**) bei übergewichtigen Patienten mit Hypercholesterinämie LDL, Gesamtcholesterol-Spiegel und Serum-Triglyceride senkt, ohne kardiale Nebenwirkungen zu besitzen<sup>190</sup>. Zwei Phase 2 Studien wurden erfolgreich abgeschlossen. Bei der Monotherapie zur Behandlung der primären Hypercholesterinämie und der Kombinationstherapie mit Ezetimib bei Hypercholesterinämie konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden<sup>187</sup>. 2011 wurde daraufhin eine Phase 3 Studie zur Behandlung der heterozygoten familiären Hypercholesterinämie gestartet. Da zeitgleich bei einer Tierstudie mit Hunden schwere Nebenwirkungen in Form von Chondrodysplasien auftraten, wurde die Phase 3 Studie allerdings früh abgebrochen<sup>191</sup>.

Ein anderer Ansatz, um eine Akkumulation in der Leber zu erreichen, war die Entwicklung von *Prodrugs*. Metabasis Therapeutics entwickelte einige Phosphonatester und Phosphonamid-Derivate, darunter MB07811 (**17**) das über CYP3A4 zu MB0734 (**18**) metabolisiert wird. Die Bindungs-Affinität und Selektivität von MB0734 (**18**) im Vergleich zu Sobetirome (**13**) und Eprotriome (**15**) ist zwar wesentlich geringer ( $K_i$  (THR $\beta$ ) = 2,95 nM,  $K_i$ (THR $\alpha$ ) = 35,2 nM), die *in vivo* Untersuchungen ergaben aber vielversprechende Ergebnisse<sup>177</sup>. MB07811 (**17**) reduziert LDL, Gesamtcholesterol-Spiegel und Triglycerid-Spiegel. Außerdem konnte eine Reduktion der hepatischen Steatose bei NASH Patienten gezeigt werden. MB07811 (**17**) hat im Vergleich zu den anderen Phosphonatester und

Phosphonamid-Derivaten eine akzeptable Bioverfügbarkeit von 10% und weist in *in vivo* Experimenten eine geringe extra-hepatische Verteilung auf<sup>192</sup>. Trotz geringer kardialer Nebenwirkungen wurde die bereits initiierte Phase 2 Studie zur Behandlung der Hypercholesterinämie kurz vor Beginn abgebrochen. Es wurde festgestellt, dass MB07811 (**17**) die endogenen Thyroidhormon-Spiegel signifikant senkt und damit ein hohes Risiko für Nebenwirkungen besteht.

Madrigal Pharmaceuticals entwickelte ein weiteres Thyromimetikum MGL-3196 (**19**). Im Moment ist dieses Derivat das vielversprechendste THR $\beta$ -selektive Thyromimetikum. Eine Phase 2 Studie zur Behandlung der heterozygoten familiären Hypercholesterinämie wurde erfolgreich abgeschlossen und eine Phase 2 Studie zur Behandlung der Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) wurde gestartet<sup>187</sup>.

Insgesamt ist es noch nicht gelungen, ein THR $\beta$ -selektives Thyromimetikum zu etablieren, da es trotz der Versuche, die Selektivität zu steigern und die Verteilung auf die Leber zu beschränken, zu zahlreichen Nebenwirkungen kam. Gelingt es, das Nebenwirkungsprofil zu vermindern, könnten THR $\beta$ -selektive Derivate durchaus eine Therapieoption bei Erkrankungen, die mit einer Hypercholesterinämie assoziiert sind, darstellen.

Neben den THR $\beta$ -selektiven Agonisten ist auch ein unspezifisches Thyromimetikum zu nennen, das entwickelt wurde für die Behandlung der systolischen Herzinsuffizienz. Diiodthyropropionsäure (DITPA, **20**) benötigt keinen aktiven Transporter im Vergleich zu T3 (**2**) und T4 (**1**), um Zellmembranen zu passieren (siehe Kapitel 1.5.2). DITPA (**20**) zeigte allerdings nicht die im Tierversuch detektierten positiven kardialen Effekte im Menschen. Zwei Phase 2 Studien wurden daraufhin abgebrochen. Da DIPTA (**20**) in der Lage ist LDL-Spiegel, Gesamtcholesterol-Spiegel und das Körpergewicht signifikant zu reduzieren, wurde eine klinische Studie zur Behandlung der Hypercholesterinämie gestartet. In Phase 2 wurde diese Studie jedoch auf Grund der schlechten Verträglichkeit abgebrochen<sup>193</sup>.

Bisher ist kein Thyroidhormon Antagonist auf dem Markt. Problematisch ist, dass viele *in vitro*-charakterisierten Antagonisten *in vivo* keine antagonistischen Effekte zeigen<sup>194</sup>. Zudem ist die Datenlage an *in vivo*-Untersuchungen mit Antagonisten sehr gering<sup>181,195</sup>. Sinnvoll könnte ein THR $\alpha$ 1-selektiver Antagonist zum Einsatz als Antiarrhythmikum sein oder ein THR-Inhibitor als Alternative zur Behandlung der Hyperthyreose. Ein THR-Antagonist, der auch in Tiermodellen getestet wurde, ist NH3 (**21**). NH3 (**21**) zeigt eine antagonistische Wirkung an beiden THR-Isoformen. Allerdings hat auch NH3 (**21**) in hohen Dosen (ab 924 nmol/kg/Tag bei Ratten) zum Teil partialagonistische Eigenschaften<sup>181</sup>. Die partialagoistische Aktivität betrifft vor allem die Einflüsse auf den Cholesterol-Spiegel, die Effekte auf das Herz und den TSH-Spiegel<sup>194</sup>.

### 1.3 PPAR $\gamma$

1969 wurde in ersten Tierversuchen eine Clofibrat (**22**) induzierte Peroxisomen Proliferation detektiert. Jedoch konnte erst 1990 PPAR $\alpha$  als erster Vertreter der PPARs kloniert und charakterisiert werden<sup>196,197</sup>. Mittlerweile sind die drei Subtypen PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  bekannt<sup>198</sup>. Obwohl die PPARs erst auf Grund der Induktion der Peroxisomen Proliferation entdeckt und auch danach benannt wurden, haben sie im Menschen keinen Einfluss auf Peroxisomen<sup>199</sup>. PPARs nehmen stattdessen eine entscheidende Rolle bei metabolischen Prozessen und Entzündungs-Reaktionen ein<sup>200</sup>. Während PPAR $\alpha$  einer der Hauptregulatoren der hepatischen  $\beta$ -Oxidation ist<sup>198,199</sup>, spielt PPAR $\beta/\delta$  vor allem eine Rolle bei der  $\beta$ -Oxidation in Skelettmuskeln<sup>201–204</sup>. PPAR $\gamma$  hingegen stimuliert weitestgehend anabole Stoffwechselprozesse und induziert die Adipocyten-Differenzierung. Zusätzlich greift PPAR $\gamma$  in den Lipid-Stoffwechsel ein und verbessert die Insulinsensitivität<sup>199,205</sup>. Während PPAR $\gamma$  primär im Fettgewebe exprimiert wird, ist PPAR $\alpha$  vor allem in der Leber<sup>198,199</sup> und PPAR $\beta/\delta$  ubiquitär, hauptsächlich aber in Darm, Herz, Fettgewebe, Haut und Gehirn zu finden<sup>206,207</sup>. PPAR $\gamma$  gehört zu den pharmazeutisch prominentesten nukleären Rezeptoren. Die Glitazone waren die ersten synthetischen Liganden von PPAR $\gamma$ . Schon lange bevor die PPARs überhaupt entdeckt wurde, verwendete man sie als orale Antidiabetika<sup>208,209</sup>. Erst Mitte der 1990er fand man heraus, dass Glitazone PPAR $\gamma$  Agonisten sind und ihre antidiabetische Wirkung durch die Aktivierung des nukleären Rezeptors entfalten<sup>210,211</sup>.

#### 1.3.1 Struktur und Aktivierung des Rezeptors

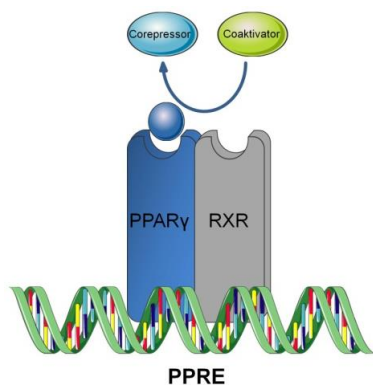


Abbildung 11: Transkriptionsapparat des PPAR $\gamma$ /RXR Heterodimers<sup>212</sup>.

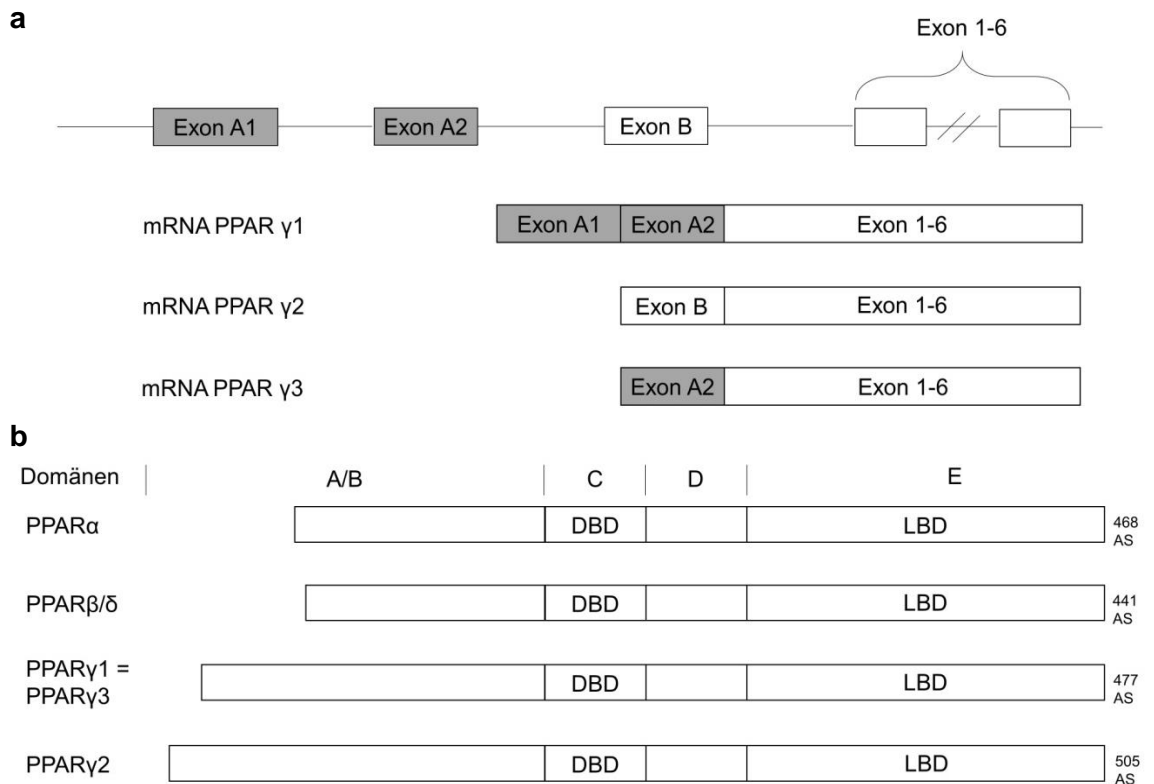
PPARs sind Nicht-Steroidrezeptoren. Im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren, wie den THR $s$  oder den RAR $s$ , hat sich die hochvariable Domäne E am C-terminalen Ende der PPARs etwa dreimal schneller evolutionär entwickelt. Man geht davon aus, dass dies auch die Ursache für die Subtypen-Spezialisierung der PPARs ist<sup>200</sup>. PPAR $\gamma$  bindet als Heterodimer mit RXR<sup>213–215</sup> an sein PPRE (Abbildung 11)<sup>212</sup>. Die PPRES bestehen aus einer

direkten Wiederholung der Basenabfolge AGGTCA (DR1)<sup>216</sup>. Alle PPARs können auch im ungebundenen Zustand an die PPREs binden und besitzen eine basale Aktivität am Rezeptor. Diese Basalaktivierung des Rezeptors ist besonders bei PPAR $\alpha$  und in etwas geringerem Ausmaß bei PPAR $\gamma$  ausgeprägt<sup>217,218</sup>. Die Phosphorylierung der AF-1 in Domäne A/B und die Stabilisierung der Helix 12 durch die Interaktion mit Coaktivatoren sorgt für diese basale Transkriptionsaktivität<sup>218–221</sup>. Normalerweise wird aber, analog zu anderen nukleären Rezeptoren, durch eine Ligandenbindung eine Konformationsänderung der Helix 12 induziert und Coaktivatoren wie SRC-1, CBP, p300, PGC-1 $\alpha$ , sowie PPAR *binding protein* (PBP) werden Ligand-abhängig rekrutiert<sup>198,222</sup>. Im inaktiven Zustand liegen Corepressoren wie NCoR1 (TRAC-1)<sup>63</sup> oder NCoR2 (SMRT)<sup>62</sup> gebunden an den Rezeptor vor. Neben der basalen Transkription und der Liganden-induzierten Transkription kann es auch zu einer Transrepression, einer Hemmung der Genexpression, kommen. Ursache kann eine SUMOylierung von PPAR $\gamma$  sein<sup>198,223</sup>. Eine SUMOylierung ist eine Form der posttranslationalen Modifikation, bei der kleine Ubiquitin-ähnliche Proteine (*small ubiquitin-like modifier*, SUMO) die Aktivität und die Lokalisation der entsprechenden Rezeptoren oder auch die Interaktion mit anderen Proteinen steuern. Dabei binden SUMO-Proteine an Lysin-Reste des entsprechenden Rezeptors<sup>224</sup>. Bei PPAR $\gamma$  findet diese Bindung entweder an der AF-1 (mPPAR $\gamma$ 1: Lys77, mPPAR $\gamma$ 2: Lys107) oder an der LBD (mPPAR $\gamma$ 1: Lys365, mPPAR $\gamma$ 2: Lys395) statt. Eine SUMOylierung der AF-1 führt zur Transrepression von PPAR $\gamma$  Zielgenen<sup>225</sup>. Eine Phosphorylierung an Ser112 (mPPAR $\gamma$ 2) scheint diese SUMOylierung zu induzieren<sup>226</sup>, während der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21 (FGF21) die SUMOylierung an der AF-1 inhibiert. Wenn die LBD SUMOyliert wird, kommt es dagegen nicht zu einer Repression von PPAR $\gamma$  Zielgenen, sondern zu einer Repression von proinflammatorischen Genen, wie z.B. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B). Diese SUMOylierung ist Liganden-abhängig und wird beispielsweise durch Rosiglitazon (**23**) oder GW00072 induziert. Wird die LBD an Lys365 (mPPAR $\gamma$ 1, bzw. Lys395 mPPAR $\gamma$ 2) Liganden-abhängig SUMOyliert, transloziert PPAR $\gamma$  zum Nukleus und bildet einen Komplex mit dem Corepressor NCoR1 und der Histon Deacetylase 3 (HDAC3) in der Promotor-Region des inflammatorischen Gens. Dadurch wird die Rekrutierung des Ubiquitin/19S-Proteasoms, das normalerweise für das Abdissoziieren der Corepressoren sorgt, gehemmt und die Promotor-Region wird blockiert. Es kommt folglich nicht zur Transkription proinflammatorischer Gene<sup>223</sup>.

Auch durch Phosphorylierung kann die Transkriptionsaktivität von PPAR $\gamma$  beeinflusst werden. Während die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) und die AMP-aktivierte Protein-Kinase (AMPK) die Transaktivierung von PPAR $\alpha$  verstärken, inhibieren sie die PPAR $\gamma$ 2 Aktivität durch Phosphorylierung des Serin114 (bzw. Ser112 bei mPPAR $\gamma$ 2) in der AF-1<sup>227</sup>. Entfernt man die komplette N-terminale Domäne A/B von PPAR $\gamma$ 2, ist die

transkriptionelle Aktivität des Rezeptors insgesamt erhöht, da eine Phosphorylierung somit unterbunden wird<sup>228</sup>.

### 1.3.2 Isoformen und Splicevarianten von PPAR $\gamma$



**Abbildung 12: Isoformen und Splicevarianten von PPAR $\gamma$  auf mRNA- und Protein-Ebene. (a) Splicevarianten von PPAR $\gamma$  auf mRNA-Ebene. Die grau hinterlegten Exonabschnitte sind nicht translatierbar, daher unterscheiden sich PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 3 nur auf mRNA-Ebene. (b) Vergleich der verschiedenen PPARs auf Protein-Ebene. Größtenteils unterscheiden sich die PPARs am N-terminalen Ende in der Domäne A/B, wobei PPAR $\gamma$  die längste Aminosäure-Sequenz besitzt. Die Splicevariante PPAR $\gamma$ 2 ist am N-terminalen Ende, durch die Translation von Exon B um 28 Aminosäuren (mPPAR $\gamma$ : 30 Aminosäuren) verlängert<sup>229–231</sup>.**

Das PPAR $\gamma$  Gen ist auf dem Chromosom 3 lokalisiert und kann in verschiedenen Splicevarianten transkribiert werden<sup>229–231</sup>. Es gibt mindestens vier Promotor-Regionen, die alternativ zur Transkription des PPAR $\gamma$  Gens dienen. Lange waren nur drei Splicevarianten bekannt. Sie unterscheiden sich ausschließlich an ihrem N-terminalen Ende. Die Exons 1-6 werden in allen drei Splicevarianten transkribiert (Abbildung 12a). Vor Exon 1-6 kann jedoch, abhängig davon an welcher Promotor-Region die Transkription startet, auch das Exon A1, Exon A2 und Exon B transkribiert werden. Exon A1 und Exon A2 sind nicht translatierbar. Daher unterscheiden sich Splicevarianten mit diesen Sequenzen nur auf mRNA-Ebene. Nach der Translation entstehen die gleichen Proteine. Dies ist bei PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 3 der Fall. PPAR $\gamma$ 1 enthält auf mRNA-Ebene das Exon A1 und das Exon A2, während bei

PPAR $\gamma$ 3 nur das Exon A2 transkribiert wird. Auf Protein-Ebene unterscheiden sich die beiden Splicevarianten nicht, jedoch sind die Expressionsmuster verschieden. PPAR $\gamma$ 1 wird in Darm, Gehirn, Gefäßzellen und Immunzellen exprimiert<sup>232,233</sup>, während PPAR $\gamma$ 3 vor allem in Makrophagen zu finden ist<sup>234</sup>. PPAR $\gamma$ 2 hingegen enthält das Exon B, das translatierbar ist. Es entsteht folglich auch auf Protein-Ebene eine Splicevariante, die sich in der Aminosäure-Sequenz im N-Terminus von den anderen beiden Splicevarianten unterscheidet. PPAR $\gamma$ 2 hat einen um 28 (bzw 30 bei mPPAR $\gamma$ 2) Aminosäuren verlängerten N-Terminus<sup>231</sup>. Somit ist diese Splicevariante die längste verglichen mit den anderen Splicevarianten von PPAR $\gamma$  und auch den anderen PPAR Subtypen (Abbildung 12b)<sup>199,235</sup>. PPAR $\gamma$ 2 wird vorwiegend im Fettgewebe exprimiert<sup>236-238</sup>. Neben diesen drei Splicevarianten wurden zumindest in den Makrophagen von Cynomolgus-Affen (auch Javaneraffen) vier weitere Splicevarianten entdeckt<sup>239</sup>. Außerdem sind auch im Menschen weitere Splicevarianten von PPAR $\gamma$  zu finden. PPAR $\gamma\Delta$ 5 beispielsweise konnte 2018 nachgewiesen werden. In der mRNA-Sequenz von PPAR $\gamma\Delta$ 5 fehlt das Exon 5 und damit besitzt das Protein keine LBD. Exprimiert wird diese Splicevariante in humanem Fettgewebe. Vor allem während der Adipocyten-Differenzierung kommt es zu einer Induktion von PPAR $\gamma\Delta$ 5. Wahrscheinlich kann PPAR $\gamma\Delta$ 5 an die PPRE binden und diese Bindestelle blockieren und somit die Genexpression verhindern<sup>240</sup>.



### 1.3.3 Physiologische Funktion von PPAR $\gamma$

Tabelle 7: physiologische Funktionen von PPAR $\gamma$  und molekularer Wirkmechanismus.

Allgemeine physiologische Funktion	Gewebe und spezielle Funktion	Molekularer Wirkmechanismus	Beteiligung der Splicevarianten
Adipocyten-Differenzierung	weißes Fettgewebe <sup>241</sup> ➤ Energie-speicherung	PPAR $\gamma$ ist vor allem in der frühen Phase von essentieller Bedeutung: ➤ die Transkriptionsfaktoren <i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i> (C/EBP)- $\alpha$ , C/EBP $\beta$ und C/EBP $\delta$ werden induziert <sup>237,242,243</sup> → C/EBP Proteine steuern die Zelldifferenzierung von Fibroblasten/Prädipocyten zu Adipocyten und induzieren die Expression von PPAR $\gamma$ <sup>244</sup>  Thermogenese im braunen Fettgewebe: ➤ Expression von UCP1 wird erhöht <sup>245</sup> ➤ Adiponektin induziert UCP Expression	PPAR $\gamma$ 2 ist hauptsächlich für die Stimulation der Adipocyten-Differenzierung verantwortlich <sup>246</sup>  PPAR $\gamma$ 1 hat jedoch auch adipogene Effekte <sup>247</sup>
	braunes Fettgewebe ➤ Thermogenese <sup>248</sup> ➤ Umwandlung von weißen Adipocyten in sog. beige Adipocyten <sup>249,250</sup>		
Beeinflussung des Lipid-Stoffwechsel	Adipocyten: ➤ Transport von Fettsäuren in die Adipocyten ➤ Lipogenese ➤ Synthese von Triglyceriden ➤ Lipolyse ➤ Adipokin-Synthese und Sekretion ➤ Glykolyse und Fettsäure-Synthese	Fettsäure-Transport: PPAR $\gamma$ erhöht die Expression von Fettsäuretransportern: ➤ Fettsäure Translokase (FAT/CD36) ➤ Fettsäure Transport-Protein (FATP) <sup>251,252</sup> ➤ Lipoproteinlipase (LPL) ➤ Fettsäure Bindungs-Protein 4 (FABP4)/ Adipocyten Protein 2 (aP2) <sup>232,237,253,254</sup> ➤ oxidiertes LDL Rezeptor 1 (OLR1) <sup>255</sup>  Fettsäure-Synthese: ➤ SREBP-1c wird direkt induziert <sup>256,257</sup> und induziert weitere für die Fettsäure-Synthese essentielle Enzyme (→ FAS, ACC1 und Stearoyl-Coenzym A Desaturase 1 (SCD-1) <sup>258,259</sup> ) ➤ auch PPAR $\gamma$ wird von SREBP-1c induziert <sup>260</sup>  Triglycerid-Synthese: ➤ Transport von Glycerol in die Adipocyten wird durch Induktion von Glycerol Transporter Aquaporin 7(AQP7) gefördert <sup>261</sup> ➤ die Expression der Monoacylglycerol O-Acyltransferase 1 (MOGAT1) und der Glycerol Kinase werden durch PPAR $\gamma$ erhöht → vermehrte Triglycerid-Synthese <sup>255</sup>  Formation von Lipidtröpfchen: ➤ erhöhte Expression von <i>fat-specific protein 27</i> (FSP27) und <i>adipose differentiation-related protein</i> (ADRP, Perilipin 2) <sup>262,263</sup>  Lipolyse: ➤ Katecholamin-Wirkungen, die über den $\beta$ 2 und $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor vermittelt werden, werden verstärkt ➤ PPAR $\gamma$ erhöht Expression von Protein Kinase A <i>catalytic subunit</i> (PKAcatal), <i>A kinase anchor protein 1</i> (AKAP1) und die Expression von den Lipasen Adipocyten Triglycerid Lipase (ATGL) und <i>hormone sensitive lipase</i> (HSL) <sup>262,263</sup>  Adipokin-Synthese und Sekretion: ➤ vermehrte Bildung von Adiponektin <sup>264-268</sup> → stimuliert die $\beta$ -Oxidation ➤ vermehrte Bildung von <i>Angiopoietin-like protein 4</i> (ANGPTL4) <sup>269,270</sup> → Hemmung LPL → Lipolyse↑ ➤ wahrscheinlich Reduktion der Bildung von Leptin und Resistin <sup>271,272</sup>  Glykolyse und Fettsäure-Synthese: ChREBP induziert PPAR $\gamma$ & PPAR $\gamma$ und SREBP-1c induzieren sich gegenseitig <sup>256,257,260,273</sup> . ➤ ChREBP und SREBP-1c induzieren lipogene Enzyme: ➤ L-Typ Pyruvat Kinase (L-PK), ACC und FAS → glykolytischen Abbau von Glucose zu Pyruvat → Lipogenese <sup>274,275</sup>	PPAR $\gamma$ 2 wird vorwiegend im Fettgewebe exprimiert  PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 3 sind jedoch auch in Adipocyten zu finden <sup>236-238</sup>

Allgemeine physiologische Funktion	Gewebe und spezielle Funktion	Molekularer Wirkmechanismus	Beteiligung der Splicevarianten
Beeinflussung des Glucose-Stoffwechsels	<p>Fettgewebe</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Adipokin-Synthese und Sekretion</li> <li>➤ Verbesserung der Insulinsensitivität</li> </ul> <p>Pankreas, Skelettmuskel, Leber, Fettgewebe:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Expression von Glucose-transportern</li> </ul> <p>v. a. Leber:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hemmung der Gluconeogenese</li> <li>➤ Hemmung Glykogenolyse</li> <li>➤ Glykogen-Synthese</li> </ul>	<p>Adipokine beeinflussen den Glucose-Spiegel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Adiponektin vermindert die Gluconeogenese und erhöht die Glucose Aufnahme in die Zellen</li> <li>➤ ANGPTL4 hemmt Gluconeogenese</li> <li>➤ Verbesserung der Insulinsensitivität</li> </ul> <p>Expression von Glucosetransportern wird erhöht:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ GLUT-1<sup>276</sup></li> <li>➤ GLUT-2<sup>277</sup></li> <li>➤ GLUT-4<sup>278</sup></li> </ul> <p>Hemmung der Gluconeogenese:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ PEPCK<sup>279</sup></li> <li>➤ Glucose-6-Phosphatase (G6Pase)<sup>280</sup></li> </ul> <p>→ essentielle Enzyme für die Gluconeogenese werden inhibiert</p> <p>Hemmung Glykogenolyse:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ G6Pase Inhibition → führt auch zu vermindertem Glykogen Abbau</li> </ul> <p>Glykogen-Synthese:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ PPAR<math>\gamma</math> induziert <math>\beta</math>-Glucokinase (<math>\beta</math>GK) → 1.Schritt der Glykogen-Synthese<sup>277,281</sup></li> </ul>	<p>PPAR<math>\gamma</math>1 wird in der Leber weniger exprimiert als PPAR<math>\gamma</math>2</p> <p>im Skelettmuskel werden PPAR<math>\gamma</math>1 und PPAR<math>\gamma</math>2 etwa gleich stark exprimiert</p>
antiinflammatorische Wirkung	<p>Makrophagen</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Cytokin-Ausschüttung wird gehemmt</li> </ul> <p>verminderter oxidativer Stress</p>	<p>Cytokine werden inhibiert:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>) wird durch PPAR<math>\gamma</math> direkt und über Adiponektin gehemmt<sup>282</sup></li> <li>➤ auch Interleukin (IL)-1<math>\beta</math> und IL-6 werden durch PPAR<math>\gamma</math> supprimiert<sup>283</sup></li> </ul> <p>Verminderung des oxidativen Stresses:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hemmung der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen → Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase wird gehemmt → Sauerstoff wird nicht zu antibakteriell wirkenden Superoxidationen reduziert<sup>284,285</sup></li> </ul>	<p>PPAR<math>\gamma</math>3 ist vor allem in Makrophagen zu finden<sup>234</sup></p>

PPAR $\gamma$  ist der Hauptregulator der Adipocyten-Differenzierung in weißen und braunen Fettgewebe. Einerseits trägt der Transkriptionsfaktor so zu der Energiespeicherfunktion des weißen Fettgewebes bei<sup>241</sup>. Andererseits ist PPAR $\gamma$  in der Lage durch die Differenzierung der Adipocyten des braunen Fettgewebes die Thermogenese zu fördern<sup>248</sup>. Desweiteren hat PPAR $\gamma$  einen Einfluss auf die Umwandlung von weißen Adipocyten in sogenannte beige Adipocyten, die Eigenschaften von Zellen des braunen Fettgewebes aufweisen<sup>249,250</sup>. Bei der Differenzierung der Fettzellen ist PPAR $\gamma$  vor allem in der frühen Phase von essentieller Bedeutung, da über den nukleären Rezeptor die Transkriptionsfaktoren *CCAAT-enhancer-binding proteins* (C/EBP) $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  induziert werden<sup>237,242,243</sup>. Die C/EBPs steuern die Zelldifferenzierung von Fibroblasten/Präadipozyten zu Adipozyten und induzieren in Sinne einer positiven Rückkopplung die Expression von PPAR $\gamma$ <sup>244</sup>. Die Thermogenese im braunen Fettgewebe wird durch die Induktion der Adipocyten-Differenzierung, aber auch durch die Erhöhung der Genexpression von UCP-1 gefördert<sup>245</sup>.

PPAR $\gamma$  beeinflusst den Lipid-Stoffwechsel, indem Stoffwechselprozesse induziert werden, die zur Triglyceridbildung und damit zur Energiespeicherung führen. Dabei wird zuerst die Aufnahme von Fettsäuren in die Adipozyten und die Fettsäure-Synthese (Lipogenese) gefördert. Darauf folgt die Veresterung der Fettsäuren mit Glycerol, die PPAR $\gamma$  ebenfalls

unterstützt. Die entstandenen Triglyceride werden dann in den Lipidtropfen der Adipocyten gespeichert und können bei Bedarf durch Hydrolyse freigesetzt werden.

Die Förderung der Fettsäure-Aufnahme in die Adipocyten erfolgt durch die Expression der Fettsäure Translokase (FAT/CD36) und des Fettsäure Transport-Proteins (FATP)<sup>251,252</sup>. Auch die Lipoproteinlipase (LPL) wird induziert. Die Fettsäuren aus Lipoproteinen, vor allem Chylomikronen und *very low density* Lipoprotein (VLDL) werden so in die Adipocyten aufgenommen. Außerdem wird die Expression des Fettsäure Bindungs-Proteins 4 (FABP4), auch Adipocyten Protein 2 (aP2) genannt, induziert. FABP4 ist ebenfalls ein Transporter für Fettsäuren, der PPAR $\gamma$ -abhängig exprimiert wird<sup>232,237,253,254</sup>. Durch die PPAR $\gamma$  induzierte Expression des oxidierten LDL Rezeptor 1 (OLR1) kommt es zusätzlich zur Aufnahme von Fettsäuren in die Adipocyten, da neben der Aufnahme von oxLDL auch der Transport von Fettsäuren durch OLR1 stimuliert wird<sup>255</sup>.

Neben dem Fettsäure-Transport aus der Peripherie in die Adipocyten, können Fettsäuren auch durch *de novo* Synthese ausgehend von Acetyl-CoA in die Adipocyten gelangen. PPAR $\gamma$  induziert SREBP-1c<sup>256,257</sup> und SREBP-1c induziert weitere für die Fettsäure-Synthese essentielle Proteine, wie die FAS, ACC1 und Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 (SCD-1)<sup>258,259</sup>. Die PPAR $\gamma$ -Expression wird ebenfalls wiederum von SREBP-1c induziert<sup>260</sup>.

Nach der Aufnahme bzw. nach der Synthese der Fettsäuren, werden diese mit Glycerol zu Triglyceriden verestert. PPAR $\gamma$  spielt dabei ebenfalls eine Rolle. Der Transport von Glycerol in die Adipocyten wird von PPAR $\gamma$  durch die Induktion von Glycerol Transporter Aquaporin 7 (AQP7) gefördert<sup>261</sup>. Außerdem wird die Expression der Glycerol Kinase und der Monoacylglycerol O-Acyltransferase 1 (MOGAT1) durch PPAR $\gamma$  erhöht und somit die Triglycerid-Synthese verstärkt<sup>255</sup>.

Die Triglyceride werden anschließend in sogenannten Lipidtropfen in den Adipocyten gespeichert. Die mit Lipidtropfen assoziierten Proteine *fat-specific protein 27* (FSP27) und *adipose differentiation-related protein* (ADRP, Perilipin 2) werden ebenfalls von PPAR $\gamma$  induziert. FSP 27 und ADRP sind für die Formation und Lokalisation der Lipidtropfen verantwortlich<sup>262,263</sup>.

Neben der Lipogenese wird jedoch auch zu einem geringen Maße die Lipolyse durch PPAR $\gamma$  beeinflusst. PPAR $\gamma$  ist in der Lage die Katecholamin-Wirkungen, die über den  $\beta$ 2- und  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor vermittelt werden, zu verstärken. Durch den  $\beta$ 2- und  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptor wird in den Zellen des Fettgewebes die Adenylatcyclase stimuliert und ATP wird zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) umgewandelt. cAMP wiederum aktiviert die Protein Kinase (PK) A, die die Protein Kinase A *catalytic subunit* (PKAcat) freisetzt. Die PKAcat wiederum phosphoryliert verschiedene Proteine, wie z.B. die *hormone sensitive lipase*

(HSL) oder Perilipin A, das Protein, das die Oberfläche der Lipidtröpfchen in den Adipocyten umhüllt. Das phosphorylierte HSL transloziert in den Zellkern und hydrolysiert dort gemeinsam mit der Adipocyten Triglycerid Lipase (ATGL) Triglyceride. Phosphoryliertes Perilipin A setzt *comparative gene identification-58* (CGI-58) und FSP27 frei, die an ATGL binden und dessen Aktivität erhöhen<sup>286,287</sup>. PPAR $\gamma$  ist in der Lage in diesen Stoffwechselprozess einzugreifen, indem der Transkriptionsfaktor an die Promotor-Region des PKAc $\alpha$ -Gens bindet und dessen Expression erhöht<sup>262</sup>. Außerdem wird die Genexpression von *A kinase anchor protein 1* (AKAP1) stimuliert. Dieses Protein bindet an die PKA und ist für die Lokalisation der PKA verantwortlich. Zudem werden die Lipasen ATGL und HSL in ihrer Wirkung verstärkt<sup>262,263</sup>.

Insgesamt überwiegt der lipogene Effekt, jedoch könnte eine durch PPAR $\gamma$  induzierte Lipolyse auch für die Fett-Umverteilung von viszeralem Fettgewebe in die Peripherie<sup>53</sup>, die in einigen klinischen Studien beobachtet werden konnte, verantwortlich sein.

PPAR $\gamma$  ist zusätzlich in der Lage die Adipokin-Synthese zu modulieren und deren Sekretion zu beeinflussen<sup>241</sup>. Adipokine sind Cytokinen wie die Peptidhormone Adiponektin und *Angiopoietin-like protein 4* (ANGPTL4), die im Fettgewebe synthetisiert werden und dann in den Blutkreislauf abgegeben werden. PPAR $\gamma$  ist in der Lage Adiponektin zu induzieren. Adiponektin stimuliert die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, senkt die Gluconeogenese und erhöht die Glucose-Aufnahme in die Zellen. Somit verbessert Adiponektin auch die Insulinsensitivität. Zudem hat das Peptidhormon antiinflammatorische Eigenschaften durch die Reduktion der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Expression. Außerdem werden verschiedene UCPs durch Adiponektin vermehrt exprimiert und somit die Thermogenese induziert<sup>264–268</sup>.

Auch ANGPTL4 wird von PPAR $\gamma$  induziert. ANGPTL4 reguliert den Lipid-Stoffwechsel, indem es die LPL hemmt und die Lipolyse stimuliert. Zudem wird der Blutzuckerspiegel durch ANGPTL4 reguliert. Die Insulinsensitivität wird erhöht und die Gluconeogenese inhibiert. Dies führt zu einer Senkung der Glucosespiegel. Außerdem ist ANGPTL4 an vielen weiteren Prozessen beteiligt wie z.B. an der Angiogenese und der Wundheilung<sup>269,270</sup>.

Auch die Adipokine Leptin und Resistin werden von PPAR $\gamma$  moduliert. Während Leptin die Energiehomöostase durch die Aktivierung des Sympathikus reguliert, spielt Resistin eine Rolle bei der Entwicklung einer Insulinresistenz. Der genaue Einfluss von PPAR $\gamma$  ist noch nicht ausreichend geklärt. In Tierversuchen wird die Expression beider Adipokine inhibiert, jedoch lassen sich die Ergebnisse in humanen Zellen nur teilweise reproduzieren<sup>271,272</sup>.

Der Glucose-Stoffwechsel und der Lipid-Stoffwechsel sind eng miteinander verknüpft. Liegt ein Überschuss an Kohlenhydraten vor, wird eine *de novo* Lipogenese induziert<sup>288</sup>. Durch

erhöhte Blutzuckerspiegel, wird der Transkriptionsfaktor ChREBP vermehrt exprimiert<sup>289</sup>. Außerdem wird in Folge eines erhöhten Glucosespiegels vermehrt Insulin ausgeschüttet, das neben der Glucoseaufnahme auch die Transkription von SREBP-1c und LXR induziert. ChREBP, SREBP-1c und LXR wiederum sind die Hauptregulatoren von lipogenen Enzymen wie der L-Typ Pyruvat Kinase (L-PK), der ACC und der FAS. Eine erhöhte Expression dieser Enzyme führt zu einem glykolytischen Abbau von Glucose zu Pyruvat, das als Ausgangsstoff der Lipogenese dient. Auch die anschließende Fettsäure-Synthese wird durch diese Enzyme katalysiert<sup>274,275</sup>.

PPAR $\gamma$  spielt bei der Umwandlung von Kohlenhydraten zu Fettsäuren eine entscheidende Rolle. ChREBP beispielsweise induziert PPAR $\gamma$  und fördert so die Lipogenese<sup>273</sup>. SREBP-1c und PPAR $\gamma$  induzieren sich wahrscheinlich gegenseitig und sorgen damit für die Induktion der Glykolyse und Fettsäure-Synthese<sup>256,257,260</sup>. Außerdem induziert PPAR $\gamma$  die Expression von Glucosetransportern, wie GLUT-1<sup>276</sup>, GLUT-2<sup>277</sup> und GLUT-4<sup>278</sup>. Die für die Gluconeogenese essentiellen Enzyme PEPCK<sup>279</sup> und Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) werden hingegen von PPAR $\gamma$  inhibiert<sup>280</sup>. PEPCK katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gluconeogenese. G6Pase ist ein Enzym, das in der Leber exprimiert wird und Glucose-6-phosphat zu Orthophosphat und Glucose hydrolysiert. Durch diese Reaktion wird sowohl bei der Glykogenolyse als auch bei der Gluconeogenese freie Glucose generiert. Die Phosphorylierung der Glucose und damit der erste Schritt der Glykogen-Synthese wird durch die  $\beta$ -Glucokinase ( $\beta$ GK) katalysiert, die wiederum von PPAR $\gamma$  induziert wird<sup>277,281</sup>. Insgesamt sorgt eine PPAR $\gamma$  Aktivierung für reduzierte Blutzuckerspiegel, indem der Rezeptor die Glykogenolyse, sowie die Gluconeogenese hemmt und die Glykogen-Synthese und die Aufnahme von Glucose in die Zellen durch eine erhöhte Expression an Glucose-Transportern und eine verbesserte Insulinsensitivität induziert.

PPAR $\gamma$  besitzt auch antiinflammatorische Effekte. Die Expression von TNF- $\alpha$  wird gehemmt<sup>282</sup> und auch andere Cytokine wie Interleukin (IL)-1 $\beta$  und IL-6 werden durch PPAR $\gamma$  supprimiert<sup>283</sup>. Außerdem ist PPAR $\gamma$  in der Lage oxidativen Stress zu verhindern, indem die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Verbindungen vermindert wird. Wahrscheinlich wird hierbei die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase in ihrer Funktion Sauerstoff zu antibakteriell wirkenden Superoxidanionen zu reduzieren, gehemmt<sup>284,285</sup>.

PPAR $\gamma$  wird häufig mit verschiedenen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht, da der Transkriptionsfaktor in viele Zelldifferenzierungs-Prozesse und auch in die Angiogenese eingreift<sup>252</sup>. Der nukleäre Rezeptor wird sowohl als Tumorsuppressor als auch als Tumorpromoter aufgefasst<sup>254</sup>. Bei Kolon-, Brust- und Prostata-Tumoren zeigten PPAR $\gamma$  Agonisten antiproliferative Effekte<sup>290</sup>. In Kolon-Tumoren mit einer Mutation im Adenomatous-

polyposis-coli (APC)-Gen, einem Tumorsuppressorgen, wirkten PPAR $\gamma$  Agonisten allerdings proliferationsfördernd<sup>291,292</sup>. PPAR $\gamma$  induziert beispielsweise das Filamentprotein Cytokeratin 20 (CK20), dass vor allem im Darmepithel, im Urothel, dem Epithel der ableitenden Harnwege und in Merkel Zellen der Haut exprimiert wird<sup>293</sup>. CK20 dient der mechanischen Stabilität von Zellen. Er gilt häufig als Marker für die Differenzierung von Epithelzellen und auch als Tumormarker z.B bei Kolonkarzinomen.

#### 1.3.4 Ligandenbindung

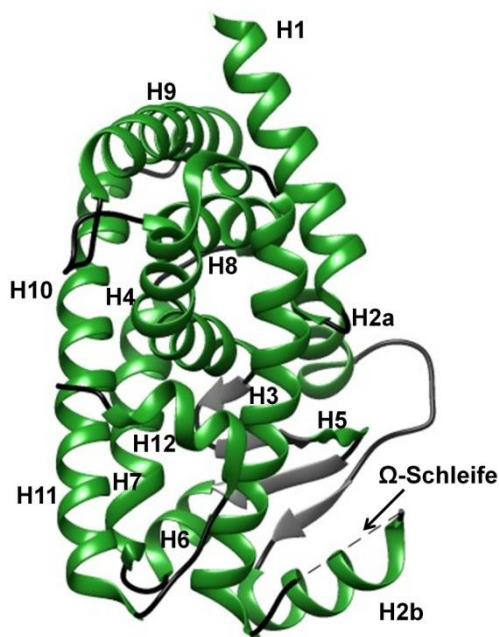


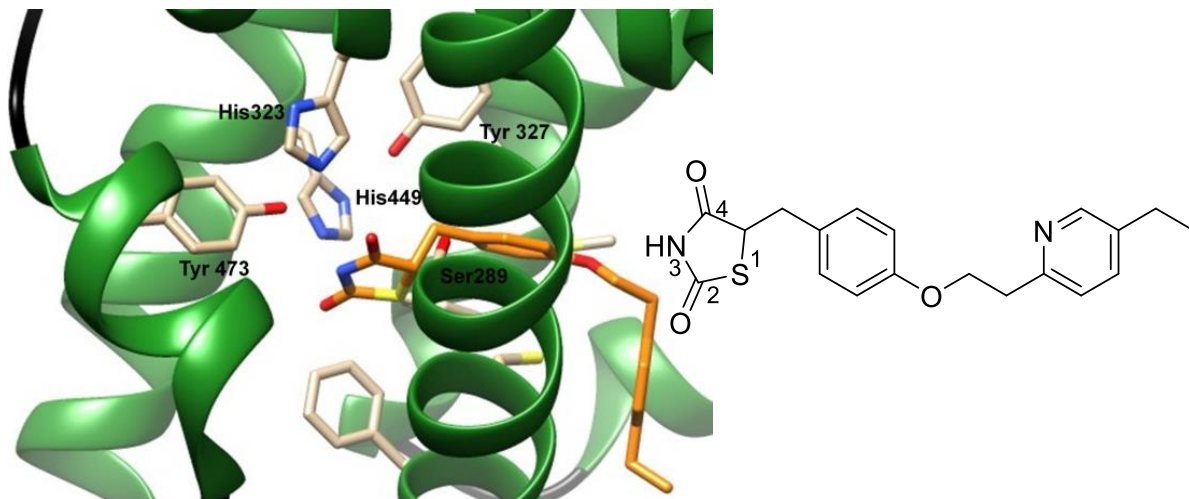
Abbildung 13: Struktur der PPAR $\gamma$  LBD (PDB-ID: 5Y2O)<sup>294</sup>.

Die PPAR Subtypen weisen in ihrer LBD eine hohe Sequenz-Homologie auf<sup>295</sup>. Die LBDs der PPARs besteht aus insgesamt 13 Helices<sup>296</sup>, die eine Y-förmige Ligandbindungsstelle ausbilden<sup>297</sup>. Ein Arm wird durch die AF-2 (Helix 12) definiert und besitzt einige hydrophile Aminosäuren. Dieser Teil ist bei den verschiedenen PPAR Subtypen relativ ähnlich aufgebaut. Die anderen beiden Arme sind weitgehend hydrophob und variieren zwischen den PPAR-Subtypen deutlich stärker und sind daher verantwortlich für die Subtypen-Selektivität der verschiedenen PPAR Liganden<sup>295,296</sup>. Insgesamt sind 34 Aminosäuren an der Ausbildung der LBD-Oberfläche beteiligt. 80% dieser Aminosäuren sind bei allen drei PPAR Subtypen identisch<sup>217,298</sup>.

Die 13 Helices der PPAR $\gamma$  LBD sind analog zu den anderen nukleären Rezeptoren *sandwichartig* in 3 Schichten gefaltet (Abbildung 13). Zwischen Helix 2b und Helix 3 befindet sich eine charakteristische sehr flexible  $\Omega$ -Schleife.

Die Y-förmige Ligandenbindungstasche ist verhältnismäßig groß und fasst ein Volumen von etwa 1300 Å<sup>3</sup>. Dies ist wahrscheinlich auch auf die zusätzliche Helix 2b zurückzuführen, die auch häufig als Helix 2' bezeichnet wird. Zum Vergleich besitzen andere nukleäre Rezeptoren meist eine Ligandenbindungstasche mit einem Volumen von 600 bis 1100 Å<sup>3</sup><sup>294</sup>.

Das Zentrum der LBD besteht aus vielen unpolaren Aminosäuren (Leu330, Val339, Leu353 und Met364). Polare Wechselwirkungen treten nur in Helix 3, Helix 5, Helix 10 und in der Helix 12 mit den Aminosäuren Cys285, Ser289 (Helix 3), His323 (Helix 5), Tyr327, His449 (Helix 10/11) und Tyr473 (Helix 12) auf. Die Ω-Schleife besteht ebenfalls hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren (Ile249, Met348, Ile341 (β-Schleife), sowie Leu255, Gly258, Ile262 (Helix 2b) und Ile281 (Helix 3)). Der kleine, polare Teil der Ω-Schleife wird durch die Aminosäuren Glu259, Arg280 und Ser342 gebildet.



**Abbildung 14: Pioglitazon (7, IUPAC Name: 5-([4-{2-(5-Ethylpyridin-2-yl)ethoxy}phenyl)methyl]-1,3-thiazolidine-2,4-dion) Interaktion mit der Ligandenbindungstasche (PDB-ID: 5Y2O)<sup>299</sup>.**

Die Bindungstasche von PPAR $\gamma$  wurde vor allem durch Röntgenkristallstruktur-Analysen von Glitazonen, synthetischen PPAR $\gamma$  Liganden, analysiert<sup>30,300</sup>. Glitazone zeigen alle eine sehr ähnliche Interaktion mit der Ligandenbindungstasche, weshalb man von einem konservierten Bindungsmodus ausgeht (Abbildung 14). Die Glitazone werden auch als Thiazolidindione bezeichnet, da das Grundgerüst aus einem Thiazolidin-2,4-dion besteht. Die PPAR $\gamma$  LBD bildet mit diesem Strukturelement Wasserstoffbrücken aus. Diese Interaktion ist essentiell für die Konformationsänderung der Helix 12 und damit für die Aktivierung des Rezeptors<sup>299</sup>.

Besonders die Interaktion des Stickstoffatoms der Thiazolidinstruktur mit der Hydroxyl-Gruppe des Tyr473 in Helix 12 ist von großer Bedeutung. Schwächere Partialagonisten und Antagonisten gehen keine Interaktion mit Tyr473 ein<sup>301</sup>. Röntgenkristall-Untersuchungen ergaben, dass Partialagonisten zwar in der Lage sind die  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 4 und die Helix 3 Region

zu stabilisieren, die AF-2 Funktion in Helix 12 aber durch die fehlende Interaktion mit Tyr473 relativ dynamisch bleibt<sup>302</sup>.

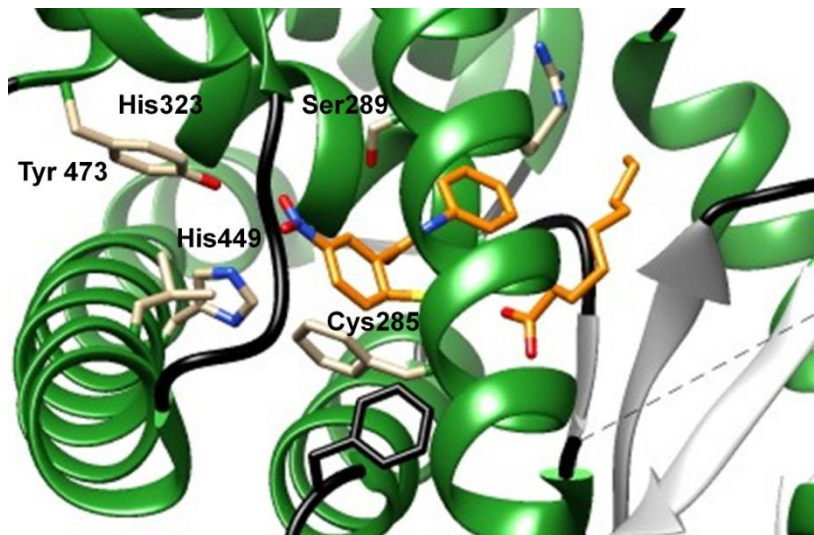
Die zwei Carbonyl-Funktionen der Thiazolidindionstruktur formen Wasserstoffbrücken mit His323, Ser289 und His449. His323 und Tyr473, sowie His449 und Lys367 bilden in Folge der Ligandenbindung eine sekundäre Wasserstoffbrückenbindung untereinander aus<sup>30</sup>.

Die Glitazone nehmen eine U-förmige Konfiguration um Cys285 (Helix 3) ein. Das Schwefelatom des Thiazolidinrings interagiert mit den hydrophoben Aminosäuren Phe363, Gln286 (Helix 3), Phe282, sowie Leu469 und geht keine polaren Wechselwirkungen ein. Der zentrale Benzenring interagiert mit den Aminosäuren Cys285 und Met364. Das Sauerstoff-Atom der Ethoxy-Gruppe, der Phenyl-Ring und Pyridin-Ring (bei Pioglitazon, **7**) verbindet, dient vorrangig dazu die Konformation des Pyridinrings zu koordinieren und geht keine polaren Wechselwirkungen ein. Der Pyridinring kann sich so in die Helix 3 einfügen.

Die Glitazone verdrängen bei der Bindung mehrere Wassermoleküle aus der LBD, nehmen aber nur etwa 40% der Bindungstasche ein<sup>30</sup>. Die verbleibenden Wassermoleküle gehen keine Wechselwirkung mit dem Liganden ein und sind in Regionen der LBD zu finden, die nicht vom Liganden ausgefüllt werden, wie z.B. in der Tasche, die aus Helix 1 geformt wird<sup>303</sup>.

Die Thiazolidin-Struktur der Glitazone ist ein bioisosterer Ersatz zur  $\alpha$ -substituierten Carboxyl-Gruppe, die in endogenen Liganden enthalten ist. Die Carboxyl-Gruppe bildet ebenfalls Wasserstoffbrücken mit His323 und His449 aus. Diese Interaktion ermöglicht, dass auch potenzielle endogene Liganden wie Fettsäuren, oxidierte Lipoproteine und Eikosanoide in mikromolaren Konzentrationen den Rezeptor aktivieren<sup>304</sup>. Die hydrophoben Wechselwirkungen tragen weniger zu Ligandenbindung bei und sind eher unspezifisch. Dies ermöglicht, dass PPAR $\gamma$  strukturell relativ unterschiedliche Liganden binden kann<sup>30</sup>.





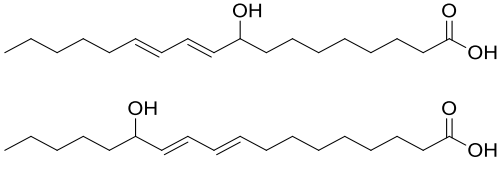
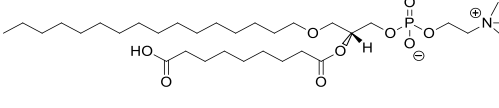
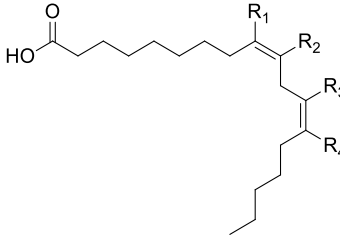
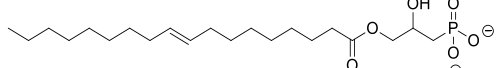
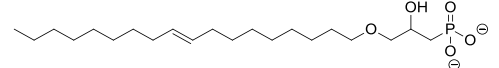
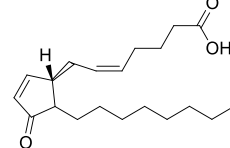
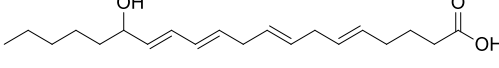
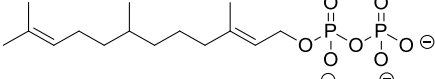
**Abbildung 15: Alternative Bindungsseite von PPAR $\gamma$ . Bindung von GW9662 (**24**) und Pelargonsäure (Nonansäure, **25**) (PDB-ID: 6AVI)<sup>305,306</sup>.**

Eine Besonderheit von PPAR $\gamma$  ist, dass Liganden auch eine alternative Position in der LBD einnehmen können<sup>305</sup>. In Abbildung 15 ist dies beispielhaft mit dem Antagonisten GW9662 (**24**), der kovalent an Cys285 gebunden vorliegt, dargestellt. GW9662 (**24**) ist in der Lage Fettsäuren, wie in diesem Fall die Pelargonsäure (Nonansäure, **25**) in die alternative Bindungstasche zu verdrängen. Durch diese alternative Bindung ergibt sich ein zusätzlicher Effekt auf die Transaktivierung<sup>306</sup>. Wird die alternative Bindungstasche von einem Liganden gebunden kommt es zu einer Konformationsänderung und die Phosphorylierung an Ser245 (PPAR $\gamma$ 2: Ser273) in der  $\beta$ -Schleife der Helix 2, die durch die *cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5) induziert wird, wird verhindert<sup>307,309</sup>.

Die Phosphorylierung führt zu einer bevorzugten Expression bestimmter Zielgene. Diese selektive Genmodulation betrifft beispielsweise Adiponektin<sup>307</sup>. Während Mutations-Studien, bei der Ser245 (PPAR $\gamma$ 2: Ser273) mit Ala ausgetauscht wurde, kam es zu einer erhöhten Expression von Adiponektin. Daher geht man davon aus, dass eine Phosphorylierung von Ser245 (PPAR $\gamma$ 2: Ser273) zu einer Verschiebung des Expressionsmusters von PPAR $\gamma$ -Zielgenen führt. Zielgene wie Adiponektin, die zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität beitragen, werden vermindert exprimiert, während andere Gene, die für die Lipogenese und Triglycerid-Synthese verantwortlich sind, vermehrt exprimiert werden<sup>308</sup>. Eine Inhibition der Phosphorylierung begünstigt die positiven Effekte von PPAR $\gamma$  auf die Insulinsensitivität. Außerdem wird die PPAR $\gamma$  vermittelte Gewichtszunahme, die mit einer Phosphorylierung von Ser245 (PPAR $\gamma$ 2: Ser273) assoziiert wird, vermindert. Neuere synthetische Liganden sollen daher auch die alternative Bindungsstelle ausfüllen<sup>309,310</sup>. Diese Liganden gehören auf Grund ihrer selektiven Genmodulation zu den sog. selektiven PPAR $\gamma$  Modulatoren (SPPARMs)<sup>306,310</sup>.

### 1.3.5 Endogene Liganden von PPAR $\gamma$ und deren pharmakologische Bedeutung

Tabelle 8: endogene Liganden von PPAR $\gamma$ .

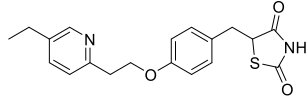
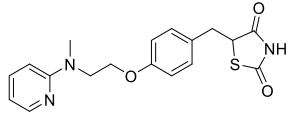
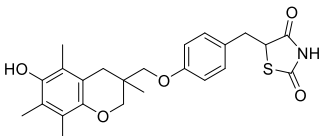
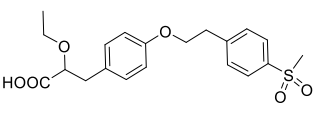
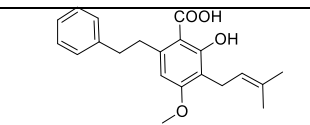
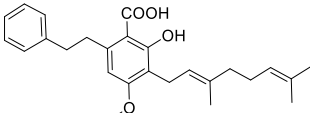
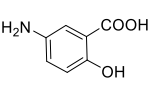
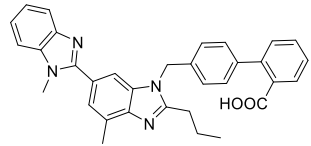
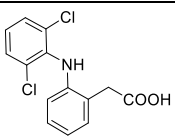
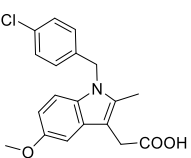
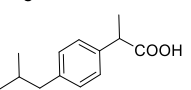
	Endogener Ligand	Bindungs-Affinität PPAR $\gamma$	Testsystem
<p><b>9-Hydroxyoctadecadien-säure (9-HODE, 26) und 13-Hydroxyoctadecadien-säure (13-HODE, 27)</b></p>		<p><math>K_D = 10 - 20 \mu M</math></p> <p><math>K_D = 10 - 20 \mu M</math></p>	<p>Radioligand-Bindungsassay (SF9)<sup>311</sup></p>
<p><b>Hexadecyl-azelaoyl-phosphatidylcholin (azPC, 28)</b></p>		<p><math>K_D = 40 \text{ nM}</math></p>	<p>Radioligand-Bindungsassay (CV-1)<sup>48</sup></p>
<p><b>Nitro-Linolsäure:</b>  <b>9/10- Nitro-Linolsäure (29)</b>            (R<sub>1</sub> or R<sub>2</sub> = NO<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> = H)  <b>12- Nitro-Linolsäure (30)</b>            (R<sub>3</sub> = NO<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>4</sub> = H)  <b>13- Nitro-Linolsäure (31)</b>            (R<sub>4</sub> = NO<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> = H)</p>		<p><math>K_i = 133 \text{ nM}</math></p> <p><b>29:</b>  <math>0,41 \pm 0,07 \mu M</math>            (36 <math>\pm</math> 3%, Referenz: Rosiglitazon, <b>23</b>)  <b>30:</b>  <math>0,045 \pm 0,012 \mu M</math>            (76 <math>\pm</math> 9%, Referenz: Rosiglitazon, <b>23</b>)  <b>31:</b>  <math>0,62 \mu M</math>            (41 <math>\pm</math> 5%, Referenz: Rosiglitazon, <b>23</b>)</p>	<p>Luciferase-Reportergen Assay (Verdrängung von Rosiglitazon (<b>23</b>) <math>\rightarrow</math> kompetitiver Radioligand-Bindungsassay)<sup>312</sup></p> <p>Luciferase-Reportergen Assay (Referenz: Rosiglitazon (<b>23</b>), MCF7/RTP/PPARG 1-4')<sup>313</sup></p>
<p><b>Lysophosphatidsäure (LPA, 32)</b></p>		<p>hoher micromolarer Bereich</p>	<p>Luciferase-Reportergen Assay (RAW 264.7)<sup>314</sup></p>
<p><b>1-O-octadecenyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphat (AGP, 33)</b></p>		<p><math>K_D = 60 \text{ nM}</math></p>	<p>Radioligand-Bindungsassay<sup>315</sup></p>
<p><b>5-Deoxy-<math>\Delta^{12,14}</math>-prostaglandin J<sub>2</sub> (34)</b></p>		<p><math>EC_{50} = 7,0 \pm 0,43 \mu M</math></p> <p><math>EC_{50} = 0,15 \mu M</math></p>	<p>Lipogenese-Assay (C3H10T1/2)<sup>316,317</sup></p> <p>Luciferase-Reportergen Assay (Cos7)<sup>316,317</sup></p>
<p><b>15-Hydroxyeicosatetraen-säure (15-HETE, 35)</b></p>		<p><math>EC_{50} \sim 5 \mu M</math></p>	<p>Luciferase-Reportergen Assay (NIH3T3)<sup>318</sup></p>
<p><b>Farnesyl-pyrophosphat (36)</b></p>		<p><math>EC_{50} \sim 0,1 - 1 \mu M</math></p>	<p>Luciferase-Reportergen Assay (Gal4 und PPAR<math>\gamma</math>-Vollänge, CV1)<sup>319</sup></p>

In der Regel ist die Kenntnis des endogenen Liganden eines Rezeptors wichtig für das Verständnis der physiologischen Bedeutung des Rezeptors und für vor allem auch für die Arzneistoffentwicklung. Meist werden Analoga der endogenen Substanzen synthetisiert, die eine höhere Bindungs-Affinität oder ein besseres Nebenwirkungsprofil aufweisen. Im Fall von PPAR $\gamma$  trifft dies aber nicht zu, denn bislang wurde kein endogener Ligand identifiziert, der zweifelsfrei in ausreichender Konzentration im menschlichen Körper vorliegt, die nötig ist um PPAR $\gamma$  zu modulieren<sup>320</sup>. Mögliche endogene Liganden sind in Tabelle 8 aufgelistet. Meist handelt es sich um mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie die Linolsäure- oder auch Arachidonsäure-Derivate<sup>321</sup>. Oxidierte Linolsäure-Derivate, wie 9-Hydroxyoctadecadiensäure (9-HODE, **26**) und 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE, **27**)<sup>311</sup>, die durch die 15-Lipoxygenase oxidiert werden<sup>311</sup>, oder auch Hexadecyl-azelaoyl-phosphatidylcholin (azPC, **28**)<sup>48</sup> aktivieren beispielsweise PPAR $\gamma$ . Auch konjugierte Linolsäuren können an PPAR $\gamma$  binden, jedoch sind besonders die Nitro-Linolsäuren sehr potent<sup>312,313</sup>. Phospholipide, unter anderem der Plättchenaktivierende Faktor (PAF), die Lysophosphatidsäure (LPA, **32**)<sup>314</sup> und das Derivat der LPA (**32**), 1-O-octadecenyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphat (AGP, **33**)<sup>315</sup>, sind ebenfalls PPAR $\gamma$  Agonisten. Der erste potenzielle endogene PPAR $\gamma$  Ligand, der entdeckt wurde, war das Eikosanoid-Derivat 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (**34**)<sup>316,317,322</sup>. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (**34**) bindet kovalent an Cys285 der PPAR $\gamma$  LBD und sorgt für eine Konformationsänderung der Helix 2b<sup>323</sup>. Auch andere Eikosanoide, wie die 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE, **35**) werden als potenzielle PPAR $\gamma$  Aktivatoren postuliert. Ein Vertreter einer weiteren Substanzklasse, die als PPAR $\gamma$  Agonisten gelten, ist das Farnesylpyrophosphat (**36**), welches ein Zwischenprodukt der Cholesterol-Biosynthese darstellt<sup>319</sup>.

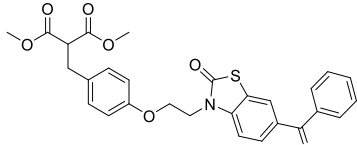
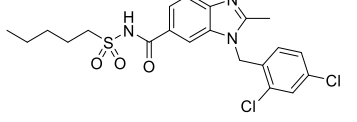
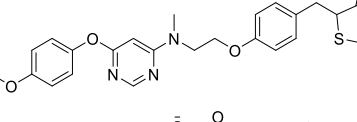
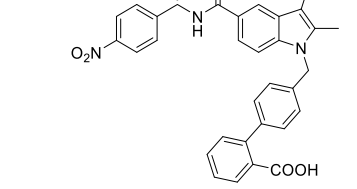
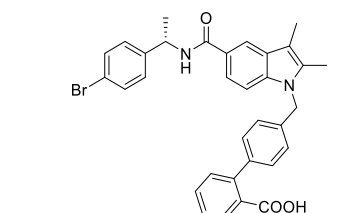
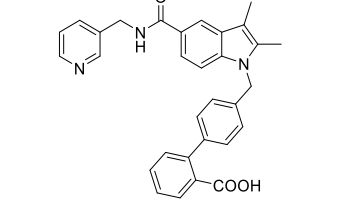
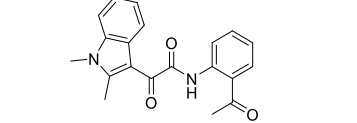
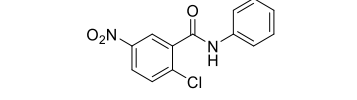
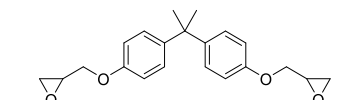
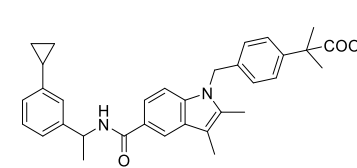
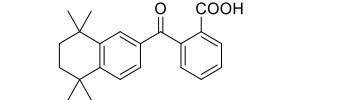
Die meisten dieser postulierten PPAR $\gamma$  Liganden haben eine relativ niedrige Bindungs-Affinität zum Rezeptor und liegen endogen nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Die entsprechenden PPAR $\gamma$  aktivierenden Fettsäuren, Eikosanoide und Phospholipide kommen nur in Konzentrationen unter 100 nM vor und unterschreiten damit die *in vitro* bestimmten Konzentrationen, die nötig sind um den Rezeptor zu aktivieren<sup>324,325</sup>. azPC (**28**) hingegen bindet den Rezeptor zwar schon im nanomolaren Bereich, jedoch sind die oxidativen Bedingungen, die für die *in vitro* Bestimmung der Bindungs-Affinität gewählt wurden (Oxidation mit CuSO<sub>4</sub>), nicht mit physiologischen Bedingungen vergleichbar<sup>48</sup>. Damit ist die physiologische Bedeutung von azPC (**28**) sehr fraglich. Auf Grund der strukturell sehr unterschiedlichen Liganden, die PPAR $\gamma$  binden kann, ist die Zahl der Derivate, die in *in vitro* Testsystemen PPAR $\gamma$  modulieren relativ groß. Tatsächliche endogene PPAR $\gamma$  Liganden bleiben jedoch umstritten.

### 1.3.6 Synthetische Liganden von PPAR $\gamma$ und deren pharmakologische Bedeutung

Tabelle 9: synthetische Liganden von PPAR $\gamma$ .

Substanzklasse	Naturstoff/synthetischer Ligand	Bindungs-Affinität	Zielstruktur	Indikation/Status der klinischen Studie
PPAR $\gamma$ Voll-agonisten	Pioglitazon (7) 	EC <sub>50</sub> = 0,16 $\mu$ M <sup>326</sup>	PPAR $\gamma$ Agonist	im Handel <sup>327</sup>
	Rosiglitazon (23) 	EC <sub>50</sub> = 0,034 $\mu$ M <sup>326</sup>	PPAR $\gamma$ Agonist	EU außer Handel, USA: unter Auflagen im Handel <sup>327</sup>
	Troglitazon (37) 	EC <sub>50</sub> = 0,55 $\mu$ M <sup>328</sup>	PPAR $\gamma$ Agonist	außer Handel <sup>327</sup>
	Glitazare: z.B. Tesaglitazar (38) 	EC <sub>50</sub> = 0,2 $\mu$ M <sup>329</sup>	duale PPAR $\alpha/\gamma$ Agonisten	→ zugelassen ist nur Saroglitazar (in Indien)
Naturstoff	Amorfrutin A (39) 	39: EC <sub>50</sub> = 0,458 $\mu$ M <sup>330</sup>	SPPARM <sub>331,332</sub>	noch keine klinischen Studien
	Amorfrutin B (40) 	40: EC <sub>50</sub> = 0,05 $\mu$ M <sup>330</sup>		
zugelassene Arzneistoffe, die zudem PPAR $\gamma$ modulieren	5-Aminsalicylsäurederivate: Prodrugs von Mesalazin (41) (Sulfasalazin, Balsalazid und Olsalazin) 	niedriger bis mittlerer millimolarer Bereich <sup>324</sup>	u.a. Inhibitor von NF- $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ Agonist	zugelassen bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen
	Telmisartan (42) 	42: EC <sub>50</sub> = 2,53 $\pm$ 0,40 $\mu$ M <sup>333</sup>	Angiotensin II-Rezeptor Antagonist SPPARM <sub>334</sub>	zugelassen bei essentieller Hypertonie
	NSARs: Diclofenac (43) 	43: EC <sub>50</sub> = 1,69 $\mu$ M <sup>335</sup> 44: EC <sub>50</sub> = 21,0 $\mu$ M <sup>335</sup> 45: EC <sub>50</sub> = 56,8 $\mu$ M <sup>335</sup>	Cyclooxygenase (COX)-Hemmer und PPAR $\gamma$ Agonisten	akute und chronische Schmerzen, entzündliche und degenerative Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis)
	Indometacin (44) 			
Ibuprofen (45) 				

Substanzklasse	Naturstoff/synthetischer Ligand		Bindungs-Affinität	Zielstruktur	Indikation/Status der klinischen Studie		
zugelassene Arzneistoffe, die zudem PPAR $\gamma$ modulieren	Fibrate: Clofibrat (22)		22: EC <sub>50</sub> > 500 $\mu$ M <sup>328</sup>	nicht selektive PPAR $\alpha$ Agonisten	Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie		
	Bezafibrat (6)		6: EC <sub>50</sub> = 60 $\mu$ M <sup>328</sup>				
	Fenofibrat (10)		10: EC <sub>50</sub> = 300 $\mu$ M <sup>328</sup>				
	Lesinurad (46)		46: EC <sub>50</sub> = 18,5 $\pm$ 0,7 $\mu$ M <sup>336</sup>	Inhibitor Urat-Transporter (URAT1 & OAT4) SPPARM	zugelassen bei Gicht		
SPPARM: PPAR $\gamma$ Partialagonisten	PAM-1616 (47)		47: EC <sub>50</sub> = 83,6 $\pm$ 43,7 nM (24,9 $\pm$ 7,1% Referenz: Rosiglitazon, 23) <sup>337</sup> 48: EC <sub>50</sub> = 15 nM (30% Referenz: Rosiglitazon, 23) <sup>338</sup> 49: EC <sub>50</sub> = 0,7 nM <sup>339</sup> 50: EC <sub>50</sub> = 4 nM <sup>327</sup> 51: EC <sub>50</sub> = 5,06 $\mu$ M (60% Referenz: Pioglitazon, 7) <sup>340</sup> 52: EC <sub>50</sub> = 2 nM (25-39% Referenz: Rosiglitazon, 23) <sup>340</sup> 53: EC <sub>50</sub> = 12 $\mu$ M <sup>340</sup>	PPAR $\gamma$ Partialagonisten PAM-1616 (47), L312 (51) und MBX-102 (53) wirken auch als Genmodulatoren	INT131 (50): Phase 2 Indikation: Multiple Sklerose $\rightarrow$ abgeschlossen Phase 2 Indikation: Diabetes Mellitus Typ 2 $\rightarrow$ abgeschlossen		
	KR 62980 (48)						
	SPPAR $\gamma$ M5 (49)						MK-0533 (52): Phase 2 Indikation: Diabetes Mellitus Typ 2 $\rightarrow$ abgebrochen auf Grund mangelnder Wirksamkeit
	INT131 (50)						
	L312 (51)						MBX-102 (53) Phase 2/3 Indikation: Diabetes Mellitus Typ 2 $\rightarrow$ abgeschlossen Phase 2 Indikation: Gicht $\rightarrow$ abgeschlossen
	MK-0533 (52)						
	MBX-102 (Arhalofenat) (53)						

Substanzklasse	Naturstoff/synthetischer Ligand	Bindungs-Affinität	Zielstruktur	Indikation/Status der klinischen Studie
SPPARM: selektive PPAR $\gamma$ Genmodulatoren	S26948 (54) 	<b>54:</b> $EC_{50} = 8,83 \pm 0,5 \text{ nM}^{341}$ <b>55:</b> $EC_{50} = 3,6 \text{ nM}^{342}$ <b>56:</b> $EC_{50} = 0,018 \mu\text{M}^{343}$ <b>57, 58, 59:</b> → keine PPAR $\gamma$ Aktivierung, hemmen ausschließlich Serin Phosphorylierung <b>60:</b> $EC_{50} = 3,24 \mu\text{M}^{344}$ <b>51:</b> $EC_{50} = 5,06 \mu\text{M}^{340}$	selektive PPAR $\gamma$ Genmodulatoren	FK614 (55): Phase 2 Indikation: Diabetes Mellitus Typ 2 → abgeschlossen  Lobeglitazone (56) wurde 2013 von der koreanischen FDA zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen <sup>340</sup>
	FK614 (55) 			
	Lobeglitzon (56) 			
	SR1664 (57) 			
	SR1824 (58) 			
	UHC1 (59) 			
F12016 (60) 				
PPAR $\gamma$ Antagonisten	GW9662 (24) 	<b>24:</b> $IC_{50} = 5,4 \pm 0,6 \text{ nM}^{345}$ <b>61:</b> $K_D \approx 100 \mu\text{M}^{346}$ <b>62:</b> $IC_{50} = 108 \text{ nM}^{347}$ <b>63:</b> $K_i = 435 \text{ nM}^{348}$	PPAR $\gamma$ Antagonisten	noch keine pharmazeutische Bedeutung, aber nötig für „Kontrollversuche“ → „tool compound“
	BADGE (61) 			
	SR11023 (62) 			
	LG100641 (63) 			

Glitazone waren die ersten synthetischen Liganden von PPAR $\gamma$ . Obwohl sie schon länger als orale Antidiabetika verwendet wurden<sup>208,209</sup>, konnte erst Mitte der 1990er PPAR $\gamma$  als molekulare Zielstruktur der Glitazone ermittelt werden<sup>210,211</sup>. Eine Applikation von Glitazonen führt zu einer Senkung des Blutglucosespiegels und des HbA1c Wertes. Daher wurden Sie bei Insulin-Resistenz und Diabetes mellitus Typ 2 in Kombination mit Metformin eingesetzt<sup>349</sup>. Troglitazon (**37**), Rosiglitazon (**23**) und Pioglitazon (**7**) wurden Ende der 1990er von der *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. In Deutschland wurden im Jahr 2000 nur Rosiglitazon (**23**) und Pioglitazon (**7**) zugelassen. Das Antidiabetikum Troglitazon (**37**) ist in Deutschland aufgrund von hepatotoxischen Nebenwirkungen nie auf den Markt gekommen. In den frühen 2000er Jahren stieg die Verschreibungsrates der Glitazone enorm an, bis einige schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten. Neben den bekannten Nebenwirkungen, wie der Gewichtszunahme und Flüssigkeitsretention, stehen Glitazone im Verdacht kardiovaskulären Nebenwirkungen<sup>350</sup> zu besitzen. In mehreren Fällen entwickelten Patienten eine Herzinsuffizienz. Außerdem traten vermehrt Herzinfarkte bei der Einnahme von Glitazonen auf<sup>351</sup>. Neben diesen kardiovaskulären Nebenwirkungen, kam es während der Langzeitbehandlung mit Glitazonen zudem zu Knochenschädigungen, die zu Knochenfrakturen führen können<sup>352</sup>. Außerdem stehen die Glitazone unter Verdacht hepatotoxisch und karzinogen zu wirken. Pioglitazon (**7**) soll beispielsweise Blasenkrebs verursachen<sup>353</sup>. In Anbetracht dieses Nutzen-Risiko-Profiles wurde der Vertrieb von Glitazonen nahezu eingestellt.

In der Leitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft tauchen Thiazolidindione immer noch auf, allerdings ist die Gültigkeit der Leitlinie im August 2018 abgelaufen und sie wird derzeit überarbeitet. Der Vertrieb von Rosiglitazon (**23**) wurde im November 2010 eingestellt. Pioglitazon (**7**) ist in Deutschland noch im Handel, darf aber nach einem Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses seit April 2011 nur noch in begründeten Ausnahmefällen zu Lasten der gesetzlichen Krankenversicherung (GKV) verordnet werden<sup>354,355</sup>. In den USA sind Glitazone, nachdem die Zulassung auf Grund der kardiovaskulären Nebenwirkungen vorläufig ausgesetzt wurde<sup>350</sup>, wieder unter Auflagen verschreibungsfähig<sup>356,357</sup>. Es zeigte sich in einigen Studien, dass das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nicht höher ist im Vergleich zur Standardtherapie mit Metformin<sup>358-361</sup>. Auch die kanzerogene Wirkung von Pioglitazon (**7**) konnte in einer Studie widerlegt werden<sup>362</sup>.

Außer der Verbesserung der Insulinsensitivität, erhöhen Glitazone auch die Expression von Adiponektin<sup>265,363,364</sup>. Adiponektin hat ebenfalls einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität, vermindert aber auch die Akkumulation von Fett in der Leber (Steatose)<sup>365</sup>. Steatose ist das Hauptsymptom der NAFLD. Die NAFLD wird häufig auch als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms angesehen<sup>366</sup> und vermutlich trägt eine

Insulinresistenz zur Entwicklung der Erkrankung bei<sup>367</sup>. Glitazone werden daher häufig „*off-label*“ bei dieser Erkrankung verschrieben. Außerdem gibt es zahlreiche klinische Studien, die die Wirksamkeit von Glitazonen zur Behandlung der NAFLD untersucht haben. Obwohl Glitazone eine gute Wirksamkeit hinsichtlich der Therapie der Steatose aufweisen, konnten die primären Endpunkte der Studien nicht erreicht werden. Die Gewichtszunahme, die bei der Einnahme der Glitazone auftritt, verminderte die Compliance der Studienteilnehmer. Außerdem spielt Adipositas im Rahmen der mit dem metabolischen Syndrom assoziierten Erkrankungen eine Hauptrolle und sollte vermieden werden. Problematisch ist zudem, dass Glitazone keine antifibrotischen Effekte aufweisen, die für die Regeneration der Leber essentiell sind. Daher konnten die Glitazone trotz der teilweise vielversprechenden Studienergebnisse nicht für die Behandlung der NAFLD etabliert werden<sup>53</sup>.

Auch die dualen PPAR $\alpha$ / $\gamma$  Agonisten, die als Glitazare bezeichnet werden, konnten sich bisher nicht durchsetzen. Sie sollten durch ihren dualen Wirkmechanismus sowohl lipidsenkend als auch antidiabetisch wirken. Jedoch wurden fast alle Glitazare auf Grund mangelnder Wirksamkeit und unerwünschter Nebenwirkungen in der Entwicklung abgebrochen<sup>368,369</sup>. Nur Saroglitazar ist in Indien für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 und Dyslipidämie zugelassen. Da Saroglitazar vor allem PPAR $\alpha$  aktiviert, zeigte sich in den klinischen Studien keine Gewichtszunahme bei den Probanden. Allerdings gibt es bisher keine Langzeitstudien. Die *European Medicines Agency* (EMA) und U.S. FDA haben Saroglitazar noch nicht zugelassen. Derzeit laufen jedoch einige Studien, vor allem um die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Saroglitazar zur Behandlung der NAFLD und der NASH zu evaluieren<sup>308,327</sup>.

Zum Teil besitzen einige zugelassene Arzneimittel neben ihrer Hauptwirkung eine Affinität zu PPAR $\gamma$ . Die 5-Aminosalicylsäure Derivate Sulfasalazin, Balsalazid und Olsalazin können PPAR $\gamma$  aktivieren und ihre antiinflammatorischen Effekte werden zum Teil auf diese Interaktion zurückgeführt. Die Wirkstoffe sind Prodrugs, die *in vivo* zu Mesalazin (**41**) umgesetzt werden und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angewendet werden<sup>370,371</sup>.

Der Naturstoff Amorfrutin, der strukturell mit der Salicylsäure verwandt ist und aus der Süßholzwurzel stammt, zeigt ebenfalls antiinflammatorische Effekte in Kolonzellen, die auf die Aktivierung von PPAR $\gamma$  zurückzuführen sind<sup>372</sup>.

Auch einige nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs, bzw. NSAIDs), wie Diclofenac (**43**), Indometacin (**44**), Ibuprofen (**45**) und auch Fenoprofen, sowie Flufenamsäure aktivieren zusätzlich PPAR $\gamma$  und können so auch unabhängig von der Cyclooxygenase (COX) antiinflammatorisch wirken<sup>335,373</sup>.



Die Fibrate, die hauptsächlich PPAR $\alpha$  aktivieren und bei Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie zugelassen sind, sind meist nicht sehr selektiv und binden ebenfalls PPAR $\gamma$ <sup>328</sup>.

Lesinurad (**46**) stellt eine neue Therapieoption für Gicht dar. Als Inhibitor des Urat Transporter 1 (URAT1) und des organischer Anionen Transporter (OAT) 4 wird Lesinurad (**46**) in Kombination mit Allopurinol zur Behandlung der Gicht eingesetzt. Heitel et al. entdeckten zudem 2018, dass Lesinurad (**46**) auch selektiv PPAR $\gamma$  Zielgene moduliert. Dabei werden Zielgene, die zur Verbesserung der Insulinsensitivität führen, vermehrt exprimiert, während lipogene Zielgene nicht beeinflusst werden. Zudem übt Lesinurad (**46**), vermittelt durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$ , antiinflammatorische Effekte aus. Diese könnten bei der Behandlung der Gicht zusätzlich zu der Wirksamkeit von Lesinurad (**46**) beitragen<sup>336</sup>.

Nach den bereits beschriebenen Rückschlägen bei der therapeutischen Anwendung von Liganden des PPAR $\gamma$ , steht in jüngerer Vergangenheit die Entwicklung sogenannter SPPARMS im Vordergrund wobei darunter mehrere grundsätzlich verschiedene Strategien zur Verbesserung der Sicherheit von PPAR $\gamma$  Liganden fallen. Eine Strategie ist es gewebespezifische SPPARMS zu entwickeln und auch Verbindungen, die PPAR $\gamma$  nur partiell aktivieren, schreiten weiter voran. Zudem ist es möglich, durch eine selektive Genmodulation, wie z.B. durch die Inhibition der Phosphorylierung von Ser245 (PPAR $\gamma$ 2: Ser273), neue PPAR $\gamma$  Liganden mit vermindertem Nebenwirkungsprofil zu etablieren. Mittlerweile sind einige SPPARMS in der Entwicklung.

PAM-1616 (**47**)<sup>337</sup>, KR 62980 (**48**)<sup>338</sup>, SPPAR $\gamma$ M5 (**49**)<sup>339</sup>, INT131 (**50**)<sup>374,375</sup>, L312 (**51**)<sup>376</sup>, MK-0533 (**52**)<sup>377</sup> und MBX-102 (**53**)<sup>378</sup> sind beispielsweise PPAR $\gamma$  Partialagonisten mit antidiabetischen Effekten und reduzierten Nebenwirkungen, wie z.B. Gewichtszunahme und kardialer Hypertrophie. Diese Partialagonisten stabilisieren wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben nur die Helix 3 während die Helix 12 relativ flexibel bleibt, was zu einer verminderten Transaktivierung führt<sup>302</sup>. Einige dieser Derivate werden mittlerweile in klinischen Studien getestet. Eine Phase 2 Studie, bei der die Wirksamkeit und das Nebenwirkungsprofil von INT131 (**50**) zu Behandlung der Multiplen Sklerose untersucht wurde, ist Anfang 2018 abgeschlossen worden. Bisher wurden jedoch noch keine Ergebnisse publiziert. Auch eine Phase 2 Studie zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ 2 wurde bereits abgeschlossen. Neben INT131 (**50**) wurde auch die Wirksamkeit von MK-0533 (**52**) bei Diabetes Mellitus Typ 2 während einer Phase 2 Studie untersucht. Auf Grund mangelnder Wirksamkeit wurde die Studie jedoch abgebrochen.

Genselektive Modulatoren können neben der Inhibition der Phosphorylierung von Serin in der AF-1 auch durch die Rekrutierung von speziellen Coaktivatoren ihre Wirkung entfalten.

S26948 (**54**) rekrutiert beispielsweise nur GRIP1 und trägt somit nicht zu Adipocyten-Differenzierung und Lipogenese bei, sondern zeigt nur antidiabetische Effekte<sup>379</sup>.

FK614 (**55**) hingegen rekrutiert nur PGC-1 $\alpha$ . Die PGC-1 $\alpha$  Rekrutierung ist essentiell für die Adipocyten-Differenzierung und die PPAR $\gamma$  abhängigen Effekte auf den Lipid-Stoffwechsel. FK614 (**55**) hat einen positiven Einfluss auf eine Steatose. Dies könnte an den in Kapitel 1.3.2 erläuterten Effekten auf die Lipidverteilung liegen. Insgesamt kommt es zu einer Umlagerung des viszeralen Fettgewebes in die Peripherie<sup>380,381</sup>. Eine Phase 2 Studie, bei der die Wirksamkeit von FK614 (**55**) bei Diabetes Mellitus Typ 2 untersucht wurde, ist bereits abgeschlossen.

MBX-102 (**53**) ist sowohl ein Partialagonist als auch ein selektiver Genmodulator. Im Vergleich zu den anderen Genmodulatoren beeinflusst MBX-102 (**53**) aber die Transrepression. PPAR $\gamma$  kann durch die Transrepression von proinflammatorischen Genen seine antientzündliche Wirkung entfalten. MBX-102 (**53**) ist in der Lage die Transrepression zu stimulieren, indem zwar die Freisetzung der Corepressoren NCoR1 (TRAC-1) und NcoR2 (SMRT) induziert wird, aber nur in sehr geringem Maß Coaktivatoren rekrutiert werden<sup>378</sup>. MBX-102 (**53**) zeigte während einer Phase 2/3 Studie zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ 2 vielversprechende Ergebnisse und wird derzeit auch zur Behandlung von Gicht getestet.

Auch der Partialagonist PAM-1616 (**47**) zeigt genmodulierende Eigenschaften. Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt. Jedoch konnte eine erhöhte Expression von GLUT-4, sowie dem Fettsäure-Transporter FABP4 (aP2) nach PAM-161- Applikation nachgewiesen werden. PAM-1616 (**47**) rekrutiert außerdem partial den adipogenen Cofaktor *mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1* (DRIP205 oder TRAP220). Insgesamt traten bei der Behandlung mit PAM-1616 (**47**) weniger Flüssigkeits-Retention und folglich auch weniger Ödeme und auch eine verringerte Gewichtszunahme auf, verglichen mit der Therapie mit Rosiglitazon (**23**)<sup>337</sup>.

Ein Inhibitor der Serin-Phosphorylierung ist z.B. das in Korea zugelassene Lobeglitazon (**56**). Lobeglitazon (**56**) ragt auf Grund der zusätzlichen para-Methoxyphenol-Gruppe in die alternative Bindungstasche und ist daher in der Lage die Cdk5 abhängige Phosphorylierung an Ser245 (PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2: Ser273) zu inhibieren<sup>299,303</sup>. Das Nebenwirkungsprofil von Lobeglitazon (**56**) ist im Vergleich zu anderen Glitazonen hinsichtlich der Kanzerogenität und der Effekte auf den Lipidstoffwechsel verbessert<sup>340</sup>. Daher stellt Lobeglitazon (**56**) möglicherweise eine vielversprechende neue Therapieoption aus der Substanzgruppe der Glitazone dar.

Zudem wurden mittlerweile auch PPAR $\gamma$  Liganden ohne agonistische Wirkung, die jedoch die Serin-Phosphorylierung verhindert entwickelt. SR1664 (**57**) und SR1824 (**58**) gehören zu diesen Modulatoren, die im Vergleich zu Glitazonen keine Nebenwirkungen, wie Gewichtszunahme und Flüssigkeitsretention hervorrufen, sondern nur antidiabetische Effekte durch die Inhibition der Phosphorylierung besitzen<sup>376,382,383</sup>. Das SR1664-Derivat UHC1 (**59**) besitzt noch stärker ausgeprägte antidiabetische und antiinflammatorische Effekte<sup>383</sup>. Außerdem befinden sich weitere Verbindungen wie F12016 (**60**)<sup>384</sup> und L312 (**51**)<sup>376</sup> in der Entwicklung.

Auch das Salicylsäure-Derivat Amorfrutin wird als SPPARM bezeichnet, da trotz antidiabetischer und antiinflammatorischer Effekte, die Gene, die für die Adipogenese verantwortlich sind, nur geringfügig induziert werden<sup>331,332</sup>. Das Diuretikum Telmisartan (**42**) weist zumindest in Tierversuchen mit Mäusen eine selektive Gemodulation auf und wirkt antidiabetisch ohne zu einer Gewichtszunahme zu führen<sup>334</sup>. Die Expression von Adiponektin wird selektiv induziert<sup>385</sup>, was Ursache für die verbesserte Insulinsensitivität, sowie die verminderte Expression von NF- $\kappa$ B und folglich auch TNF- $\alpha$  sein könnte<sup>386</sup>. Die Struktur ähnelt zudem den beiden SPPARMs SR1664 (**57**) und SR1824 (**58**). Die im Tierversuch beobachteten Effekte konnte jedoch bisher nicht im Menschen bestätigt werden. Es wurden bisher nur wenige klinische Studien mit geringer Probandenzahl zur Evaluierung der Wirksamkeit von Telmisartan (**42**) zur Verbesserung der Insulinsensitivität durchgeführt. Diese Studien ergaben kein einheitliches Ergebnis. Zur Evaluierung der klinischen Studien wurde meist das Senken des *Homeostasis Model Assessment* (HOMA)-Index als primärer Endpunkt gewählt. Der HOMA-Index wird mit Hilfe des Blutzuckerspiegels im nüchternen Zustand und den entsprechenden Insulinspiegeln berechnet. Es konnte nicht zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Blutzuckerspiegel durch Telmisartan-Therapie signifikant gesenkt werden<sup>387</sup>.

PPAR $\gamma$  Antagonisten wie GW9662 (**24**)<sup>345</sup>, BADGE (**61**)<sup>346</sup>, SR11023 (**62**)<sup>347</sup> und LG100641 (**63**)<sup>348</sup> werden bisher häufig nur als sogenannte „*tool compounds*“ für Kontroll-Versuche verwendet. LG100641 (**63**) zeigt jedoch ein besonderes Wirkprofil, indem es die Rekrutierung von bestimmten Coaktivatoren nach Zugabe von Rosiglitazon (**23**) inhibiert. Dadurch wird die Differenzierung der Adipocyten verhindert, jedoch nicht der Rosiglitazon (**23**) vermittelte Effekt auf die Blutzuckerspiegel. Auch wenn der genaue molekulare Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist, weist dies daraufhin, dass in Zukunft auch PPAR $\gamma$  Antagonisten eine Rolle in der Wirkstoffentwicklung spielen könnten<sup>348</sup>.

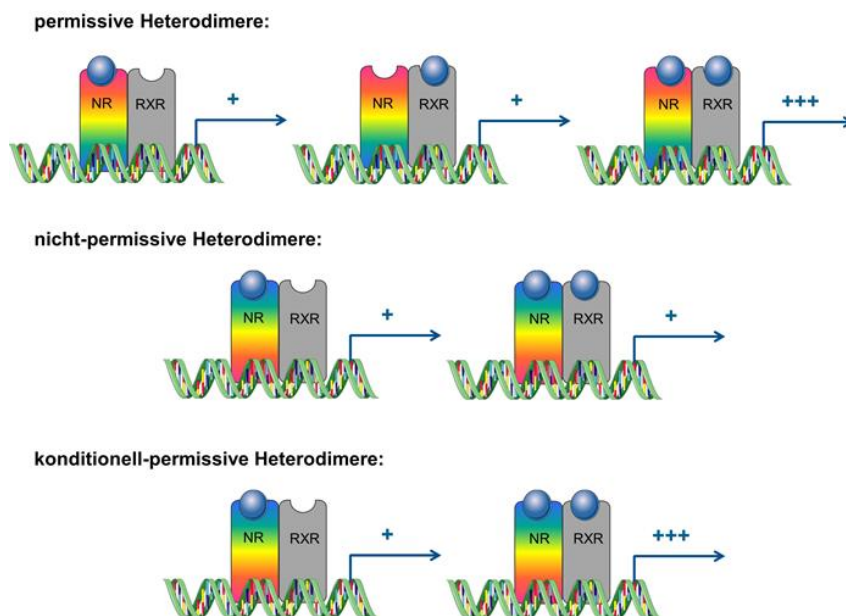
PPAR $\gamma$  stellt eine Zielstruktur der Pharmakotherapie dar, deren Modulation einerseits positive Effekte, wie die Verbesserung der Insulinsensitivität und eine antiinflammatorische Wirkung hervorruft. Andererseits wirken PPAR $\gamma$  Agonisten aber auch lipogen und führen zu

einer starken Gewichtszunahme. Diese Nebenwirkungen sind vor allem im Hinblick auf die entsprechenden Indikationen, die eng mit dem metabolischen Syndrom und damit auch Adipositas verknüpft sind, kontraproduktiv. In der Arzneistoff-Entwicklung scheinen daher Gen-selektive Modulatoren, die keinen Einfluss auf lipogene Gene besitzen, eine neue Therapieoption zu sein. Aber auch die Entwicklung von Liganden, die die Rekrutierung von bestimmten Coaktivatoren oder auch Corepressoren vermitteln, könnte ein neuer vielversprechender Ansatz sein.

## 1.4 RXR

Die RXRs nehmen als Heterodimer-Partner von nukleären Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei metabolischen Stoffwechselprozessen, aber auch bei Wachstums- und Differenzierungs-Vorgängen, ein. Eine Aktivierung der RXRs führt zu einer Vielzahl pleiotroper Effekte, die Auswirkungen auf das Wachstum von Tumoren, metabolische Erkrankungen und auch neurodegenerative Erkrankungen haben können. Daher steht RXR zurzeit im Fokus der Arzneistoffentwicklung. Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, Alzheimer, Parkinson und auch Multiple Sklerose könnten, aktuellen Ergebnissen zufolge, zukünftig über eine Modulation von RXR behandelt werden<sup>20,40,388–395</sup>.

### 1.4.1 Struktur und Aktivierung des Rezeptors



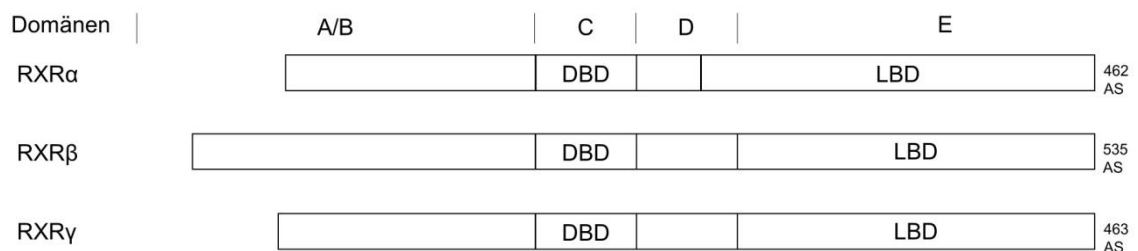
**Abbildung 16: Heterodimere mit RXR. RXR kann sowohl permissive als auch nicht-permissive Heterodimere bilden. Permissive Heterodimere können im Gegensatz zu nicht-permissiven auch durch reine RXR-Ligandenbindung aktiviert werden. Konditionell-permissive Heterodimere können ebenfalls nicht durch reine RXR-Ligandenbindung aktiviert werden. Es kommt jedoch zu additiven Effekten, wenn beide Heterodimer-Partner an einen Liganden gebunden vorliegen<sup>39,396</sup>.**

RXR gehört zu den Nicht-Steroidrezeptoren und ist der Heterodimer-Partner von etwa einem Drittel der nukleären Rezeptoren<sup>397,398</sup>. Wie in Kapitel 1.1. beschrieben, gibt es permissive und nicht-permissive Heterodimere, die wiederum in konditionell-permissive Heterodimere unterteilt werden können<sup>399,400</sup>. Permissive Heterodimere, die aus einem RXR Monomer und einem Monomer von LXR, FXR, Pregnan-X-Rezeptor (PXR), Konstitutiver Androstan Rezeptor (CAR) oder PPAR bestehen, können auf drei verschiedene Weisen aktiviert werden. Entweder bindet ein Ligand an eins der beiden Monomere oder beide Monomere

werden jeweils von einem Liganden gebunden. Nicht-permissive Heterodimere, bestehend aus RXR und THR, VDR oder RAR, können dagegen nicht durch reine RXR Liganden-Bindung aktiviert werden<sup>40,396</sup>. Das konditionell-permissive RAR/RXR-Heterodimer besitzt jedoch wie permissive Heterodimere eine höhere Transkriptions-Aktivität, wenn beide Heterodimer-Partner an einen Liganden gebunden vorliegen (Abbildung 16). Häufig handelt es sich bei Liganden von permissiven Heterodimeren um Fettsäuren und Lipidmediatoren mit eher geringerer Bindungs-Affinität zum Rezeptor, während nicht-permissive Heterodimer-Partner von RXR häufig von hoch affinen Liganden gebunden werden<sup>401-403</sup>. Der RXR ist außerdem in der Lage nicht nur mit Thyroidhormon-Rezeptor ähnlichen Rezeptoren und Retinoid-X-Rezeptor ähnlichen Rezeptoren Heterodimere auszubilden, sondern auch mit Monomeren der Familie der Nervenwachstumsfaktor IB ähnlichen Rezeptoren<sup>399,404</sup>. Der RXR kann jedoch auch Homodimere und Homotetramere ausbilden<sup>405,406</sup>. Man geht davon aus, dass RXR im Liganden-ungebundenen Zustand bevorzugt Homotetramere ausbildet, die nach Liganden-Bindung dissoziieren<sup>398,407</sup>. Voraussetzung für die Bildung der Homotetramere ist, dass durch die Bildung eines Homodimers eine neue Dimerisierungsoberfläche entsteht (Helix 11 und 12), an die ein weiteres Homodimer binden kann<sup>408,409</sup>. Durch die Bindung und Aktivierung eines RXR-Homodimers könnte RXR auch unabhängig von anderen nukleären Rezeptoren Effekte ausüben<sup>410,411</sup>. Die genaue Funktion dieser Homodimere und Homotetramere ist jedoch noch weitgehend unbekannt<sup>412</sup>. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass RXR-Homodimere in der Lage sind das PPRE DR1 zu binden<sup>406</sup>. Außerdem interagieren die RXR-Homodimere im Liganden-ungebundenen Zustand nur schwach mit den Corepressoren NCoR1 (TRAC-1) und NCoR2 (SMRT). Dies lässt darauf schließen, dass Homodimere nur eine schwache repressive Wirkung auf die Expression entsprechender Zielgene besitzen<sup>413,414</sup>. Da die LBD und die für die Dimerisierung verantwortliche Domäne der RXR-Subtypen verschiedenen Konformationen einnehmen kann, sind Heterodimere von RXR im Gegensatz zu Homodimeren in der Lage verschiedene *Response* Elemente zu binden. Welche DNA-Abfolge gebunden wird, bestimmt dabei der Heterodimer-Partner von RXR<sup>33,415-417</sup>. Beispielsweise kann RXR abhängig vom Heterodimer-Partner entweder die DNA-Sequenz am 5'- oder 3'-Ende binden<sup>418</sup>. Normalerweise bindet RXR im Heterodimer an die Basen-Abfolge am 5'-Ende mit der Ausnahme der Heterodimere RAR/RXR und PPAR/RXR. Beim Heterodimer RAR/RXR kann die Position der Bindung variieren<sup>415,418,419</sup>. Wie bei anderen nukleären Rezeptoren binden Corepressoren, wie NCoR1 (TRAC-1)<sup>420</sup> oder NCoR2 (SMRT)<sup>421</sup> im Ligand-freien, inaktiven Zustand an das entsprechende Homo- oder Heterodimer bzw. Homotetramer. Nach Ligandenbindung kommt es zur Konformationsänderung der Helix 10/11 und 12 und die Dimerisierungsoberfläche verändert sich<sup>393</sup>. Die Homotetramere dissoziieren und es kommt zur Rekrutierung von Coaktivatoren wie SRC-3 (auch TIF2 oder GRIP1) oder MED1

(auch DRIP205 oder TRAP220)<sup>422,423</sup>. Bindet ein RXR Ligand an ein permissives Heterodimer, beeinflusst diese Bindung auch die Konformation des Heterodimer-Partners von RXR. Auch wenn dieser permissive Heterodimer-Partner ungebunden vorliegt, kommt es zur Konformationsänderung der Helix 12, die ermöglicht, dass Coaktivatoren binden können und es letztendlich zur Transkription von Zielgenen kommt. Man nimmt an, dass nicht-permissive Heterodimere, die ohne gebundenen Ligand vorliegen, wahrscheinlich die Konformationsänderung des Liganden-gebundenen RXR verhindern und die Corepressor-Bindung stabilisieren. Damit reicht eine Liganden-Bindung von RXR nicht aus, um eine Transaktivierung zu induzieren<sup>424,425</sup>. Der Aufbau der RXR Isoformen ist analog zu anderen Nicht-Steroidrezeptoren. Während die N-terminale Domäne A/B variabel ist, ist die DBD hoch konserviert. Die *hinge*-Region hingegen ist ebenfalls variabel. Die Aminosäure-Sequenz der LBD in Domäne E ist bei allen drei Subtypen identisch. Die Domäne F ist dagegen hochvariable und im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren stark verkürzt<sup>388</sup>. Die Dimerisierungsfunktion der DBD spielt bei den RXRs nur eine untergeordnete Rolle<sup>426,427</sup>. Hauptsächlich tragen die Interaktionen mit der LBD zu einer Dimerisierung bei<sup>428,429</sup>.

#### 1.4.2 Isoformen und Splicevarianten der RXRs



**Abbildung 17: Vergleich der RXR Subtypen<sup>430</sup>. Die RXR Subtypen unterscheiden sich größtenteils in der N-terminalen Domäne A/B.**

Es gibt drei bekannte RXR Subtypen, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  und RXR $\gamma$ , deren Gene auf den Chromosomen 9, 6 und 1 lokalisiert sind<sup>431</sup>. Mindestens einer der Subtypen ist in jeder Zelle des Körpers exprimiert<sup>432</sup>. Die RXR $\alpha$  Isoform befindet sich vor allem in Niere, Leber, Darm und der Haut. RXR $\beta$  ist ubiquitär zu finden. RXR $\gamma$  hingegen befindet sich hauptsächlich in der Hypophyse und anderen Hirnarealen, sowie in Muskelzellen<sup>432–435</sup>. 1990 wurde RXR $\alpha$  als erste RXR Isoform entdeckt<sup>435</sup>, bevor einige Jahre später auch die beiden anderen Isoformen detektiert wurden<sup>35,432,436–439</sup>. Alle drei Isoformen besitzen jeweils zwei Splicevarianten, die jedoch bisher noch nicht ausreichend funktionell charakterisiert wurden<sup>412,440–443</sup>. Die drei RXR-Isoformen unterscheiden sich vor allem in der N-terminalen Domäne A/B<sup>444</sup>. RXR $\beta$  besitzt die längste Aminosäure-Sequenz, während RXR $\alpha$  und RXR $\gamma$  etwa gleich lang sind (Abbildung 17).

### 1.4.3 Physiologische Funktion von RXR

Tabelle 10: physiologische Funktionen der RXRs und molekularer Wirkmechanismus.

Allgemeine physiologische Funktion	Gewebe und spezielle Funktion	Molekularer Wirkmechanismus	Beteiligung Subtyp/Heterodimer
Wachstum und Entwicklung des Körpers	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Embryonale Entwicklung<sup>393</sup>: Organogenese (u.a. Herz, Augen, Plazenta)<sup>445</sup></li> </ul>	Herz <sup>446</sup> : Zelldifferenzierung↓ Zellproliferation↑ <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ genaue molekulare Mechanismen nicht bekannt</li> </ul>	RAR/RXRα
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Zelldifferenzierung &amp; Zellproliferation<sup>447,448</sup> (Differenzierung von Hautzellen, Haarwachstums, Bildung von Spermazellen<sup>393,449</sup>)</li> <li>➤ Apoptose</li> </ul>	Zelldifferenzierung & Zellproliferation: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ genaue molekulare Mechanismen nicht bekannt</li> </ul> Apoptose: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Expression der <i>tissue transglutaminase</i> (tTG)↑ → Apoptose↑ (myeloischen Zellen)<sup>450</sup></li> <li>➤ <i>Insulin-like growth factor</i> Bindungsprotein (IGFBP)-3 bindet RXR → Apoptose↑<sup>451</sup></li> </ul>	Haut & Haarwachstum → VDR/RXRα  Spermato-genese → RXRβ
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Neuronale Entwicklung<sup>452</sup> (synaptische Plastizität)</li> <li>➤ ZNS: Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen zu Gliazellen<sup>453,454</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ genaue molekulare Mechanismen noch nicht bekannt</li> <li>➤ Remyelinisierung durch Induktion des Myelin-Basischen Proteins (MBP)<sup>454</sup></li> <li>➤ Auflösung von β-Amyloid-Plaques durch Induktion von ABCA1 und ApoE</li> </ul>	RXRβ und RXRγ  Gehirn und ZNS → RXRγ
Einfluss auf metabolische Prozesse	<p>Lipid-Stoffwechsel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Speicherung und Mobilisation von Triglyceriden<sup>455</sup></li> <li>➤ Adipocyten-Differenzierung<sup>455</sup></li> <li>➤ Adipogenese</li> <li>➤ erhöhte Triglycerid-Spiegel aber auch Fettsäure-Abbau (β-Oxidation)</li> </ul> <p>Glucose-Stoffwechsel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ verbesserte Insulinsensitivität<sup>456-458</sup></li> <li>➤ Glykogen-Aufbau<sup>459</sup></li> </ul> <p>Gallensäure-Stoffwechsel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Gallensäure-Synthese wird gehemmt<sup>460</sup></li> </ul>	PPARγ/RXRα → Adipocyten-Differenzierung & Adipogenese (Kapitel 1.3.3)  LXR/RXR-Heterodimer Aktivierung → erhöhte Expression von: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ SREBP-1c<sup>461</sup></li> </ul> → Expression FAS, ACC1 und SCD-1↑ → Umwandlung von Kohlenhydraten in Fettsäuren <sup>274,275</sup> → Cholester-Biosynthese↑ <sup>461</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ApoC-III</li> <li>→ Inhibitor der LPL</li> <li>→ Hemmung der hepatischen Aufnahme von VLDL und Chylomikronen → Plasma-Triglycerid-Spiegel↑<sup>462</sup></li> <li>➤ ABC-1↑ → Cholester-Efflux↑<sup>463</sup></li> </ul> PPARγ/ RXR-Heterodimer (Kapitel 1.3.2): <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Aufnahme von Fettsäuren in Adipocyten</li> <li>➤ insulinsensitive Effekte werden vermittelt</li> </ul> PPARα/ RXR-Heterodimer: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ β-Oxidation (Skelettmuskelzellen)<sup>459,464</sup> → CD36<sup>459,465</sup> &amp; UCP3 werden induziert<sup>466-469</sup></li> </ul> FXR/ RXR-Heterodimer: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Cholesterol 7α-Hydroxylase (CYP7A1) und Oxysterol 7α-Hydroxylase (CYP7B1) werden inhibiert</li> </ul> THR/ RXRγ-Heterodimer (Kapitel 1.2.2): <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ verminderte TSH Sekretion<sup>470,471</sup> → verringerte Thyroidhormon-Spiegel → Stoffwechselprozesse↓</li> </ul>	Adipocyten-Differenzierung & Adipogenese → PPARγ/RXRα <sup>472-474</sup>  Triglycerid-Spiegel → LXR/RXR  insulinsensitive Effekte → PPARγ/RXR  Fettsäure-Oxidation → PPARα/ RXR  Einfluss auf Gallensäurespiegel → FXR/RXR  Effekte auf verschiedene Stoffwechselprozesse → THR/ RXRγ <sup>456,464,475</sup>



Allgemeine physiologische Funktion	Gewebe und spezielle Funktion	Molekularer Wirkmechanismus	Beteiligung Subtyp/Heterodimer
Einfluss auf inflammatorische Prozesse	Immunsystem: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen</li> <li>➤ verminderter oxidativer Stress</li> </ul>	Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ die Oberflächenproteine und Differenzierungsmarker <i>cluster of differentiation</i> (CD)83 und CD86 werden RXR abhängig exprimiert<sup>476</sup></li> </ul> verminderter oxidativer Stress: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Expression von Komponenten der NADPH Oxidase (Nox)↓ → Nox4, Nox2 und p22phox → reaktive Sauerstoffspezies (ROS)↓</li> <li>➤ Inhibition des <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1</i> (Rac1) → Glucose induzierte Nox-Aktivierung↓ → ROS↓</li> <li>➤ PKC↓ → Aktivator von Rac1 → Nox↓ → ROS↓<sup>477,478</sup></li> </ul>	
Sonstiges	Funktion des Herzens RXRα → kardioprotektiv?	Kardiomyozyten: <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Transkription von Zielgenen der drei PPAR Subtypen und LXR↑</li> <li>➤ oxidativer Stress↓</li> </ul>	PPAR/RXR, LXR/RXR
	Tumorentstehung und Tumor-Apoptose	Tumorentstehung <sup>479,480</sup> : <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ v.a. erhöhte RXRα Expression in Tumorzellen</li> <li>➤ molekularer Mechanismus und Funktion von RXR unbekannt</li> <li>➤ verkürzter RXR (tRXR) wird auf Tumorzellen exprimiert → Apoptose↓</li> </ul> Tumor-Apoptose <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Expression des cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors 1 (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>)↑ → Apoptose↑<sup>481-483</sup>.</li> <li>➤ Inhibition von TNFα → Expression von NF-κB↓ → Apoptose↑<sup>484</sup></li> </ul>	Tumorentstehung: RXRα & tRXR  Tumor-Apoptose: Inhibition von TNFα → RXRα

Als Heterodimer-Partner spielen die RXRs bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine Rolle und die Anzahl, der durch RXR-Aktivierung beeinflussten Zielgene ist immens hoch. Vor allem knockout-Studien führten zu einem besseren Verständnis der RXR-abhängigen Signalwege. Alle drei Isoformen scheinen bei der embryonalen Entwicklung eine Rolle zu spielen. RXRα besitzt jedoch den größten Einfluss<sup>485</sup>. Außerdem sind vor allem die Dimerisierung mit den RARs und die Bindung von All-trans-Retinsäure (Tretinoin) an die RARs von entscheidender Bedeutung<sup>486,487</sup>. Die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Organogenese werden durch die Aktivierung des RAR/RXR-Heterodimers fundamental beeinflusst<sup>393</sup>. Hauptsächlich wird die Organogenese des Herzens und die Morphogenese des Auges durch das RAR/RXR-Heterodimer stimuliert<sup>488</sup>. RXR spielt wahrscheinlich schon in sehr frühen Stadien der Organogenese des Herzens eine Rolle und beeinflusst die Zelldifferenzierung und Proliferation. Die Differenzierung der Zellen wird dabei inhibiert, während die Proliferation gefördert wird<sup>446</sup>. Der genaue molekulare Mechanismus ist bisher nicht bekannt.

RXR $\alpha$  knockout-Studien führten im Tiermodell zu Hypoplasien des Myokards und Defekten der Herzventrikel, sowie einer Ausdünnung der Herzwand<sup>452,489</sup>. Die Expression der vorhofspezifischen Myosin-Leichtkette 2 (MLC2a) korreliert mit diesen kardialen Dysfunktionen und Fehlbildungen<sup>490</sup>. Auch nach der Organogenese des Herzens, spielen RXRs eine wichtige Rolle bei kardialen Funktionen. Es konnte nachgewiesen werden, dass RXR Agonisten die Transkription von Zielgenen der drei PPAR Subtypen und LXR durch die Stimulation der permissiven Heterodimere in Kardiomyozyten induzieren<sup>393</sup>. Außerdem korreliert eine erhöhte Expression von RXR $\alpha$  mit einem verminderten Risiko an Herzinsuffizienz zu erkranken<sup>491</sup>.

RXR $\alpha$  knockout-Studien belegen zudem, dass die Differenzierung von Hautzellen und der Zyklus des Haarwachstums durch Fehlen des Rezeptors gestört ist. Es wird vermutet, dass das VDR-RXR $\alpha$ -Heterodimer einen wesentlichen Einfluss auf diese Prozesse hat<sup>447,448</sup>. Jedoch fördern RXRs nicht nur Differenzierungs-Prozesse, sondern stimulieren zum Teil auch die Apoptose. RXR Agonisten induzieren z.B. eine spezielle Transglutaminase (*tissue transglutaminase*, tTG), die für den programmierten Zelltod in myeloischen Zellen verantwortlich ist<sup>450</sup>. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das *Insulin-like growth factor* Bindungsprotein (IGFBP)-3 RXR bindet und auf diesem Weg die Apoptose induziert wird<sup>451</sup>.

Die knockout-Studien beweisen außerdem, dass ein Organismus ohne RXR $\alpha$  nicht überlebensfähig ist<sup>489,492</sup>. RXR $\beta$  und RXR $\gamma$  können dagegen durch RXR $\alpha$  in ihrer Funktion ersetzt werden und sind daher nicht zwangsläufig lebensnotwendig<sup>465</sup>.

Die knockout-Studien zeigen zudem, dass RXR $\alpha$  essentiell für die Ausbildung der Plazenta ist<sup>445</sup>, während RXR $\beta$ -knockout zu defekten Spermazellen und somit zur Infertilität führt<sup>393,449</sup>. Ein knockout von RXR $\beta$  und RXR $\gamma$  bedingte zudem schwerwiegende neurologische Schäden, die wahrscheinlich auf Defekte in der synaptischen Plastizität zurückzuführen sind<sup>452</sup>. Einige Studien in Tieren zeigen außerdem, dass eine RXR $\gamma$ -Aktivierung die Differenzierung von Oligodendrocyten-Vorläuferzellen, die zu den Gliazellen gehören und nur im ZNS vorkommen, stimuliert. Durch Bindung und Aktivierung der RXR $\gamma$ -Isoform könnten beispielsweise defekte Myelinscheiden von Nervenzellen regeneriert werden<sup>453,454</sup>. Untersuchungen mit Oligodendrocyten-Vorläuferzellen, die mit dem RXR Agonist 9-cis Retinsäure (**9**) inkubiert wurden, wiesen erhöhte Konzentrationen des Myelin-Basischen Proteins (MBP) auf. MBP ist essentiell für die Remyelinisierung<sup>454</sup>. Defekte und zerstörte Myelinscheiden treten unter anderem bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose auf<sup>493</sup>. RXR könnte aber auch auf andere neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. Parkinson, einen Einfluss haben. Zurzeit wird der Einfluss des RXR/Nurr1-Heterodimers auf diese Erkrankung untersucht<sup>494</sup>. Auch bei der Behandlung von Alzheimer scheint RXR eine

potenzielle Zielstruktur zu sein. Durch die  $\beta$ -Amyloid-Plaques wird zum einen die Myelinisierung beeinträchtigt<sup>495</sup>. Außerdem induziert vor allem RXR $\beta$  ABCA1 und ApoE, die zumindest in Tiermodellen zur Auflösung von  $\beta$ -Amyloid-Plaques beitragen konnten<sup>496</sup>. Erste Tierversuche<sup>497</sup> und eine klinische Studie, mit geringer Patientenzahl<sup>498</sup> ergaben zusätzlich vielversprechende Ergebnisse für die Behandlung von Alzheimer mit RXR Agonisten.

Auch metabolische Prozesse werden über RXRs reguliert. RXRs greifen beispielsweise in den Lipid-Stoffwechsel ein. RXR $\alpha$  reguliert die Speicherung und Mobilisation von Triglyceriden. In RXR $\alpha$  knockout Modellen ergaben sich Veränderung bei der Adipocyten-Differenzierung und eine Gewichtsabnahme, sowie eine Beeinträchtigung der Lipolyse<sup>455</sup>. Dies lässt darauf schließen, dass RXR $\alpha$ , durch die Aktivierung des permissiven PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimers, einen Einfluss auf die Lipid-Homöostase hat<sup>472-474</sup>. Auch das PPAR $\alpha$ /RXR-Heterodimer beeinflusst den Lipid-Stoffwechsel, indem die Aufnahme von Fettsäuren, sowie die  $\beta$ -Oxidation in Skelettmuskelzellen bei einer Aktivierung des Heterodimers gefördert wird<sup>459,464</sup>. Die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen wird vor allem durch CD36 stimuliert<sup>459,465</sup>. Eine gesteigerte CD36 Expression wird zudem mit einer erhöhten  $\beta$ -Oxidations-Rate assoziiert<sup>499,500</sup>. In den Skelettmuskeln wird UCP3 durch RXR-Agonisten induziert. UCP3 soll die Effizienz der Fettsäure-Oxidation steigern<sup>501</sup>, indem es die Fettsäuren an die äußere Mitochondrien-Membran transportiert. Dort werden Fettsäuren zunächst durch die Kopplung an Coenzym A aktiviert bevor sie an Carnitin gebunden werden und so in die Mitochondrien-Matrix gelangen<sup>466-469</sup>.

RXR $\beta$ -defiziente Mäuse nahmen an Gewicht zu, hatten ein erhöhtes Gallenstein Risiko und entwickelten häufig Tumore in den Gallengängen<sup>502</sup>. RXR $\gamma$  knockout-Mäuse hingegen zeigten eine verringerte Gewichtszunahme, einen erhöhten Stoffwechselumsatz und eine verringerte Nahrungsaufnahme<sup>503,504</sup>. Außerdem zeigen RXR $\gamma$  knockout-Mäuse eine erhöhte Expression und Aktivität von LPL in Skelettmuskeln<sup>505</sup>.

Um weitere molekulare Wirkmechanismen der RXRs aufzudecken wurden einige Tier-Studien mit Rexinoiden, potenten RXR Agonisten, durchgeführt. Es traten erhöhte Triglycerid-Spiegel, jedoch auch eine verbesserte Insulinsensitivität auf<sup>456-458</sup>. Vor allem die Heterodimere LXR/RXR und PPAR $\gamma$ /RXR scheinen dabei von Bedeutung zu sein<sup>456,464,475</sup>. Über das LXR/RXR-Heterodimer wird der Triglycerid-Spiegel erhöht, indem SREBP-1c<sup>461</sup> und ApoC-III induziert werden<sup>506,507</sup>. SREBP-1c ist ein essentielles Protein für die Fettsäure-Synthese, da es die Expression einiger wichtiger Enzyme der Lipogenese, wie FAS, ACC1 und SCD-1, erhöht. Außerdem induziert SREBP-1c die Umwandlung von Kohlenhydraten in Fettsäuren<sup>274,275</sup> und fördert die Cholesterol-Biosynthese<sup>461</sup> (siehe Kapitel 1.3.3). ApoC-III ist Teil von VLDL, HDL und Chylomikronen und ist ein Inhibitor der LPL. Außerdem inhibiert ApoC-III die hepatische Aufnahme von VLDL und Chylomikronen und führt so zu erhöhten

Plasma-Triglycerid-Spiegeln<sup>462</sup>. Über das PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer werden die insulin sensitiven Effekte vermittelt, wie in Kapitel 1.3.3 ausführlich erläutert wird.

Zudem sollen die Effekte auf den Lipid- und Glucose-Stoffwechsel auch teilweise über das ZNS vermittelt werden<sup>457</sup>. Analog zu den Ergebnissen der knockout-Modelle zeigte sich eine verminderte LPL Aktivität in Herz- und Skelettmuskelzellen<sup>459</sup>, ohne dass die hepatische Enzymaktivität beeinflusst wurde<sup>508</sup>. Außerdem kommt es nach Rexinoid-Applikation zu einer iatrogenen Hepatomegalie<sup>388,509</sup> und zeitlich zu einer erhöhten Expression der Laurinsäure-Hydroxylase<sup>506</sup> und FAS<sup>509</sup>.

Auch der Glucosespiegel wird durch die Aktivierung von RXR moduliert. Einerseits führt die Aktivierung des PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimers zu einer verbesserten Insulinsensitivität<sup>456-458</sup>. Andererseits wird die Glykogen-Synthase-Aktivität in Skelettmuskelzellen durch Rexinoide erhöht<sup>459</sup>.

Außerdem wird durch die Stimulierung des FXR/RXR-Heterodimers die Gallensäure-Synthese gehemmt, da die beiden Enzyme Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) und Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7B1) inhibiert werden. CYP7A1 katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gallensäuren-Synthese ausgehend von Cholesterol und CYP7B1 katalysiert die alternative Biosynthese der Gallensäuren ausgehend von Oxysterolen<sup>460</sup>. Außerdem wird der Gallensäure-Spiegel zusätzlich durch die Aktivierung des LXR/RXR-Heterodimers vermindert, da ABC-1 vermehrt exprimiert wird. ABC-1 ist ein Transportprotein, das den Efflux von Cholesterol aus den Enterozyten in das Darmlumen katalysiert und so für die Eliminierung des Ausgangsstoffes der Gallensäuren-Synthese sorgt<sup>463</sup>.

Rexinoide vermindern außerdem die TSH Sekretion aus der Hypophyse und wirken so auf die Thyroidhormon-regulierten Wirkmechanismen ein (siehe Kapitel 1.2.3)<sup>470,471</sup>. Da RXR $\gamma$  in thyreotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens zu finden ist und RXR $\gamma$ -knockout Mäuse Störungen bei der Regulation der Thyroidhormone aufweisen, ist der RXR $\gamma$ -Subtyp wahrscheinlich für diese Rexinoid-Wirkung verantwortlich<sup>505</sup>.

Auch in inflammatorische Prozesse greifen RXRs ein<sup>510</sup>. Wird RXR stimuliert, kommt es zu einer Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen. Die Oberflächenproteine und Differenzierungsmarker *cluster of differentiation* (CD)83 und CD86 werden RXR abhängig exprimiert<sup>476</sup>. Auch die Induktion von oxidativem Stress wird durch RXR-Aktivierung vermindert. Die Expression von Komponenten der NADPH Oxidase (Nox), wie Nox4, Nox2 und p22phox werden direkt inhibiert. Nox produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und spielen bei zahlreichen Signalkaskaden eine Rolle. Unter anderem werden inflammatorische Prozesse, die Zelldifferenzierung und auch das Wachstum von Tumoren stimuliert. ROS können als sekundäre Botenstoffe fungieren und verschiedenen Signalkaskaden, wie z.B.

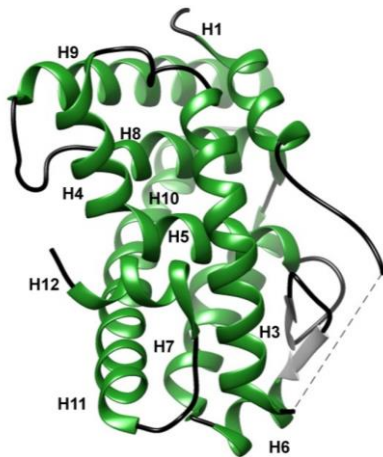
den proinflammatorischen I $\kappa$ B Kinase (IKK)/NF- $\kappa$ B-Signalweg, den proliferativen MAPK/*extracellular-signal regulated kinase* (ERK)-Signalweg, der zusätzlich einen großen Einfluss auf den Zellzyklus hat und den okogenen Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg, aktivieren<sup>511</sup>.

Außerdem trägt eine RXR-Aktivierung zu einer Inhibition des *Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1* (Rac1) bei. Rac 1 ist ein Modulator vieler Zellprozesse. Neben dem Einfluss auf den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung, soll Rac1 eine entscheidende Rolle bei der durch hohe Glucose-Spiegel induzierten Nox-Aktivierung spielen. Somit wird auch indirekt die Nox-Aktivität und damit die Bildung von ROS gehemmt. Auch die PKC, ein Aktivator von Rac1 wird durch RXR inhibiert. Durch die verminderte ROS Produktion verhindern RXR Agonisten die Induktion einer Apoptose und wirken daher unter anderem kardioprotektiv<sup>477,478</sup>.

RXRs sind jedoch auch bei der Entstehung von Tumoren beteiligt. In 66% der duktalen Brusttumore ist RXR überexprimiert<sup>479</sup>. Zudem wird vor allem die RXR $\alpha$ -Expression während des Fortschreitens der Erkrankung induziert<sup>480</sup>. Außerdem kann durch proteolytische Spaltung des Volllängen-RXR ein verkürzter Rezeptor (*truncated RXR*, tRXR) entstehen, der über den PI3K/Akt Signalweg antiapoptotisch wirkt<sup>512,513</sup>. tRXR wird nur von Tumorzellen exprimiert und ist nicht in gesundem Gewebe zu finden. Der Rezeptor stellt daher ein neues Target für die Therapie einiger Tumor-Arten, wie Schilddrüsenkarzinome, Kolonkarzinome und Brust-, sowie Prostatatumore, dar<sup>514</sup>.

Es konnte jedoch auch festgestellt werden, dass RXR-Agonisten zu einer erhöhten Expression des cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors 1 (p21<sup>WAF1/CIP1</sup>) führen. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> induziert die Apoptose von Tumorzellen<sup>481–483</sup>. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Nitrostyren Derivate, die als RXR $\alpha$  Agonisten fungieren, die Expression von TNF $\alpha$  hemmen und somit auch die Expression von NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B fördert die Zelldifferenzierung und Zytokinproduktion. Außerdem hemmt der Transkriptionsfaktor die Apoptose. Die Nitrostyren Derivate konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die antiapoptotische Wirkung von NF- $\kappa$ B inhibieren<sup>484</sup>.

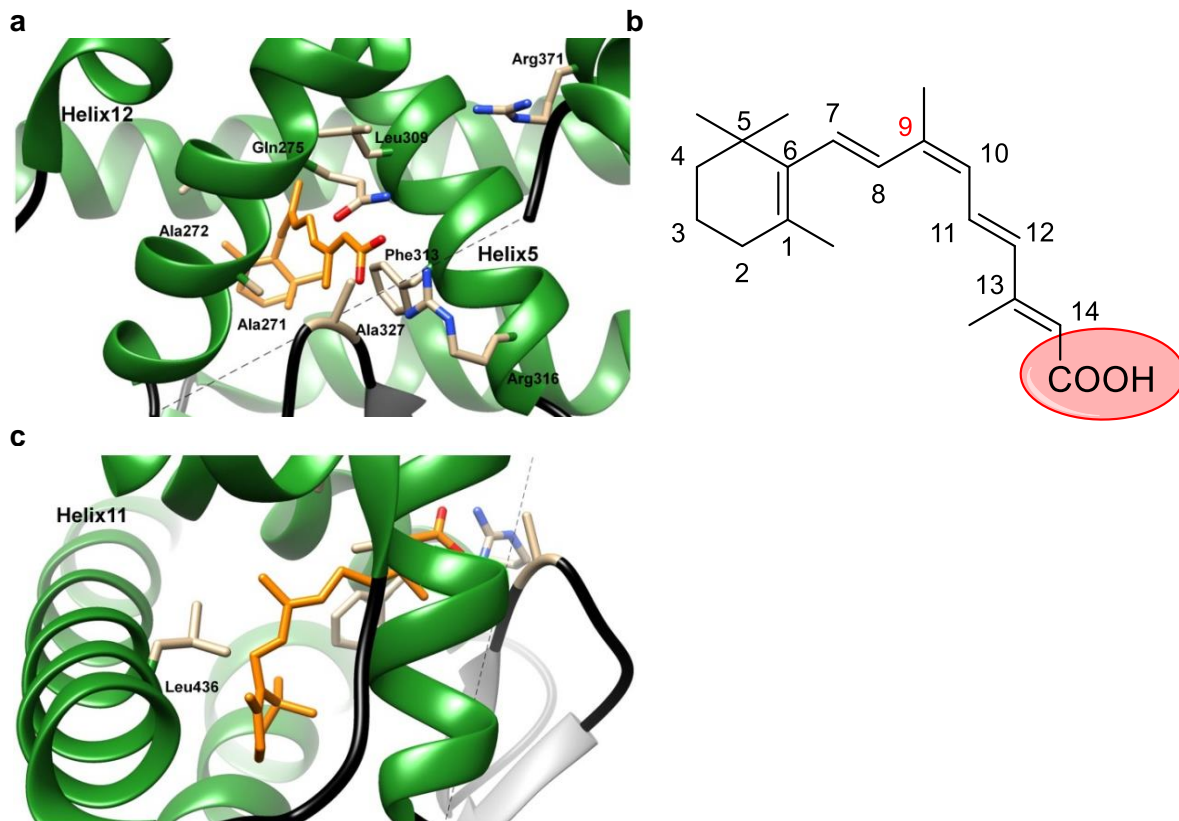
#### 1.4.4 Ligandenbindung



**Abbildung 18: LBD von RXR $\alpha$  (PDB: 5Z12). Die LBD der verschiedenen RXR-Subtypen ist nahezu identisch und besteht aus 12 Helices<sup>26</sup>.**

Die dreilagige, *sandwichartige* LBD der RXRs besteht aus insgesamt 12 Helices, wobei Helix 4, 5, 8, 9 und 11 von der einen Seite durch Helix 1-3 und von der anderen Seite durch Helix 6, 7 und 10 flankiert werden. Helix 2 stellt eine lange schleifenartige Verbindung zwischen Helix 1 und 3 dar (Abbildung 18)<sup>26</sup>. Die Besonderheit der Helix 12 bei den RXRs liegt darin, dass sie abhängig vom Heterodimer-Partner verschiedene Konformationen einnehmen kann<sup>33,415,416</sup>. Dabei spielen vor allem die Aminosäuren Phe450, Glu453 und Glu456 (RXR $\alpha$ ) eine elementare Rolle, die auch essentiell für die Bindung von Coaktivatoren sind<sup>515,516</sup>. Die Dimerisierungs-Oberfläche wird vor allem durch Helix 10, aber auch Helix 9 und der Schleife zwischen Helix 8 und 9 gebildet<sup>26,517,518</sup>. Mutationen an Tyr402 ergaben, dass diese Aminosäure essentiell für die Bildung von Heterodimeren ist<sup>519</sup>. Außerdem konnte belegt werden, dass bei permissiven Heterodimeren eine RXR-Ligandenbindung ebenfalls Einfluss auf die Konformation der Helix 12 des Heterodimer-Partners hat. Meist ist eine Änderung der Konformation von Helix 7 der RXR-LBD dafür verantwortlich<sup>393</sup>.

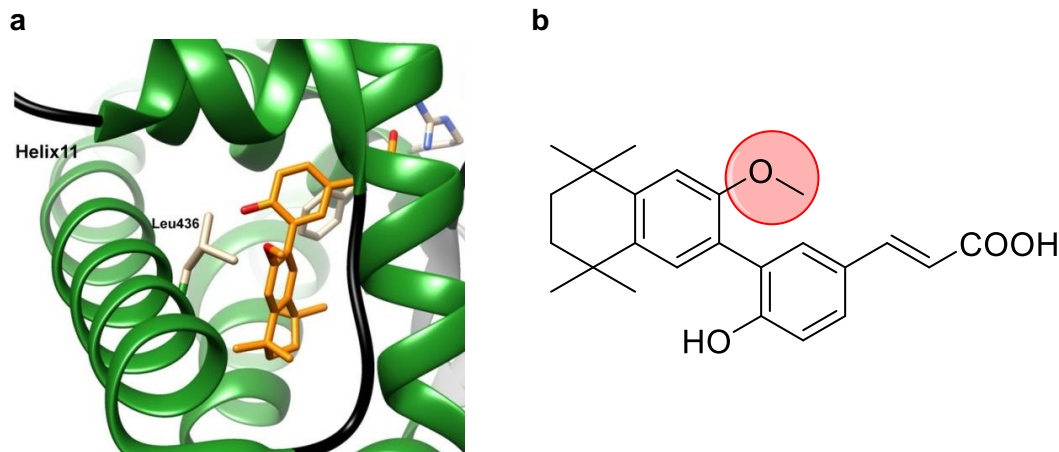
Die Ligandenbindungstasche der RXRs ist im Vergleich zu der Ligandenbindungstasche der PPARs und anderer nukleärer Rezeptoren relativ klein und fasst ein Volumen von etwa 400–500 Å<sup>3</sup>. Liganden wie die 9-cis-Retinsäure (**9**) füllen die Ligandenbindungstasche fast vollständig aus<sup>393</sup>.



**Abbildung 19: (a) Die Interaktion der 9-cis-Retinsäure (9) mit der Bindungstasche von RXR $\alpha$ . (b) Strukturformel der 9-cis-Retinsäure (9). (c) L-Konfiguration durch Interaktion mit Leu436 (PDB: 5Z12)<sup>515</sup>.**

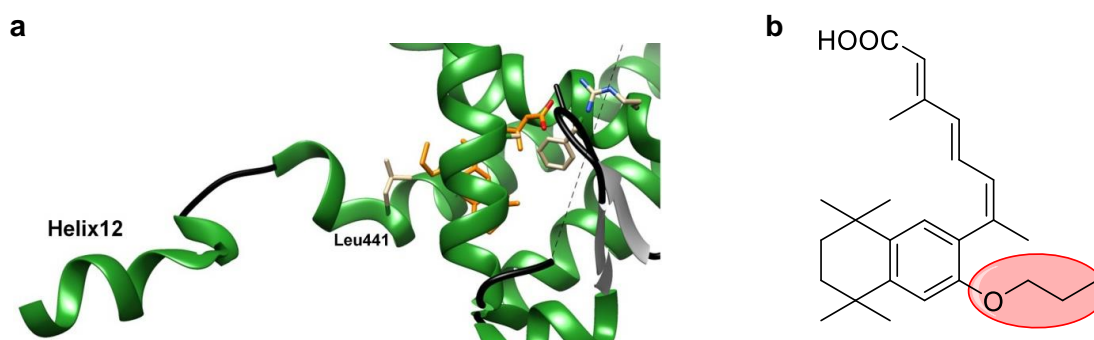
Die Ligandenbindungstasche ist zwischen den einzelnen RXR-Subtypen hoch konserviert. Sie wird geformt durch die Helices 3, 8, 9 und 11, sowie der Schleife zwischen Helix 8 und 9<sup>515</sup>. Durch die Ligandenbindung kommt es zu Konformationsänderung der Helices 3, 6, 11 und 12. Die Helix 11 rotiert dabei um etwa 180° um die eigene Achse<sup>515</sup>. Die Bindungstasche besteht fast ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren. Liganden-Interaktionen werden daher vorwiegend über van-der-Waals-Kräfte vermittelt. Polare Interaktionen gehen RXR-Liganden meist nur mit der Aminosäure Arg316 der Helix 5 (RXR $\alpha$ ) ein<sup>475,520–522</sup>. Deshalb bestimmen hauptsächlich lipophile Interaktionen und die Geometrie des Liganden den Bindungsmodus. Meist besitzen die RXR-Liganden eine typische L-förmige Konformation. Auch die 9-cis-Retinsäure (9) nimmt eine L-förmige Konformation ein. Ursache dafür ist vor allem die Interaktion mit der Aminosäure Leu436 in Helix 11 (RXR $\alpha$ ) (Abbildung 19). Die 9-cis-Retinsäure (9) ist ein potenzieller endogener RXR-Ligand und zeichnet sich durch einen charakteristischen Bindungsmodus aus. Die 9-cis-Retinsäure (9) wird von Helix 12 und Helix 5 flankiert. Die Carboxyl-Gruppe ist umgeben von den Aminosäuren Phe313, Ala271 und Ala272, die einen hydrophoben Tunnel bilden. Phe313 nimmt zudem eine Schlüsselrolle bei der Interaktion mit den Isopren-Gruppen C11-C14 ein. Die Interaktion von Arg316 mit der Carboxyl-Gruppe ähnelt der Interaktion der all-trans-Retinsäure mit der Bindungstasche der

RARs. Diese Bindung ist die einzige direkte polare Wasserstoffbrücken-Bindung des Liganden mit der Bindungstasche. Jedoch können über ein Wassermolekül-Netzwerk weitere Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Mit der Carbonyl-Gruppe von Leu309 und den Seitenketten von Gln275 und Arg371, sowie mit der Amid-Gruppe von Ala327 kommt es zu weiteren polaren Interaktionen mit der Bindungstasche (Abbildung 19a)<sup>515</sup>.



**Abbildung 20: Interaktion von Partialagonisten mit der RXR $\alpha$  Bindungstasche. (a) Konfigurationsänderung von Leu436 führt zu einer Destabilisierung von Helix 12 (PDB: 2P1T). (b) Die Methoxy-Gruppe des CD3254 Derivats UVI3007 (64) beeinträchtigt die Leu436 Konfiguration<sup>523,524</sup>.**

Partialagonisten, wie z.B. das Alkoxy-Derivat von CD3254 UVI3007 (64), verändern die Konfiguration von Leu436 (RXR $\alpha$ ). Durch die Methoxy-Gruppe kommt es zu einer sterischen Hinderung der Leu436 Konfiguration. Die Helix 12 kann daher nicht die typische Holo-Konformation einnehmen und die Interaktion mit Coaktivatoren wird beeinträchtigt (Abbildung20)<sup>523,524</sup>.

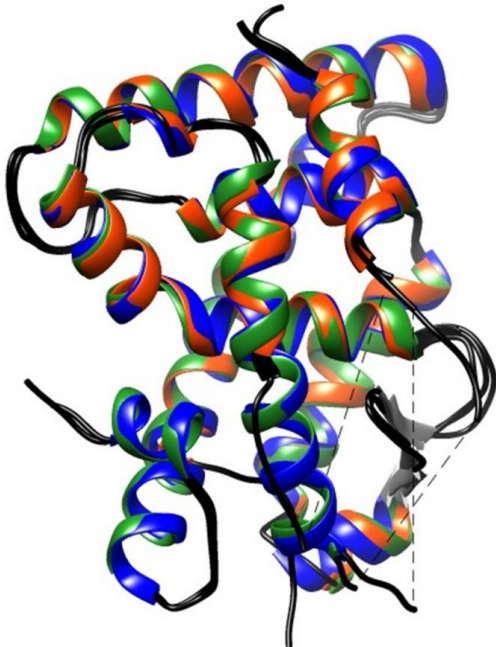


**Abbildung 21: Interaktion von Antagonisten mit der RXR $\alpha$  Bindungstasche. (a) Die sterische Hinderung von Leu441 verhindert eine Konformationsänderung der Helix 12 (PDB: 3A9E). (b) Die Propoxy-Gruppe von LG100754 (65) ist für die sterische Hinderung verantwortlich<sup>525</sup>.**

RXR Antagonisten, wie LG100754 (65) verhindern die Konformationsänderung der Helix 12 vollständig. Dabei ist vor allem die Interaktion des Antagonisten mit Leu441 von Bedeutung.



Durch die sterische Hinderung der Propoxy-Gruppe, kann Leu441 (RXR $\alpha$ ) keine Konformationsänderung vollziehen und die Helix 12 bleibt in der inaktiven Konformation (Abbildung 21)<sup>525</sup>.

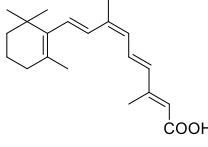
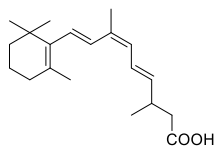
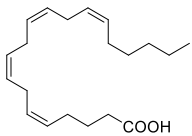
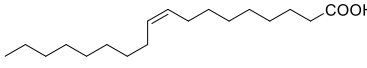
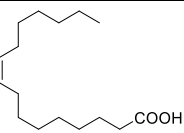


**Abbildung 22: Vergleich der Isoformen RXR $\alpha$  (grün, PDB: 5Z12), RXR $\beta$  (blau, PDB: 1UHL) und RXR $\gamma$  (orange, PDB: 2GL8)<sup>464,526,527</sup>.**

Da alle Aminosäuren der LBD der drei verschiedenen Subtypen von RXR identisch sind<sup>464,526,527</sup>, ging man lange davon aus, dass eine Etablierung subtypen-selektiver Substanzen nicht möglich sei<sup>37,528</sup>. Jedoch konnte 2018 nachgewiesen werden, dass der Naturstoff Valerensäure (**66**) ein RXR $\beta$  selektiver Agonist ist<sup>529</sup>. Da es aber noch keine Röntgenkristall-Untersuchungen des Bindungsmodus von Valerensäure (**66**) mit den verschiedenen RXR-Subtypen gegeben hat, ist die genaue strukturelle Ursache der Subtypen-Selektivität noch unklar. Es wird vermutet, dass Subtypen-Selektivität durch die Interaktion mit der Sekundärschicht des jeweiligen RXR-Proteins erreicht werden kann. Diese Sekundärschicht scheint bei den verschiedenen Subtypen unterschiedlich flexibel zu sein und bietet daher Raum um Selektivität zu ermöglichen<sup>528</sup>.

## 1.4.5 Endogene Liganden der RXRs und deren pharmakologische Bedeutung

Tabelle 11: endogene Liganden der RXRs.

endogener Ligand		Bindungs-Affinität RXR( $EC_{50}$ )	Testsystem
<b>9-cis Retinsäure (9)</b>		Alle Subtypen: $EC_{50} = 140 - 200 \text{ nM}$  $RXR\alpha: K_D = 20 \pm 10 \text{ nM}$  $RXR\alpha: K_D = 9,5 \text{ nM}$  $RXR\alpha: K_D = 11,7 \text{ nM}$	Luciferase-Reportergen Assay (CV-1) <sup>530</sup>  Fluoreszenzlöschungs-Assay <sup>531</sup>  Radioligand-Bindungsassay (COS-1) <sup>439</sup>  Radioligand-Bindungsassay (SF21) <sup>437</sup>
<b>9-cis-13,14-Dihydro-Retinsäure (9-CDHRA, 67)</b>		$RXR\alpha: K_D = 90 \pm 20 \text{ nM}$	Fluoreszenzlöschungs-Assay <sup>531</sup>
<b>Arachidonsäure (68)</b>		$EC_{50} = 5 - 10 \mu\text{M}$  $EC_{50} = 63 \mu\text{M}$  $RXR\gamma: K_i = 6,5 \mu\text{M}$	Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>532</sup>  Luciferase-Reportergen Assay (COS-1) <sup>533</sup>  Radioligand-Bindungsassay <sup>533</sup>
<b>Ölsäure (69)</b>		$EC_{50} = 82 \mu\text{M}$  $RXR\gamma: K_i = 5,1 \mu\text{M}$	Luciferase-Reportergen Assay (COS-1) <sup>533</sup>  Radioligand-Bindungsassay <sup>533</sup>
<b>Palmitoleinsäure (70)</b>		$EC_{50} = 53 \mu\text{M}$	Luciferase-Reportergen Assay (COS-1) <sup>533</sup>

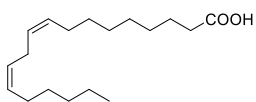
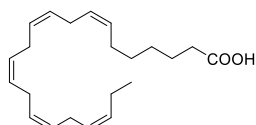
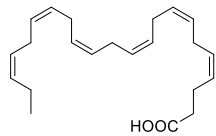
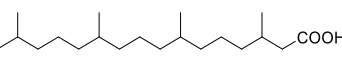
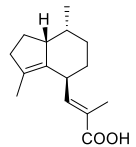
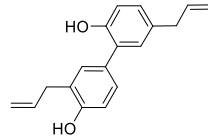
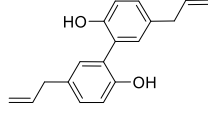
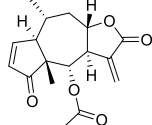
Bis heute konnte kein endogener RXR Ligand zweifelsfrei detektiert werden. Häufig wird die 9-cis-Retinsäure (9) als endogener Ligand postuliert<sup>412,437</sup>. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert. Bei der 9-cis-Retinsäure (9) handelt es sich zwar um einen hoch potenten RXR Agonisten, aber die Quantifizierung des Liganden im menschlichen Körper lässt an dessen physiologischer Bedeutung zweifeln<sup>534,535</sup>. Bisher ist unklar, ob die 9-cis-Retinsäure (9) im menschlichen Körper überhaupt existent ist oder nur in geringen, physiologisch wahrscheinlich nicht relevanten Konzentrationen zu finden ist<sup>536</sup>. Die 9-cis-Retinsäure (9) ist zudem kein selektiver RXR Agonist<sup>537</sup>, sondern kann auf Grund seiner flexiblen L-Konformation auch die RARs binden und aktivieren<sup>538</sup>.

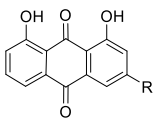
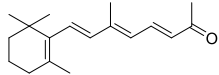
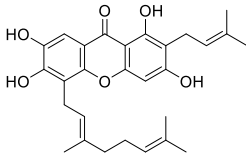
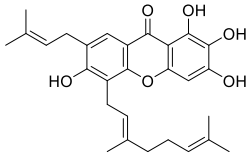
Neben der 9-cis-Retinsäure (**9**) wurden auch dessen Dihydro-Derivat, die 9-cis-13,14-Dihydro-Retinsäure (9-CDHRA, **67**) und einige ungesättigte Fettsäuren, wie die Arachidonsäure (**68**), die Ölsäure (**69**) und die Palmitoleinsäure (**70**), als endogene Liganden postuliert<sup>531,539</sup>.

9-CDHRA (**67**) scheint zwar physiologisch relevante Gewebespiegel zu erreichen, jedoch sind deren genaue Biosynthese und Gewebespezifität noch unbekannt<sup>531</sup>. Die ungesättigten Fettsäuren sind im menschlichen Körper nachweisbar, jedoch besitzen sie nur eine geringe Potenz an den RXRs. Die endogenen Konzentrationen reichen daher wahrscheinlich nicht aus, um tatsächlich einen physiologischen Effekt über RXR zu vermitteln. Während die Ölsäure (**69**) beispielsweise einen EC<sub>50</sub>-Wert von etwa 80 µM besitzt, sind die Konzentrationen in RXR reichen Kompartimenten wie Herz und Hoden um ein 10-faches niedriger<sup>533</sup>. Auch die Arachidonsäure (**68**) kommt in Herz und Hoden nur in Konzentrationen um etwa 2 µM vor und erreicht damit wahrscheinlich keinen physiologisch relevanten Bereich<sup>532,533</sup>. Gleiches gilt für die Palmitoleinsäure (**70**)<sup>533</sup>.

## 1.4.6 Natürliche Liganden der RXRs und deren pharmakologische Bedeutung

Tabelle 12: natürliche Liganden der RXRs.

natürlicher Ligand		Bindungs-Affinität RXR( $EC_{50}/IC_{50}$ )	Testsystem
<b>Linolsäure (71)</b>		$EC_{50} = 51 \mu M$  RXR $\gamma$ : $K_i = 2,6 \mu M$	Luciferase-Reportergen Assay (COS-1) <sup>533</sup>  Radioligand-Bindungsassay <sup>533</sup>
<b>Docosa-pentaensäure (DPA, 72)</b>		$EC_{50} = 20 \mu M$  RXR $\gamma$ : $K_i = 1,5 \mu M$	Luciferase-Reportergen Assay (COS-1) <sup>533</sup>  Radioligand-Bindungsassay <sup>533</sup>
<b>Docosa-hexaensäure (DHA, 73)</b>		RXR $\alpha$ : $EC_{50} = 5 - 10 \mu M$  $EC_{50} = 66 \mu M$  RXR $\gamma$ : $K_i = 2,5 \mu M$	Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>532</sup>  Luciferase-Reportergen Assay (COS-1) <sup>533</sup>  Radioligand-Bindungsassay <sup>533</sup>
<b>Phytansäure (74)</b>		RXR $\alpha$ : $EC_{50} = 15 \mu M$  RXR $\alpha$ : $K_i = 4,4 \pm 0,7 \text{ nM}$ RXR $\beta$ : $K_i = 4,1 \pm 0,2 \text{ nM}$ RXR $\gamma$ : $K_i = 3,6 \pm 0,7 \text{ nM}$	Luciferase-Reportergen Assay (CHO KI) <sup>540</sup>  Bindungsassay (in Konkurrenz mit 9-cis-Retinsäure (9), Sf21)
<b>Valerensäure (66)</b>		RXR $\alpha$ : $EC_{50} = 27 \mu M$ (fold-Aktivierung: 9) RXR $\beta$ : $EC_{50} = 5 \mu M$ (fold-Aktivierung: 69) RXR $\gamma$ : $EC_{50} = 43 \mu M$ (fold-Aktivierung: 4)	Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>529</sup>
<b>Honokinol (75)</b>		RXR $\alpha$ : $EC_{50} = 11,8 \mu M$	Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>541</sup>
<b>Magnolol (76)</b>		RXR $\alpha$ : $EC_{50} = 10,4 \mu M$	Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>542</sup>
<b>Bigelovin (77)</b>		RXR $\alpha$ : $EC_{50} = 4,9 \mu M$	Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>543</sup>

natürlicher Ligand		Bindungs-Affinität RXR(EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )	Testsystem
<b>Danthron (R = H, 78)</b> <b>Rhein (R = COOH, 79)</b>		RXR-Antagonisten <b>Danthron (78)</b> RXRα: IC <sub>50</sub> = 0,11 μM RXRα: K <sub>D</sub> = 6,2 μM  <b>Rhein (79):</b> RXRα: IC <sub>50</sub> = 0,75 μM	Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>544</sup> Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) <sup>544</sup>  Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T) <sup>545</sup>
<b>β-apo-13-Carotinon (80)</b>		RXR-Antagonist kein IC <sub>50</sub> bekannt	-
<b>Cochinchinon B (CF31, 81)</b>		tRXR-Antagonist RXRα: IC <sub>50</sub> = 9,6 μM	Radioligand-Bindungsassay <sup>512</sup>
<b>Prunifloron Q (CF26, 82)</b>		tRXR-Antagonist RXRα: IC <sub>50</sub> ~ 10 μM	Luciferase-Reportergen Assay (CV-1) <sup>512</sup>

Neben den potenziellen endogenen Liganden, gibt es auch zahlreiche RXR Liganden, die natürlich in einigen Tier- und Pflanzenarten vorkommen. Die essentielle Linolsäure (**71**) beispielsweise ist in der Lage nukleäre Rezeptoren, unter anderem auch RXR, zu aktivieren. Die Linolsäure (**71**) kommt vor allem in pflanzlichen Ölen vor<sup>453,533</sup>. RXR Agonisten können aber auch aus tierischem Material isoliert werden. Omega-3-Fettsäuren, wie die Docosahexaensäure (DHA, **73**) oder die Docosapentaensäure (DPA, **72**) werden z.B. aus Fischöl gewonnen und reichern sich vor allem im menschlichen Gehirn an<sup>546-548</sup>. Besonders DHA (**73**) ist für die Entwicklung des Gehirns von Bedeutung<sup>453,549</sup>.

Pflanzeninhaltsstoffe, wie Isoprenoide, aktivieren ebenfalls RXR<sup>550</sup>. Die Phytansäure (**74**) ist z.B. ein natürlicher hoch potenter RXR Agonist mit Isoprenoid-Struktur, der aber auch PPARs aktiviert<sup>551</sup>. Phytansäure (**74**) wird durch den Abbau von Phytol, einem Bestandteil des Chlorophylls, generiert. Es wird vermutet, dass vor allem die Transaktivierung des RXR-Homodimers durch die Bindung der Phytansäure (**74**) stimuliert wird<sup>540</sup>. Das Analogon der Phytansäure (**74**), die Phytensäure, ist ebenfalls in der Lage RXR zu binden. Jedoch ist nur das Derivat mit E-Konfiguration in der Lage den Rezeptor zu aktivieren. Phytol und das gesättigte Phytol-Derivat, die Pristansäure, sind hingegen inaktiv<sup>540</sup>. Die Relevanz der RXR Aktivierung durch die Phytansäure (**74**) ist allerdings fraglich, da es zu einer sehr schnellen Eliminierung des Pflanzeninhaltsstoffes kommt und die *in vivo* Konzentration daher nur sehr gering ist<sup>548</sup>.

Die Valerensäure (**66**), ein Inhaltsstoff von *Valeriana officinalis*, ist in der Lage RXR $\beta$  selektiv zu aktivieren. Damit ist dieser Pflanzeninhaltsstoff der bisher einzige postulierte subtypenselektive Vertreter der RXR-Liganden<sup>529</sup>.

Des Weiteren können die Inhaltsstoffe aus der *Magnolia obovata*, das Honokinol (**75**)<sup>541</sup> und das Magnolol (**76**)<sup>542</sup>, RXR aktivieren. Honokinol (**75**) stimuliert vor allem die Transaktivierung des LXR/RXR-Heterodimers, während Magnolol (**76**), das auch in der *Magnolia officinalis* vorkommt, vor allem das PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer und zudem auch PPAR $\gamma$  selbst aktiviert. Honokinol (**75**) und Magnolol (**76**) sind RXR-Liganden ohne Carboxyl-Funktion. Röntgenkristall-Untersuchungen ergaben, dass Magnolol (**76**) einen anderen Bindungsmodus im Vergleich zu RXR-Liganden mit Carboxyl-Gruppe besitzt und vor allem mit der Aminosäure Asn306 in Helix 5 über Wasserstoffbrücken interagiert. RXR-Liganden mit Carboxyl-Gruppe interagieren dagegen hauptsächlich mit Arg316<sup>542</sup>.

Auch Sesquiterpene, die zu den Isoprenoiden zählen, wie z.B. Bigelovin (**77**), aktivieren RXR. Bigelovin (**77**) wird aus der *Inula huphensis* isoliert und induziert vor allem die Transaktivierung des PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimers. Das RXR-Homodimer wird allerdings nicht aktiviert. Bigelovin (**77**) besitzt ebenfalls keine Carboxyl-Funktion und bindet wie Magnolol (**76**) mit einem anderen Bindungsmodus die RXR-Ligandenbindungstasche. Bigelovin (**77**) interagiert nicht direkt mit der Helix 12, sondern vor allem über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Helix 3, 5, 7 und 10<sup>543</sup>.

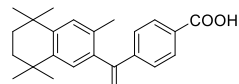
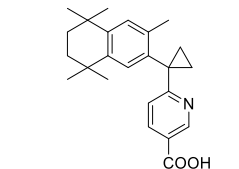
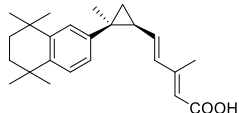
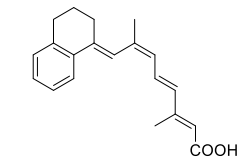
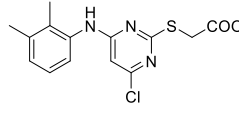
Zudem existieren auch natürliche RXR-Antagonisten, wie Danthron (**78**) und dessen Carbonsäure-Derivat Rhein (**79**). Danthron (**78**) kommt in verschiedenen Aloearten vor, während Rhein (**79**) aus der Rhabarber-Wurzel extrahiert werden kann. Beide Derivate stabilisieren das RXR Homotetramer und verhindern so die Transaktivierung<sup>544</sup>.

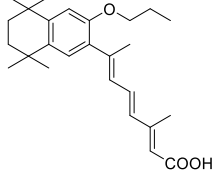
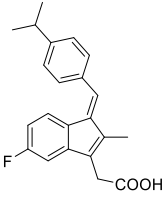
Auch  $\beta$ -apo-13-Carotinon (**80**) ist ein RXR Antagonist. Das  $\beta$ -Carotin-Derivat entfaltet seine antagonistische Wirkung, wie Danthron (**78**) und Rhein (**79**), durch die Homotetramer-Bildung<sup>552</sup>. Wahrscheinlich interagiert  $\beta$ -apo-13-Carotinon (**80**) mit der Helix 11 und führt so zur Induktion der Homotetramer-Bildung ohne die Konformation der Helix 12 zu beeinflussen<sup>408</sup>.

Potente RXR Antagonisten sind auch Cochinchinon B (CF31, **81**) und Prunifloron (CF26, **82**). Beide Xanthone werden aus *Cratoxylum formosum* ssp. *Pruniflorum* isoliert. Sie sind vermutlich in der Lage mit der Helix 12 der RXR-LBD zu interagieren und die inaktive Konformation zu stabilisieren<sup>512</sup>. Da sie auch den verkürzten tRXR binden und inhibieren besitzen Cochinchinon B (CF31, **81**) und Prunifloron (CF26, **82**) antiapoptotische Effekte, die über den PI3K/Akt Signalweg vermittelt werden<sup>512,513</sup>.

## 1.4.7 Synthetische Liganden der RXRs und deren pharmakologische Bedeutung

Tabelle 13: synthetische Liganden der RXRs.

synthetischer Ligand	Bindungs-Affinität	Physiologische Effekte	Indikation/ Status der klinischen Studie
<b>Bexaroten (LGD1069, 8)</b> 	$EC_{50} = 20 - 28$ $nM$ <sup>530</sup>	<p>Apoptose von Tumorzellen</p>	<p>Chemotherapeutikum: → zugelassen beim kutanen T-Zell-Lymphom klinische Studien auch bei anderer Tumorarten<sup>553-555</sup>: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, akute myeloische Leukämie, Brustkrebs, Schilddrüsentumore, Melanome</p>
<b>LG100268 (83)</b> 	$EC_{50} = 3 - 4$ $nM$ <sup>530</sup>	<p>aktiviert vor allem die Heterodimere LXR/RXR und PPAR<math>\gamma</math>/RXR<sup>526,557</sup> → weniger Nebenwirkungen durch RXR Selektivität</p>	<p>keine Vorteile bei der Tumorthherapie im Vergleich zu Bexaroten (8)<sup>521</sup></p>
<b>IRX4204 (NRX 194204, 84)</b> 	<p>RXR<math>\alpha</math>:<sup>558</sup>  <math>EC_{50} = 0,8</math> nM  <math>K_D = 0,4</math> nM  RXR<math>\beta</math>:  <math>EC_{50} = 0,47</math> nM  <math>K_D = 3,6</math> nM  RXR<math>\gamma</math>:  <math>EC_{50} = 0,09</math> nM  <math>K_D = 3,8</math> nM</p>	<p>Rexinoid der 2. Generation → hoch potent, RXR-Selektivität erhöht → weniger RAR vermittelte Nebenwirkungen</p> <p>selektiver Aktivator des RXR/Nurr1-Heterodimers → Parkinson</p> <p>Remyelinisierung</p>	<p>in Kombination mit Erlotinib: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom → Phase 1</p> <p>Monotherapie bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom → Phase 2</p> <p>Parkinson → Phase 1</p> <p>in Kombination mit T4 (1) zur Remyelinisierung → MS, Alzheimer<sup>514</sup></p>
<b>9cUAB30 (85)</b> 	<p>RXR<math>\alpha</math>:<sup>559,560</sup>  <math>EC_{50} = 820 \pm 70</math> nM  <math>K_D = 33 \pm 5</math> nM</p>	<p>Apoptose-Induktion, reduzierte Zellproliferation<sup>561,562</sup></p>	<p>Brustkrebs (frühes Stadium und invasive Brustkrebstumore): → Phase 1 (Probanden werden rekrutiert)</p>
<b>Wy14,643 (86)</b> 	<p>RXR<math>\alpha</math>:<sup>563</sup>  <math>EC_{50} = 9,1 \pm 0,1</math> <math>\mu M</math>  RXR<math>\beta</math>:  <math>EC_{50} = 13 \pm 1</math> <math>\mu M</math>  RXR<math>\gamma</math>:  <math>EC_{50} = 31 \pm 1</math> <math>\mu M</math></p>	<p>Agonist der PPARs und RXR: pleiotrope Effekte: u.a. lipidsenkende Eigenschaften, reduziert <math>\beta</math>-Amyloid-Plaques</p>	<p>Tierstudien: u.a. Alzheimer- und Multiple Sklerose-Modelle</p>

synthetischer Ligand		Bindungs-Affinität	Physiologische Effekte	Indikation/ Status der klinischen Studie
<b>LG100754 (65)</b>		RXR Antagonist: <sup>564</sup> RXR $\alpha$ : K <sub>D</sub> = 8 nM RXR $\beta$ : K <sub>D</sub> = 9 nM RXR $\gamma$ : K <sub>D</sub> = 14 nM	erster RXR Antagonist <sup>564</sup> → inhibiert RXR-Homodimer Aktivierung → stimuliert PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer → keinen Einfluss auf: LXR/RXR, FXR/RXR und NGFIb/RXR <sup>526,557</sup>	bisher keine klinischen Studien
<b>TX803 (87)</b>		nicht bekannt	Antagonist des tRXR <sup>512</sup> → Apoptose von Tumorzellen $\uparrow$	patentiert zur Behandlung verschiedener Krebsarten <sup>565</sup>

RXR Liganden besitzen zahlreiche pleiotrope Effekte und modulieren daher eine Vielzahl an Signalwegen. Die pleiotropen Effekte, die z.T. eine entgegengesetzte Wirkung haben, sind sehr komplex und verhindern bisher die breite Etablierung von RXR als Zielstruktur für Arzneistoffe, ausgenommen von schwerwiegenden Erkrankungen, wie z.B. der Therapie verschiedener Krebsarten<sup>20,40,389–395</sup>.

Die bisher bekanntesten synthetische RXR Modulatoren, die auch schon in klinischen Studien getestet wurden, sind Bexaroten (LGD1069, **8**), LG100268 (**83**), IRX4204 (bzw. NRX 194204, **84**) und 9cUAB30 (**85**)<sup>514,520,566–568</sup>. Bexaroten (**8**) wird als Chemotherapeutikum beim kutanen T-Zell-Lymphom verwendet und ist unter dem Namen Targretin® im Handel<sup>569</sup>. Bexaroten (**8**) wurde auch zur Behandlung anderer Tumorarten in klinischen Studien getestet. Unter anderem ergaben sich vielversprechende Ergebnisse für die Therapie von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, akuter myeloischer Leukämie, Brustkrebs, Schilddrüsentumoren und Melanomen<sup>553–555</sup>. Neben der pro-apoptotischen Wirkung von Bexaroten (**8**), ist das Retinoid auch in der Lage die ApoE Spiegel im zentralen Nervensystem zu erhöhen. Erhöhte ApoE-Spiegel werden mit einer Auflösung von  $\beta$ -Amyloid-Plaques, die bei Alzheimer auftreten, assoziiert. Klinische Studien scheiterten bisher jedoch, was z.T. auf die schlechte Blut-Hirn-Gängigkeit von Bexaroten (**8**) zurückzuführen ist<sup>498,556</sup>.

LG100268 (**83**) ist wesentlich selektiver als Bexaroten (**8**) und aktiviert vor allem die Heterodimere LXR/RXR und PPAR $\gamma$ /RXR<sup>526,557</sup>. Durch eine erhöhte RXR-Selektivität, sollte das Nebenwirkungsprofil verbessert werden, jedoch ergaben sich keine Vorteile bei der Tumorthherapie im Vergleich zu Bexaroten (**8**)<sup>521</sup>.



IRX4204 (bzw. NRX 194204, **84**) ist ein Rexinoid der 2. Generation und damit wesentlich potenter und RXR-selektiver als vorangegangene RXR Agonisten. Außerdem wird durch IRX4204 (**84**) selektiv das RXR/Nurr1-Heterodimer stimuliert. RXR/Nurr1 soll vor allem bei Parkinson eine Rolle spielen. Neben Parkinson, werden derzeit auch klinische Studien für den Einsatz von IRX4204 (**84**) bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen durchgeführt. Dabei wird die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Kombinationstherapie mit dem Thyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib und der Monotherapie untersucht. Einige Tierstudien weisen zudem darauf hin, dass IRX4204 (**84**) in der Lage ist zur Remyelinisierung von Nervenzellen beizutragen. Eine Kombinationstherapie mit T4 (**1**) zeigte dabei vielversprechende Ergebnisse<sup>514</sup>.

Ein weiteres Rexinoid, das derzeit in klinischen Studien getestet wird ist 9cUAB30 (**85**). Da 9cUAB30 (**85**) Apoptose induziert und die Zellproliferation reduziert, wird derzeit in einer Phase 1 Studie, die Verträglichkeit von 9cUAB30 (**85**) zur Behandlung von Brustkrebs untersucht<sup>561,562</sup>.

Wy14,643 (**86**) wird auch als Pirinixinsäure bezeichnet und galt lange als selektiver PPAR Agonist mit lipidsenkenden Eigenschaften. Jedoch zeichnet sich das pharmakologische Profil von Wy14,643 (**86**) durch viele pleiotrope Effekte aus, die vermuten ließen, dass die Substanz neben den PPARs weitere Rezeptoren moduliert. 2019 konnte nachgewiesen werden, dass Wy14,643 (**86**) ein potenter RXR Agonist ist und pleiotrope Effekte auf dieser Interaktion beruhen<sup>563,570</sup>. Wy14,643 (**86**) zeigte im Gegensatz zu selektiven PPAR-Modulatoren eine Wirksamkeit bei der Behandlung von Alzheimer. Die Substanz war in Tierstudien in der Lage die Menge an  $\beta$ -Amyloid-Plaques zu reduzieren und auch die Prognose einer Multiplen Sklerose verbesserte sich nach Applikation von Wy14,643 (**86**) im Tiermodell. Wy14,643 (**86**) inhibiert die NO-Produktion und die Sekretion von proinflammatorischen Cytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-12 p40 durch aktivierte Mikroglia-Zellen im ZNS. Mikrogliazellen gehören zum zellulären Immunsystem und sind unter anderem für die Phagozytose von Fremdkörpern und Zellfragmenten, sowie die Antigen-Präsentation zuständig. Viele neurodegenerative Erkrankungen, darunter auch Multiple Sklerose sind mit aktivierten Mikroglia-Zellen assoziiert, da NO, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die von Mikroglia-Zellen ausgeschüttet werden nicht nur gegen Pathogene wirksam sind, sondern auch toxisch auf Myelin-produzierende Oligodendrocyten und Neurone wirken<sup>571</sup>.

Rexinoide wurden ursprünglich auch für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 und für die Behandlung von Erkrankungen, die mit einer Insulinresistenz assoziiert werden, entwickelt<sup>516,520</sup>. Rexinoide zeigen ähnliche pharmakologische Effekte im Vergleich zu Glitazonen<sup>464,508,509</sup>. Dies spricht dafür, dass Rexinoide das PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer aktivieren. Die insulinsensitive Wirkung könnte jedoch auch auf der Aktivierung des RXR-Homodimers beruhen. RXR-Homodimere können das PPARE binden und so ihre Wirkung

entfalten. Jedoch konnte bisher kein Rexinoid zur Behandlung metabolischer Erkrankungen im Markt etabliert werden, da zahlreiche Nebenwirkungen während der Behandlung auftreten können. Rexinoide erhöhen Triglycerid-Spiegel<sup>507</sup>, inhibieren den negativen Rückkopplungs-Mechanismus der Thyroidhormone und induzieren eine Hepatomegalie<sup>516</sup>. Außerdem ist das Risiko für kardiale Erkrankungen durch die Einnahme von Rexinoiden erhöht. Bisher scheiterten daher alle Rexinoide in der klinischen Entwicklung zur Behandlung metabolischer Erkrankungen. Um das Nebenwirkungsprofil zu minimieren verfolgt man aktuell das Ziel, RXR-Liganden zu entwickeln, die selektiv bestimmte Heterodimere aktivieren. Eine selektive Aktivierung von LXR/RXR oder PPAR/RXR könnte zukünftig Grundlage für eine Etablierung von RXR Agonisten zur Behandlung metabolischer Krankheiten sein.

Zudem wurden auch einige RXR-selektive Antagonisten synthetisiert<sup>389,392,572,573</sup>. Bisher ist noch kein RXR Antagonist zugelassen, obwohl Tierstudien belegen, dass RXR Antagonisten sowohl bei Diabetes mellitus Typ 2<sup>456</sup> und auch bei Allergien<sup>574</sup> wirksam sein könnten.

LG100754 (**65**) war der erste synthetische RXR Antagonist<sup>564</sup>. Die antagonistische Wirkung beschränkt sich jedoch auf die RXR-Homodimer Aktivierung. Das PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer wird von LG100754 (**65**) sogar stimuliert, während die Heterodimere LXR/RXR, FXR/RXR und NGFIb/RXR nicht in ihrer Transaktivierungs-Aktivität beeinflusst werden<sup>526,557</sup>.

TX803 (**87**) ist ein weiterer RXR Antagonist, den Tarrex Biopharma Inc. 2017 patentieren lassen hat. Wie die natürlichen RXR Antagonisten Cochinchinon B (CF31, **81**) und Prunifloron (CF26, **82**) inhibiert TX803 (**87**) den verkürzten tRXR, der von Tumorzellen exprimiert wird und eine anti-apoptotische Wirkung hat. Somit hat TX803 (**87**) das Potential zukünftig Anwendung in der Tumor-Therapie zu finden und somit auch RXR Antagonisten auf dem Arzneistoff-Markt zu etablieren.

Durch die Modulation unterschiedlichster Heterodimere, sind die RXR-vermittelten physiologischen Effekte sehr komplex und bisher auch noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben der Modulation von Signalwegen durch Heterodimer-Aktivierung können die RXRs auch Homodimere bilden, die RXR-spezifische Effekte ausüben<sup>406</sup>. Diese pleiotropen Effekte führen dazu, dass RXR-Modulatoren ein großes Nebenwirkungs-Spektrum besitzen und bisher nur bei schwerwiegenden Erkrankungen zum Einsatz kommen<sup>20,40,388–395</sup>. Zukünftig könnten Heterodimer-selektive RXR Modulatoren mit geringerem Nebenwirkungs-Potential zum Einsatz kommen. Vor allem aber steht die Entwicklung RXR-Subtypen-selektiver Derivate im Mittelpunkt der Forschung. RXR $\gamma$  selektive Agonisten, könnten beispielsweise vielversprechende neue Arzneimittel für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen sein.

## 1.5 Thyroidhormone

Obwohl die Thyroidhormone schon lange und vielseitig untersucht wurden, gibt es immer noch einige offene Fragen. Es ist noch nicht abschließend geklärt welche Enzyme an der Thyronamin- und Iodthyroacetat-Bildung beteiligt sind<sup>575</sup>. Zum Teil sind noch nicht alle genomischen Wirkmechanismen auf molekularer Ebene bekannt und vor allem die nicht-genomischen Effekte sind noch nicht umfassend untersucht worden. Erst 2014 wurde ein Fragment des THR $\alpha$  entdeckt über das nicht-genomische Thyroidhormon-Effekte vermittelt werden können<sup>576</sup>. Auch der aktive Transport von T4 (**1**) und T3 (**2**) mittels Monocarboxylat Transportern (MCTs), OATs und L-Typ Aminosäure Transportern (LATs) wurde erst 2003 beobachtet<sup>577,578</sup>. Im Folgenden soll der aktuelle Wissenstand über die Bildung, den Metabolismus und die Wirkung der Thyroidhormone zusammengefasst werden.

### 1.5.1 Endogene Thyroidhormon-Derivate

Die bekanntesten Vertreter der Schilddrüsenhormone sind das L-Thyroxin (T4, **1**) und das Triiodthyronin (T3, **2**)<sup>152,153</sup>. Beide Derivate sind Liganden der THRs und besitzen pharmazeutische Relevanz. Vor allem bei der Therapie der Hypothyreose finden sowohl T4- als auch T3-Präparate Anwendung (siehe Kapitel 1.2.5)<sup>162,163</sup>. Neben diesen beiden Thyroidhormon-Derivaten konnten auch andere Metabolite von T4 (**1**) endogen detektiert werden. T4 (**1**) kann je nach Stoffwechsellage auch zu rT3 (**10**) deiodiert werden. Sowohl T3 (**2**) als auch rT3 (**10**) werden schnell abgebaut und sind im Serum nur in Konzentrationen im nanomolaren bis picomolaren Bereich zu finden<sup>579</sup>. Damit ist die Konzentration von T4 (**1**) im Serum etwa 100-fach höher als die von T3 (**2**) und rT3 (**10**). rT3 (**10**) und T3 (**2**) können weiter zu Diiodthyroninen deiodiert werden. Diese Deiodierung kann bis zum unsubstituierten Thyronin (T0) ablaufen. Die Deiodierung ist der Hauptabbauweg der Thyroidhormone. Es können jedoch auch sog. alternative Abbauege zu einer Metabolisierung von T4 (**1**) führen. Durch oxidative Deaminierung entstehen Iodthyroacetate und durch Decarboxylierung können Thyronamine gebildet werden. Bisher konnten jedoch nur die Iodthyroacetate TETRAC (**4**)<sup>575</sup> und TRIAC (**3**), sowie das Monoiod-substituierte und das vollständig deiodierte Thyronamin endogen nachgewiesen werden<sup>7,580</sup>. Die Serumspiegel der Iodthyroacetate<sup>581–583</sup> und der Thyronamine<sup>584,585</sup> liegen ebenfalls im nanomolaren Bereich, während Diiodthyronine<sup>586–589</sup> im Serum nur in picomolaren Konzentrationen vorliegen. Jedoch bleibt fraglich, wie aussagekräftig Thyroidhormon-Serumspiegel sind, da zum einen nur die freie Thyroidhormon-Konzentration und nicht zusätzlich der Anteil, der an thyroxinbindendes Präalbumin (Transthyretin) gebunden ist, gemessen wird. Zum anderen wird T4 (**1**) erst in die Zellen des Zielgewebes aufgenommen und dann metabolisiert. Somit

können Serumspiegel zwar gering sein, zellulär können die Thyroidhorm-Derivate aber akkumulieren und durchaus höhere Konzentrations-Level erreichen<sup>590-593</sup>.

**Tabelle 14: Serumkonzentrationen der Thyroidhormone.**

Thyroidhormon		Serumkonzentration
<b>T4 (1)</b>		113 nM <sup>579</sup>
<b>T3 (2)</b>		2,1 nM <sup>594</sup> 1,3 nM <sup>579</sup> 1,8 nM <sup>595</sup>
<b>rT3 (10)</b>		0,65 nM <sup>579</sup> 22 - 620 pM <sup>586,596</sup>
<b>3,3'-T2 (12)</b>		19 - 150 pM <sup>586</sup> 253 ± 29 pM <sup>587</sup>
<b>3,5-T2 (11)</b>		3,8 - 14 pM <sup>588</sup> 78 ± 9 pM <sup>587</sup>
<b>3',5'-T2 (88)</b>		30 - 170 pM <sup>589</sup>
<b>3-T1AM (89)</b>		66 nM <sup>584</sup> 14 nM <sup>585</sup>
<b>TETRAC (4)</b>		1,6 nM <sup>581</sup>
<b>TRIAC (3)</b>		0,03 - 0,14 nM <sup>582</sup> 0,24 nM <sup>583</sup>

## 1.5.2 Biosynthese und Transport von Thyroidhormonen

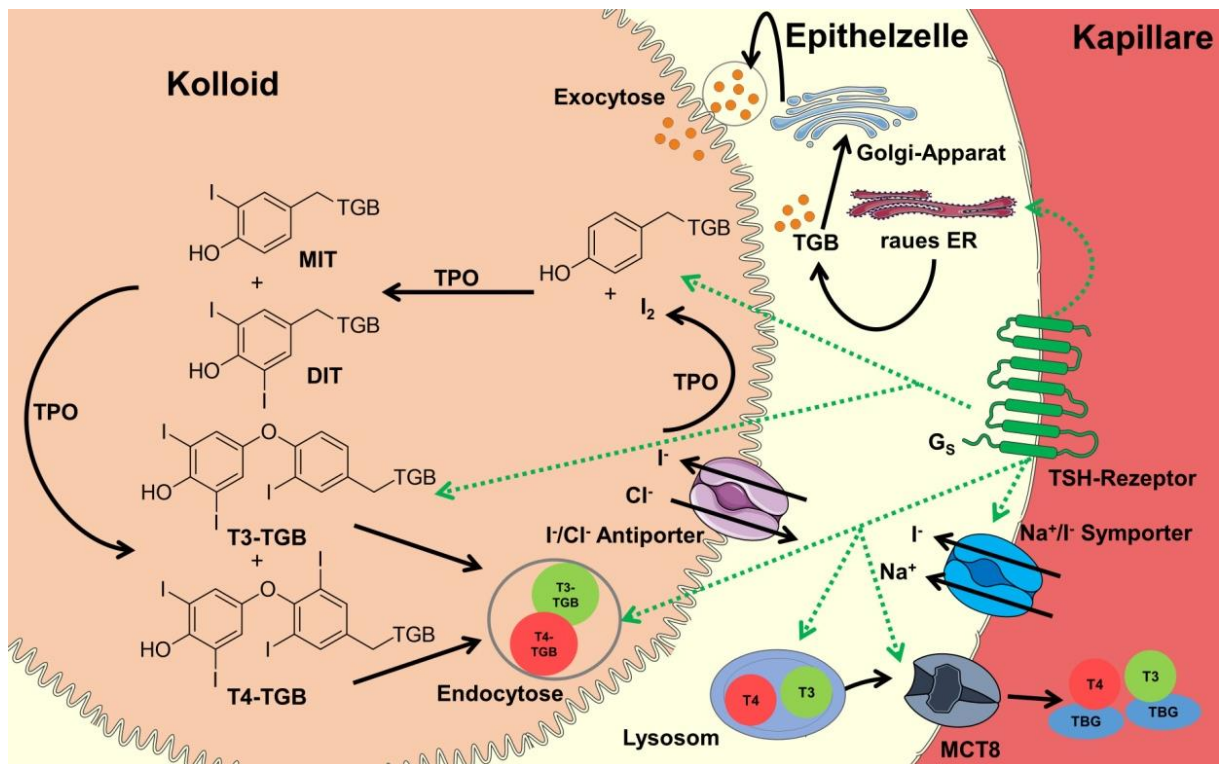


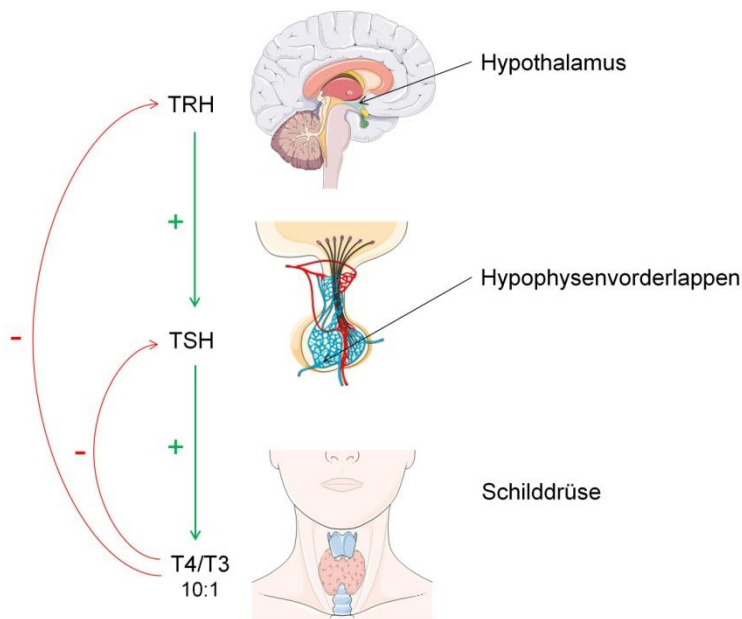
Abbildung 23: Biosynthese von Thyroidhormonen. Iodid gelangt über einen  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ -Symporter und einen  $\text{I}^-/\text{Cl}^-$ -Antiporter (Pendrin) in das Schilddrüsenkolloid und wird dort oxidiert und an Thyreoglobulin (TGB) substituiert. Durch Kopplung der entstandenen iodierten TGBs entsteht T3- und T4-TGB. Das TGB wird bei Bedarf lysosomal abgespalten und T3 (2) und T4 (1) werden über den MCT8 oder MCT10 in den Blutkreislauf abgegeben. Dort werden sie an thyroxinbindendes Präalbumin (Transthyretin, TBG) gebunden und an ihren Wirkort transportiert. TSH hat bei der Biosynthese einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ -Symporters, auf die Iod-Substitution des TGB, die Konjugation der iodierten TGBs, auf den Transport via Endocytose von T3-TGB bzw. T4-TGB zurück in das Epithel, die lysosomale Abspaltung des TGB und den Transport durch MCT8 oder MCT10 in den Blutkreislauf<sup>72,577,597-600</sup>.

Wenn vermehrt T4 (1) in den Blutkreislauf gelangen soll, wird über den G-Protein gekoppelten TSH Rezeptor der Schilddrüse die Biosynthese und Freisetzung der Thyroidhormone induziert (Abbildung 23). Essentiell für die Bildung von Schilddrüsenhormonen ist die Iodid-Aufnahme über einen aktiven Symporter, der Natrium-Ionen und Iodid aktiv vom Blut in das Epithel der Schilddrüsenfollikelzellen (Thyreozyten) transportiert. Dieser Prozess wird Iodination genannt<sup>597</sup>. Gleichzeitig wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) der Epithelzellen Thyreoglobulin (TGB) synthetisiert. Nach der Synthese wird das TGB im Golgi-Apparat in sekretorische Vesikel verpackt und gelangt über Exocytose in das Follikellumen, das auch als Kolloid bezeichnet wird. Das Iodid

wird mit Hilfe eines I<sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>-Antiporters (Pendrin) in das Kolloid transportiert und dort anschließend durch eine Thyreoperoxidase (TPO) zu Iod oxidiert. Das TGB ist ein Glykoprotein und enthält Tyrosin, das mit dem entstandenen Iod substituiert werden kann. Auch die Substitutions-Reaktion wird durch TPO katalysiert. Es entsteht 3-Moniodtyrosin (MIT), das wiederum zum Teil zu 3,5-Diiodytyrosin (DIT) iodiert wird. Dieser Prozess wird auch als Iodisation bezeichnet<sup>599</sup>. Durch eine Kopplungsreaktion zwischen einem Molekül MIT und DIT entsteht T3 (**2**) und aus zwei Molekülen DIT wird T4 (**1**) gebildet. T3 (**2**) und T4 (**1**) werden als TGB-Konjugate gespeichert. Bei Bedarf gelangen sie über Endocytose wieder in das Epithel der Thyreozyten und verschmelzen dort mit Lysosomen<sup>72,598</sup>. In den Lysosomen wird das TGB proteolytisch abgebaut. Verdauungsenzyme spalten die TGB-T4-, bzw TGB-T3-Bindung und freies T3 (**2**) und T4 (**1**) wird im Verhältnis 1:10 über die Transporter MCT8 oder MCT10 in das Blut abgegeben<sup>577</sup>. Dort binden die Thyroidhormone an ein Transportprotein, das thyroxinbindende Präalbumin (Transthyretin, TBG) und werden an ihre Wirkorte transportiert<sup>600</sup>.

TSH kann bei Bedarf an der basolateralen Membran an seinen G-Protein gekoppelten Rezeptor binden und stimuliert auf verschiedenen Wegen die Thyroidhormon-Produktion und Sekretion. Zum einen wird die Aktivität des Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-Symporters erhöht. Zum anderen wird die Iod-Substitution des TGB und Konjugation von MIT und DIT gefördert. Außerdem wird der Transport via Endocytose von T3-TGB und T4-TGB zurück in das Epithel stimuliert. Auch die Abspaltung des TGB und die Bildung von freiem T3 (**2**) und T4 (**1**) in den Lysosomen wird durch TSH unterstützt. Zudem wird der Transport durch MCT8 und MCT10 durch TSH gefördert<sup>601</sup>.

### 1.5.3 Die Thyroidhormon-Spiegel-Regulation



**Abbildung 24: Negativer Rückkopplungsmechanismus des Thyroidhormon-Systems.** Im Hypothalamus wird das Freisetzung-Hormon TRH sezerniert, welches die Ausschüttung des glandotropen Hormons TSH aus dem Hypophysenvorderlappen vermittelt. Die TSH-Stimulation wiederum führt in der Schilddrüse zur Freisetzung und Bildung der effektorischen Hormone T4 (1) und T3 (2) (Verhältnis 10:1). T4 (1) hat inhibitorische Effekte auf die TSH- und TRH-Ausschüttung<sup>602</sup>.

Endokrine Systeme verfügen über negative Rückkopplungsmechanismen. Entsprechend werden auch die Thyroidhormon-Spiegel über eine hypothalamisch-hypophysäre Schilddrüsen-Achse reguliert. Ziel ist es die Konzentration von T4 (1) weitestgehend konstant zu halten (Abbildung 24). Soll vermehrt T4 (1) in den Blutkreislauf gelangen, wird aus dem Hypothalamus TRH freigesetzt. TRH erreicht den Hypophysenvorderlappen über einen kleinen Pfortader-Kreislauf und stimuliert dort thyreotrope Zellen über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Die membranständige Adenylatcyclase wandelt daraufhin zelluläres ATP in cAMP um. Es kommt zu einer erhöhten cAMP Bildung und letztendlich zur Synthese und Ausschüttung von TSH. TSH stimuliert wiederum ebenfalls über einen G-Protein-gekoppelten TSH Rezeptor die Adenylatcyclase in der Membran der Schilddrüsenzellen (Thyreozyten). Die Thyroidhormon-Bildung und die Entleerung der Thyreoglobulin-Speicher werden daraufhin eingeleitet. T4 (1) und T3 (2) werden im Verhältnis 10:1 aus den Thyreozyten freigesetzt. Um die Thyroidhormon-Spiegel konstant zu halten, kommt es zur negativen Rückkopplung. Freies T4 (1), welches nicht gebunden an Transthyretin vorliegt, ist in der Lage die Produktion und Ausschüttung von TSH zu hemmen, sodass sich ein

Gleichgewichtsspiegel im Blut einstellt. Dabei bindet T4 (1) an THR in der Hypophyse, die wiederum in der Promotor-Region des TSH-Gens binden und für eine Transrepression sorgen. T3 (2) spielt bei der negativen Rückkopplung nur eine untergeordnete Rolle. Da T3 (2) hauptsächlich durch periphere Deiodierung gebildet wird und dies meist intrazellulär abläuft, spiegeln die Blutspiegel nicht den aktuellen Bedarf oder Überschuss an Thyroidhormonen wider. Außerdem würde eine Rückkopplung über T3 (2) deutlich länger dauern<sup>602</sup>.

Zudem tritt auch ein *Long-Feedback-Mechanismus* auf. Dabei können die Thyroidhormone direkt auf die TRH-Freisetzung einwirken<sup>603</sup>. Auch im Hypothalamus kann es analog zur TSH-Inhibition zu einer verminderten TRH-Synthese kommen und die TSH-Ausschüttung wird folglich gehemmt. TRH wird im Nucleus paraventricularis aus proTRH gebildet. Durch posttranslationale Modifikationen mittels der Prohormon-Convertase (PC) 1/3 und der PC2 und anschließender Modifikation durch Exopeptidasen, wie Carboxypeptidase E oder Carboxypeptidase D, kommt es zur Proteolyse des proTRH zu TRH-Gly. TRH-Gly ist das direkte Vorläufer-Hormon von TRH. Der letzte Schritt der TRH-Bildung wird durch das Enzym *peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase* (PAM) katalysiert. Vor allem T4 (1) und in geringem Maß auch T3 (2) können die Synthese von TRH beeinflussen, indem sie bei einem hohen T4- bzw. T3-Spiegel im Blut die Expression der Enzyme PC1/3 und PC2 hemmen und somit auch die Bildung von TRH inhibieren. Treten niedrige T4- bzw. T3-Spiegel im Blut auf, kommt es dagegen zur Induktion der Enzyme PC1/3 und PC2. Somit wird auch vermehrt TRH gebildet<sup>604</sup>. Neben dem Einfluss von T4 (1) und T3 (2) auf die Synthese von TRH wird zudem auch direkt die Expression von proTRH gehemmt. Hierbei spielt vor allem T3 (2) eine Rolle. T3 (2) bindet den THR im Hypothalamus, der aktivierte THR wiederum kann in der Promotor-Region des TRH-Gens binden und so dessen Expression inhibieren. Liegt der THR ungebunden vor, kann er ebenfalls an die Promotor-Region des TRH-Gens binden. Die Expression von proTRH wird in diesem Fall jedoch erhöht<sup>605</sup>.

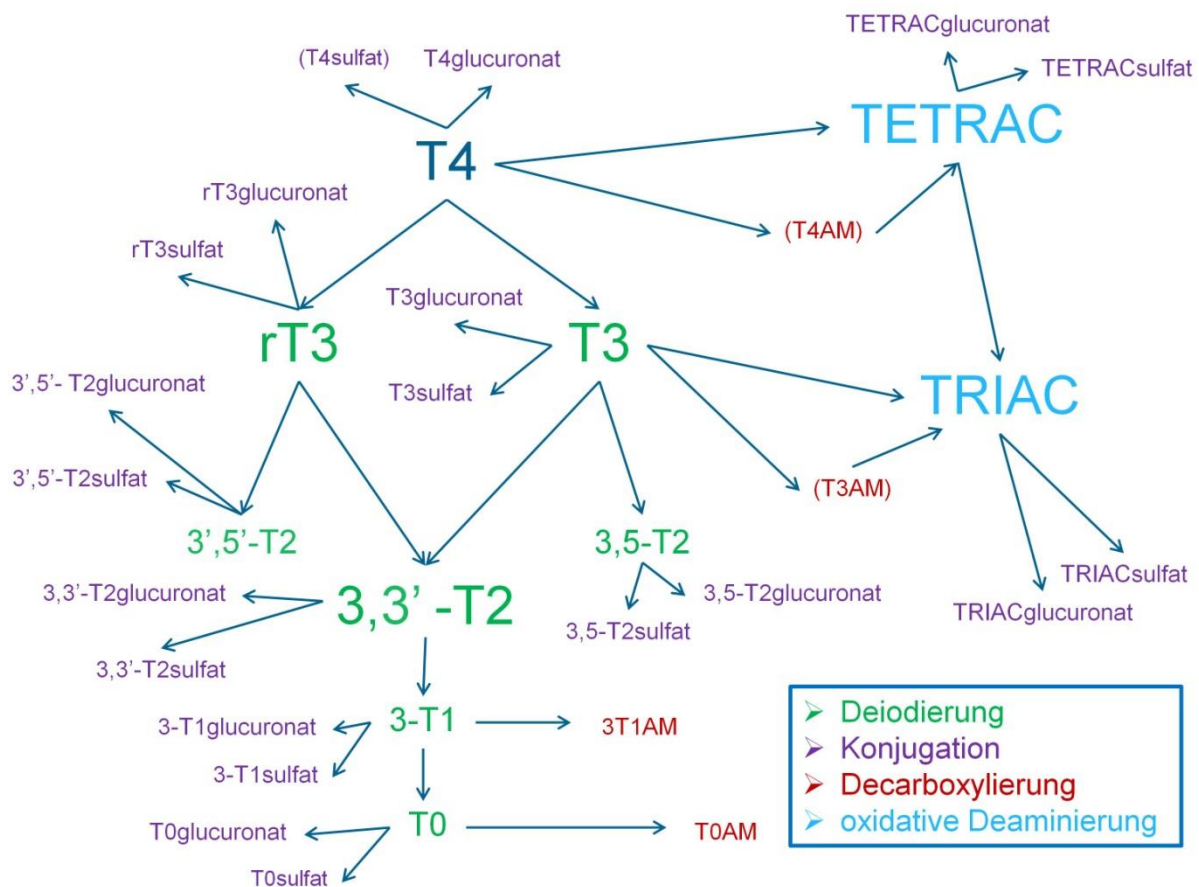
Zu einer Hochregulation des vom Hypothalamus vorgegebenen Sollwertes an Thyroidhormonen kann es durch einen Kältereiz oder auch psychische und physische Belastungen kommen<sup>606,607</sup>. Außerdem kann durch Nahrungsaufnahme Leptin freigesetzt werden, welches einen Einfluss auf Thyroidhormonspiegel hat. Leptin ist ein Adipokin, das hauptsächlich von Adipozyten exprimiert wird und die Energiehomöostase reguliert. Im hypothalamischen Nucleus paraventricularis kann Leptin bei Bedarf die Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription* (Stat3) anregen, das daraufhin die Expression von TRH stimuliert<sup>608</sup>. Auf diese Weise können Stoffwechselprozesse angeregt werden. Generell inhibiert Leptin appetitstimulierende Neuropeptide, wie das *agouti-related protein* (AgRP) und das Neuropeptid Y (NPY) im Nucleus arcuatus und stimuliert



appetit­zügelnd wirkende Neurotransmitter, wie das Proopiomelanocortin (POMC) und das Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript (CART) im Nucleus paraventricularis. Damit hat eine Leptin-Ausschüttung eine katabole Wirkung auf den Lipid-Stoffwechsel<sup>609,610</sup>. Leptin-Spiegel passen sich der jeweiligen Stoffwechsellage an. Wie genau diese Regulierung der Leptin-Spiegel erfolgt ist noch nicht bekannt. Jedoch konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass Leptin durch PPAR $\gamma$  gehemmt werden kann<sup>271,272</sup>.

Ein verminderter Sollwert kann dagegen bei Ruhe und Wärme auftreten. Außerdem haben Somatostatin, Dopamin und Glucocorticoide TSH-hemmende Eigenschaften. Diese negative Rückkopplung, in Form einer Hemmung der TSH-Sekretion, bezeichnet man als Hauptregelkreis. Allerdings gibt es noch weitere Rückkoppelungsschleifen. Der Ultra-Short-Rückkopplungsmechanismus beschreibt den hemmenden Effekt von TSH auf sich selbst (Brokken-Wiersinga-Prummel-Regelkreis). Außerdem hat der TSH-Spiegel einen Einfluss auf die Deiodasen-Aktivität. Vor allem die Expression der Deiodase (D) 2, die hauptverantwortlich für die Umwandlung von T4 (1) zu T3 (2) ist, wird durch TSH induziert. TSH stimuliert dabei den G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelten TSH Rezeptoren in den entsprechenden Kompartimenten<sup>611</sup>. Daraufhin wird über die Adenylatcyclase cAMP gebildet, das die Expression von D2 direkt induziert. Das D2-Gen enthält ein sog. *cAMP responsive element* (CRE) in der Promotor-Region. Wird durch die TSH Ausschüttung vermehrt cAMP gebildet wird die Expression von D2 daher direkt induziert<sup>612</sup>. Diese Rolle, die TSH bei der Regulierung der D2-Expression spielt, könnte auch Ursache für die Expression von TSH-Rezeptoren außerhalb der Schilddrüse sein. Hohe TSH-Rezeptor-Konzentrationen treten beispielsweise im braunen Fettgewebe auf<sup>613</sup>. Die D2-Aktivität wird zudem peripher durch Ubiquitinierung bzw. Deubiquitinierung reguliert. Wenn ein Ubiquitin-Protein an das D2-Enzym bindet, wird die Aktivität des Enzyms inhibiert. Wenn niedrige T4-Spiegel auftreten, werden Deubiquitinasen rekrutiert, die die Deiodase-Aktivität wiederherstellen<sup>620,621</sup>.

## 1.5.4 Metabolismus



**Abbildung 25: Metabolismus der Thyroidhormone.** Hauptsächlich finden Deiodierungs-Reaktionen statt. Dabei wird jeweils ein Iod-Atom abgespalten. Sämtliche Thyroidhormon-Derivate können über eine Phase II Reaktion an Sulfat oder Glucuronsäure konjugiert werden. Seltener kommt es dagegen zur Decarboxylierung oder oxidativen Deaminierung. In Klammern gesetzte Metabolite wurden zwar noch nicht *in vivo* nachgewiesen, sind aber vermutlich existent<sup>614–616</sup>.

Nach der Freisetzung aus der Schilddrüse und der Verteilung über den Blutkreislauf werden die Schilddrüsenhormone T4 (1) und T3 (2) zuerst über einen aktiven Transporter, wie MCT8, MCT10, OAT1C1 oder auch über LAT1 und LAT2 in die Zellen des Zielgewebes aufgenommen<sup>590–593</sup>. Dort findet die Aktivierung von T4 (1) statt, indem das Iod in 5'-Position durch eine Deiodase abgespalten wird. Das entstehende T3 (2) besitzt eine kürzere Halbwertszeit als T4 (1) von ungefähr einem Tag. Würde die Schilddrüse hauptsächlich T3 (2) produzieren käme es daher leichter zu Konzentrationsschwankungen. Das in der Schilddrüse vornehmlich gebildete T4 (1) besitzt zwar eine geringere Rezeptor-Affinität, weist aber eine längere Halbwertszeit von etwa 7 Tagen auf. Um Schwankungen zusätzlich vorzubeugen generiert die Schilddrüse einen Pool an T4 (1), der bedarfsorientiert

ausgeschüttet wird. Erst in den entsprechenden Wirkorten wird das T4 (**1**) intrazellulär durch Deiodasen „aktiviert“<sup>69,617,618</sup>.

Die Deiodierung dient aber nicht nur der Aktivierung, sondern ist ebenso ein wichtiger Weg des Abbaus von Thyroidhormonen. Durch das Abspalten von jeweils einem Iod-Atom wird das Schilddrüsenhormon nach und nach inaktiviert. Weitere metabolische Phase I Reaktionen die ablaufen können, sind oxidative Deaminierungen und Decarboxylierungen. Zudem kann in einer Phase II Reaktion eine Kopplung an Sulfat oder eine Glucuronidierung erfolgen<sup>575,616</sup>.

Die Deiodierung kann am äußeren Benzenring (*outer ring deiodination*, ORD) an 3'- oder 5'-Position oder am inneren Benzenring (*inner ring deiodination*, IRD) an 3- oder 5-Position ablaufen. Ein Drittel des L-Thyroxins wird etwa über eine ORD zu T3 (**2**) umgesetzt. Bei einem Drittel findet die Umsetzung zu an THR biologisch inaktivem rT3 (**10**) durch IRD statt. Das verbleibende Drittel des L-Thyroxins wird durch andere Enzyme abgebaut. T3 (**2**) wiederum wird hauptsächlich am inneren Ring an Position 5 deiodiert und rT3 (**10**) am äußeren Ring an Position 5'. Daher entsteht hauptsächlich das 3,3'-T2 (**12**). Deiodasen sind folglich essentiell für die Aktivierung und den Abbau der Thyroidhormone. Sie können unabhängig von der Serumkonzentration, gewebespezifisch für eine Akkumulation von T3 (**2**) sorgen oder den metabolischen Abbau der Thyroidhormone katalysieren<sup>619</sup>. Dies hängt davon ab, welches Gewebe betrachtet wird und welche Deiodase dort vorrangig lokalisiert ist. Man unterscheidet die drei Deiodasen D1, D2 und D3. Alle Deiodasen sind Selenoproteine<sup>618</sup>. D1 wird hauptsächlich in der Leber, Niere und Schilddrüse exprimiert und vermittelt in diesen Organen die Aktivierung von T4 (**1**) zu T3 (**2**) sowie die Clearance von rT3 (**10**). Neben der ORD-Aktivität, kann D1 aber auch für eine Deiodierung am inneren Benzenring sorgen. Dies spielt hauptsächlich eine Rolle bei der Deiodierung von sulfatiertem T3 (**2**) und T4 (**1**). Die D1 Expression wird zudem direkt durch T3 (**2**) stimuliert<sup>620</sup>. D2 ist vor allem im ZNS, im Hypothalamus, in der Hypophyse, im weißen und braunen Fettgewebe und Skelettmuskel zu finden und hat ausschließlich eine ORD-Aktivität. In gesunden Probanden die mit Propylthiouracil behandelt wurden, das gezielt das Enzym D1 inhibiert, konnte gezeigt werden, dass die Deiodierung von T4 (**1**) zu T3 (**2**) kaum beeinträchtigt wurde. Dies lässt darauf schließen, dass D2 den größten Einfluss auf die T3-Bildung hat. Die Expression von D2 wird im Sinne einer negativen Rückkopplung supprimiert, wenn hohe T4-Spiegel auftreten. Wenn der T4-Spiegel niedrig ist, kommt es zum einen zu einer TSH-abhängigen Erhöhung der D2-Expression und zum anderen zu einer peripheren Aktivierung von D2. Die periphere Anpassung an die entsprechenden Gewebespiegel erfolgt sehr schnell durch Ubiquitinierung bzw. Deubiquitinierung. Wenn Ubiquitin an das D2-Protein gebunden vorliegt, ist die Aktivität des Enzyms inhibiert. Wenn niedrige T4-Spiegel auftreten, werden

Deubiquitinasen rekrutiert und aktivieren so die Deiodase-Aktivität<sup>620,621</sup>. D3 ist in Gehirn, Plazenta, in der Haut, im Uterus der schwangeren Frau und in verschiedenen Geweben und Organen im Fötus zu finden. Im Gegensatz zu D2 besitzt D3 nur eine IRD-Aktivität. Daher ist das Enzym hauptsächlich für den metabolischen Abbau von T3 (2) und die Bildung von rT3 (10) verantwortlich<sup>4,618,622–625</sup>. Deiodasen sind sowohl für die Aktivierung als auch für die Inaktivierung der Thyroidhormone notwendig und sind somit essentieller Teil der Thyroidhormon-Homöostase<sup>624</sup>. Zusätzlich können sie gewebespezifisch für eine erhöhte T3-Konzentration sorgen und so steuern welche Stoffwechselprozesse eingeleitet oder gehemmt werden<sup>69</sup>.

Die Sulfatierung und Glucuronidierung spielen eine eher untergeordnete Rolle beim Abbau der Thyroidhormone. Meist durchläuft ein Stoff diesen Phase II Metabolismus, um die Hydrophilie und damit die Eliminationsrate zu erhöhen. Sulfotransferasen sind in vielen Geweben zu finden, unter anderem in Leber, Niere, Dünndarm und im Gehirn. Bei dem Übertragen eines Sulfats auf eine Hydroxyl-Gruppe sind meist 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfate (PAPS) beteiligt. Die zwei wichtigsten Familien der Sulfotransferasen sind die Phenol-Sulfotransferasen (SULT1 Familie) und die Hydroxysteroid-Sulfotransferasen (SULT2 Familie)<sup>626</sup>. Nur die SULT1 Familie kann mit der Hydroxyl-Gruppe der Thyroidhormone interagieren. Vor allem SULT1A1, 1A2, 1A3, 1B1 und 1C2 sind in der Lage die Thyroidhormone zu metabolisieren.<sup>627–634</sup> Außerdem scheint die humane Estrogen Sulfotransferase (SULT1E1) eines der wichtigsten Isoenzyme für die Sulfatierung der Thyroidhormone zu sein<sup>628</sup>. Meist haben die Sulfotransferasen eine höhere Affinität zu Diiodthyroninen als zu Triiodthyroninen. Sulfatiertes T4 (1) ist dagegen nicht detektierbar<sup>629</sup>. Trotzdem geht man davon aus, dass auch T4 (1) an Sulfat konjugiert werden kann. Da Deiodasen eine höhere Affinität zu sulfatierten Thyroidhormonen aufweisen, ist es wahrscheinlich das sulfatiertes T4 (1) nur sehr kurz existent ist und schnell deiodiert wird. Die Inaktivierung erfolgt daher wesentlich schneller, wenn das entsprechende Thyroidhormon zunächst mit Sulfat konjugiert wird<sup>615,635</sup>. Eine Sulfatierung kann aber auch eine andere Funktion haben. Wenn die Deiodase D1 inhibiert wird, vermutet man, dass sulfatiertes T3 (2) als Speicherform dient, um den Mangel an Thyroidhormonen schnell auszugleichen. Eine solche D1-Hemmung kann beispielsweise während des fetalen Wachstums, bei Auftreten des *Non-Thyroidal-Illness-Syndroms* (NTIS) bzw. TACITUS-Syndroms oder auch bei einer Therapie mit Propylthiouracil auftreten<sup>575,635</sup>. Sulfatasen in bestimmten Geweben oder bakterielle Sulfatasen im Darm können dann durch eine Abspaltung des Sulfats, für eine schnelle T3-Mobilisierung sorgen<sup>575,615</sup>.

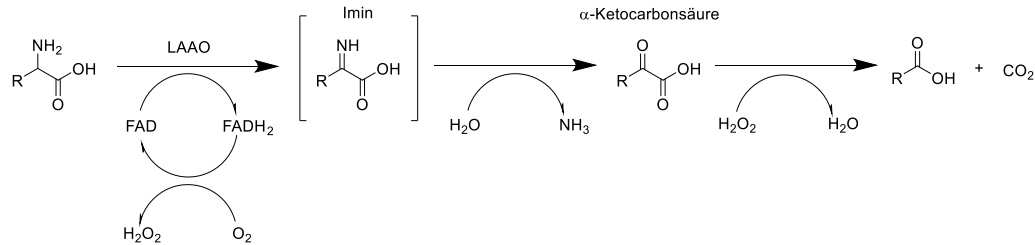
Eine Phase II Glucuronidierung wird durch verschiedene Isoformen der Uridin-5'-diphosphoglucuronosyltransferase (UGT) katalysiert. UGT1A9, UGT2B7 und UGT1A1 sind

beispielsweise in die Konjugation von Glucuronsäure an T4 (**1**), T3 (**2**) und rT3 (**10**) involviert. Die biliäre Eliminierung dieser Konjugate erfolgt sehr schnell. Die Thyroidhormone können aber nach einer Hydrolyse des Glucuronids durch bakterielle  $\beta$ -Glucuronidasen im Darm rückresorbiert werden und somit einen enterohepatischen Kreislauf durchlaufen. Etwa 20% des täglich produzierten L-Thyroxins (**1**) wird über den Fäzes ausgeschieden. Man nimmt an, dass ein Großteil davon durch biliäre Exkretion der Glucuronid-Konjugate in den Fäzes gelangt<sup>575</sup>.

Neben der Deiodierung, Sulfatierung und Glucuronidierung können die Thyroidhormone auch decarboxyliert werden. Die decarboxylierten Thyroidhormone bezeichnet man auch als Thyronamine. Die endogene Bildung der Thyronamine ist noch nicht vollständig aufgeklärt<sup>636</sup>. Bisher konnten zudem nur das monoiodierte Derivat 3-Iodthyronamin (3-T1AM, **89**) und das vollständig deiodierte Thyronamin (T0AM) im Körper detektiert werden<sup>7,580</sup>. Welche Enzyme bei der endogenen Decarboxylierung eine Rolle spielen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC), die ein potenzielles Enzym zur Umsetzung der Thyroidhormone darstellt, ist nicht in der Lage die Decarboxylierung zu katalysieren<sup>636</sup>. Vermutet wird das ähnliche Enzyme, die bei der L-Thyroxin-Bildung eine Rolle spielen auch an der Thyronamin-Synthese beteiligt sind. Daher geht man davon aus, dass Thyronamine vor allem in der Schilddrüse gebildet werden<sup>637</sup>. Allerdings konnte auch in athyreoten Patienten 3-T1AM (**89**) detektiert werden<sup>584</sup>. Bekannt ist, dass Deiodasen in der Lage sind Thyronamine zu deiodieren<sup>638</sup>. 3-T1AM (**89**) wird beispielsweise zuerst sulfatiert und dann von D3 deiodiert<sup>633,639</sup>. Insgesamt ist die Decarboxylierung der Thyroidhormone zu Thyronaminen aber noch nicht ausreichend untersucht worden. Vor allem durch die Entdeckung der besonderen physiologischen Wirkung der Thyronamine, die in Kapitel 1.5.6 behandelt werden, ist dies ein Aspekt, der in den nächsten Jahren näher beleuchtet werden muss.

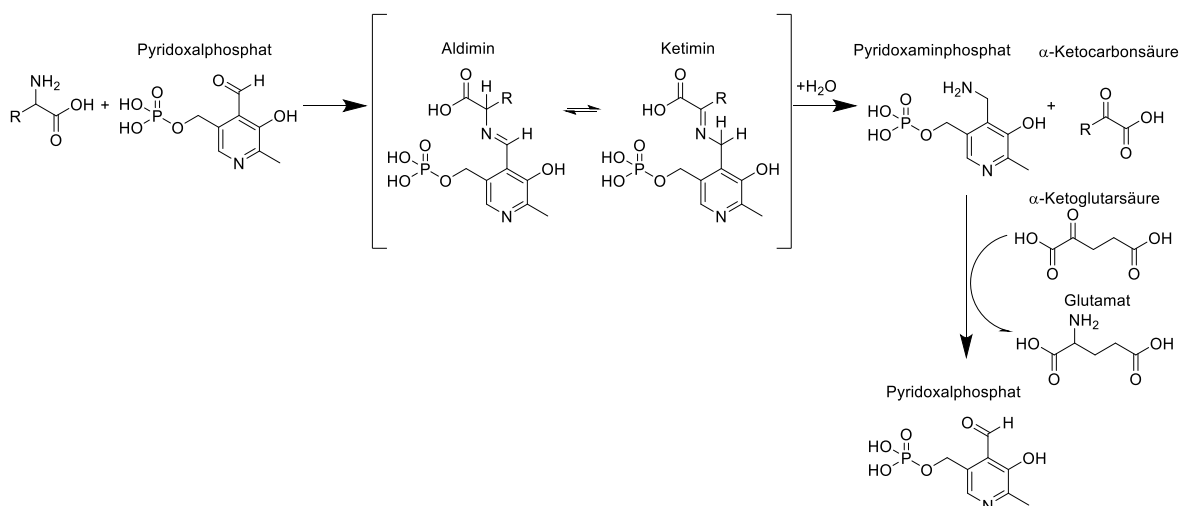
Zudem wurden auch Iodthyroacetate endogen detektiert. TETRAC (**4**) und TRIAC (**3**) gehören zu dieser Substanzklasse<sup>158,640</sup>. Sie werden vermutlich ausgehend von T4 (**1**) bzw. T3 (**2**) gebildet. Man nimmt an, dass etwa 1 bis 2  $\mu\text{g}$  des L-Thyroxins pro Tag zu TETRAC (**4**) umgesetzt werden<sup>616</sup>. TETRAC (**4**) wiederum wird fast zu 100% deiodiert und damit zu TRIAC (**3**) umgesetzt. Da täglich jedoch mehr TRIAC (**3**) als TETRAC (**4**) gebildet wird, lässt sich schlussfolgern, dass TRIAC (**3**) hauptsächlich durch oxidative Deaminierung von T3 (**2**) entsteht<sup>616</sup>. Bei einigen Tierstudien lies sich nachweisen, dass eine oxidative Deaminierung in Gehirn<sup>641</sup>, Galle<sup>642</sup>, Leber<sup>643–645</sup> und in der Niere<sup>158,645,646</sup> abläuft. Leber und Niere scheinen die metabolisch aktivsten Organe für die Umsetzung von T4 (**1**) und T3 (**2**) zu TETRAC (**4**) und TRIAC (**3**) zu sein. Wahrscheinlich läuft die Synthese der Iodthyroacetate intrazellulär in den Mitochondrien ab. Untersuchungen mit isolierten Mitochondrien der Niere beweisen,

dass die Umsetzung von T4 (1) und T3 (2) in diesem Kompartiment abläuft<sup>646,647</sup>. Allerdings ist noch nicht genau bekannt, welche Enzyme die Iodthyroacetat-Synthese katalysieren. Es wird vermutet, dass die L-Aminosäure Oxidasen (LAAOs) und die L- $\alpha$ -Aminosäure Transaminasen (LATs) an der Umsetzung beteiligt sind.



**Abbildung 26: LAAO katalysierte oxidative Deaminierung. Über ein Imin und ein  $\alpha$ -Ketocarbonsäure-Intermediat kommt es zur Bildung des Iodthyroacetats<sup>616</sup>.**

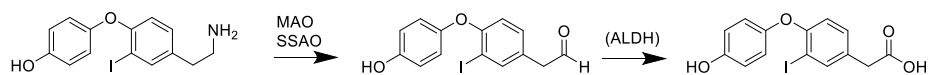
LAAOs katalysieren die oxidative Deaminierung von L-Aminosäuren in einer 3-stufigen Reaktion (Abbildung 26). Dabei wird mit Hilfe des Cofaktors Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) ein  $\alpha$ -Ketocarbonsäure-Intermediat gebildet. FAD wird dabei zu  $FADH_2$  reduziert und durch Sauerstoff, das zu  $H_2O_2$  reduziert wird, wieder regeneriert. Die  $\alpha$ -Ketocarbonsäure wird anschließend decarboxyliert und mit Hilfe des gebildeten  $H_2O_2$  zur Carbonsäure oxidiert<sup>616</sup>. Analog zu Aminosäuren könnten Thyroidhormone auf diese Weise deaminiert werden. Es wird angenommen, dass auch LATs diese oxidative Deaminierung katalysieren können. Es wurde zudem eine spezielle Thyroidhormon Transaminase (EC 2.6.1.26) detektiert, deren Substrate verschiedenen Thyroidhormon-Derivate sind. Die Thyroidhormon Transaminase wird in Leber und Niere exprimiert.



**Abbildung 27: Transaminasen katalysierte Bildung einer  $\alpha$ -Ketocarbonsäure. Mit Hilfe der Cofaktoren Pyridoxalphosphat und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure wird eine Aminosäure deaminiert und es bildet sich eine  $\alpha$ -Ketocarbonsäure<sup>647-649</sup>.**

Eine Transaminase katalysiert die Übertragung einer Aminosäure auf eine  $\alpha$ -Ketocarbonsäure und umgekehrt. Dabei spielen die Cofaktoren Pyridoxalphosphat und  $\alpha$ -Ketoglutaronsäure eine entscheidende Rolle (Abbildung 27). Die entsprechende Aminosäure-Funktion wird zunächst auf das Pyridoxalphosphat übertragen. Es bildet sich ein Aldimin das im Gleichgewicht mit seinem Tautomer, einem Ketimin, vorliegt. Durch Hydrolyse wird eine  $\alpha$ -Ketocarbonsäure aus der Aminosäure und dem Pyridoxaminphosphat gebildet. Pyridoxalphosphat kann anschließend regeneriert werden, indem die Amino-Gruppe wiederum auf  $\alpha$ -Ketoglutaronsäure übertragen wird. Es bildet sich Glutamat und Pyridoxalphosphat. Die resultierende  $\alpha$ -Ketoglutaronsäure kann nach der Transaminierung decarboxyliert und beispielsweise durch  $H_2O_2$  oxidiert werden<sup>647–649</sup>.

Auch sulfatiertes T4 (1) und T3 (2) kann oxidativ deaminiert werden. Es wird diskutiert ob sulfatiertes TETRAC (4) und TRIAC (3) wie T3 (2) bei einer D1-Inhibition als Speicherform akkumuliert<sup>650,651</sup>. Auch glucuronidiertes TRIAC (3) wurde bereits *in vivo* detektiert. Damit scheint auch TRIAC (3) einen enterohepatischen Kreislauf zu durchlaufen<sup>652</sup>.



**Abbildung 28: Oxidation von 3-T1AM (89) zu 3-Iodthyroacetat<sup>653,654</sup>.**

Möglich wäre auch, dass die Biosynthese der Iodthyroacetate von Thyronaminen ausgeht. Die Thyronamine können durch Amin Oxidasen, wie die Monoaminoxidase (MAO) oder die Semicarbazid-sensitive Amin-Oxidase (SSAO) umgesetzt werden (Abbildung 28)<sup>653,654</sup>.

In Zell- und Gewebeeextrakten ist die Oxidation der Amino-Gruppe von 3-T1AM (89) bereits nachgewiesen worden<sup>655</sup>. Um den Einfluss der MAO und der SSAO zu belegen, wurde ein Kontrollversuch mit dem Inhibitor Iproniazid, der sowohl die MAO als auch die SSAO hemmt, durchgeführt. Nach Inkubation mit Iproniazid konnte kein Iodthyroacetat mehr detektiert werden<sup>655</sup>. Bisher noch nicht nachgewiesen ist, welches Enzym die Oxidation bis zur Carbonsäure katalysiert. Möglicherweise könnte die Alkoholdehydrogenase (ALDH) in diesen Schritt involviert sein (Abbildung 28)<sup>656</sup>. Des Weiteren ist noch nicht geklärt, ob Tetraiodthyronamine (T4AM) und Triiodthyronamine (T3AM) als Ausgangsstoffe für die Synthese von TETRAC (4) und TRIAC (3) im Körper vorliegen, da sie endogen noch nicht detektiert werden konnten.

2018 wurde ein weiteres Enzym entdeckt, dass eine Rolle bei der Synthese von Iodthyroacetaten spielen könnte<sup>657</sup>. Die Kynurenin/Alpha-Aminoacidsaminotransferase (AADAT) ist ein mitochondriales Enzym, das analog zur Thyroidhormon-Aminotransaminase, Pyridoxalphosphat und  $\alpha$ -Ketoglutaronsäure als Cofaktoren benötigt (Abbildung 27). Die

AADAT-katalysierte Umsetzung von T4 (1) und T3 (2) zu Iodthyroacetaten konnte in COS-1 Zellen bereits nachgewiesen werden. Zudem wurde die Substrataffinität zum Enzym mit Hilfe der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  ermittelt. Für T4 (1) und T3 (2) konnten wesentlich geringere  $K_m$ -Werte ermittelt werden ( $K_m = 10 - 100 \mu\text{M}$ ), als zu den eigentlichen Substraten  $\alpha$ -Aminoadipate ( $K_m = 0,9 \text{ mM}$ ) und Kynurenin ( $K_m = 4,7 \text{ mM}$ )<sup>658</sup>. Die weitere Decarboxylierung und Oxidation der  $\alpha$ -Ketocarbonsäure wurde in diesem Versuchsaufbau jedoch nicht genauer untersucht<sup>657</sup>.

Der Metabolismus der Thyroidhormone ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch die Detektion und Quantifizierung der Thyroidhormon-Derivate konnte bewiesen werden, dass der Abbau hauptsächlich durch Deiodasen erfolgt. Die Existenz von Thyronaminen und Iodthyroacetaten belegt aber auch, dass es alternative metabolische Abbauewege gibt.



**Tabelle 15: Enzyme des Thyroidhormon-Metabolismus**

Abbauweg	Enzym	Expressions-Muster	Funktion
<b>Deiodierung</b>	Deiodase 1 (D1) <sup>620</sup>	Leber, Niere, Schilddrüse	ORD & IRD möglich ORD: ➤ Aktivierung von T4 (1) zu T3 (2) ➤ Clearance von rT3 (10) IRD: ➤ Deiodierung von sulfatiertem T3 (2) und T4 (1)
	Deiodase 2 (D2) <sup>620,621</sup>	ZNS, Hypothalamus, Hypophyse, weißes und braunes Fettgewebe, Skelettmuskel	ausschließlich ORD-Aktivität hat größten Einfluss auf die T3-Bildung
	Deiodase 3 (D3) <sup>4,618,622-625</sup>	Gehirn, Plazenta, in der Haut, im Uterus der schwangeren Frau und in verschiedenen Geweben und Organen im Fötus	ausschließlich IRD-Aktivität hauptsächlich für den metabolischen Abbau von T3 (2) und die Bildung von rT3 (10) verantwortlich
<b>oxidative Deaminierung</b>	L-Aminosäure Oxidasen (LAOs) <sup>616</sup>	hauptsächlich in Lysosomen zu finden (Lysosomen kommen vor allem in Leber, Niere, Milz und Leukozyten vor)	Cofaktor: FAD ➤ LAOs katalysieren Bildung von $\alpha$ -Ketocarbonsäure-Intermediat $\rightarrow$ Decarboxylierung $\rightarrow$ Oxidation zu Iodthyoacetat mittels $H_2O_2$
	L- $\alpha$ -Aminosäure Transaminasen (LATs): z.B Thyroidhormon Transaminase (EC 2.6.1.26)	Leber und Niere <sup>648</sup>	Cofaktoren:Pyridoxalphosphat und $\alpha$ -Ketoglutar Säure ➤ eine Aminosäure-Gruppe wird auf eine $\alpha$ -Ketocarbonsäure übertragen und umgekehrt $\rightarrow$ aus T4 (1) und T3 (2) wird eine $\alpha$ -Ketocarbonsäure gebildet $\rightarrow$ Decarboxylierung $\rightarrow$ Oxidation: z.B. durch $H_2O_2$ <sup>647-649</sup>
	Kynurenin/Alpha-Aminoacidat Aminotransferase (AADAT) <sup>657</sup>	mitochondriales Enzym Leber, GI-Trakt, Nieren, Herz, Gehirn, Pankreas, Prostata, Hoden und Eierstöcken <sup>659</sup>	Cofaktoren:Pyridoxalphosphat und $\alpha$ -Ketoglutar Säure ➤ Bildung einer $\alpha$ -Ketocarbonsäure $\rightarrow$ Decarboxylierung und Oxidation, Enzym: unbekannt
	MAO <sup>653,654</sup> (MAO-A, MAO-B)	ubiquitär (in Mitochondrien)  ZNS: MAO-A und MAO-B sind in Neuronen und Astrozyten exprimiert Peripherie: MAO-A: Leber, Lungenendothel, GI-Trakt, Plazenta MAO-B: Blutplättchen	Oxidation von Thyronaminen zu Aldehyden <sup>653,654</sup> $\rightarrow$ Oxidation: Enzym unbekannt, ALDH? <sup>656</sup>
	SSAO <sup>653,654</sup>	Plasmamembran der Adipocyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, als lösliches Enzym auch im Blut-Plasma zu finden <sup>660</sup>	Oxidation von Thyronaminen zu Aldehyden <sup>653,654</sup> $\rightarrow$ Oxidation: Enzym unbekannt, ALDH? <sup>656</sup>
<b>Decarboxylierung</b>	unbekannt	-	-
<b>Phase II Sulfatierung</b> <sup>615,627-635</sup>	Sulfotransferasen der SULT1 Familie (v.a. SULT1A1, 1A2, 1A3, 1B1 und 1C2, 1E1), meist sind zusätzlich PAPS beteiligt	u.a. Leber, Niere, Dünndarm und im Gehirn	spielt untergeordnete Rolle: ➤ höhere Affinität zu Diiodthyroninen als zu T3 (2) und rT3 (10) ➤ sulfatiertes T4 (1) ist nicht detektierbar $\rightarrow$ Deiodasen haben eine hohe Affinität zu sulfatierten Thyroidhormonen ➤ sulfatiertes T3 (2) $\rightarrow$ Speicherform
<b>Phase II Glucuronidierung</b> <sup>575</sup>	Uridin-5'-diphosphoglucuronosyltransferasen (UGT1A9, UGT2B7 und UGT1A1)		Konjugation von Glucuronsäure erfolgt an T4 (1), T3 (2) und rT3 (10) ➤ enterohepatischer Kreislauf ➤ biliäre Exkretion der Thyroidhormone erfolgt zu 20% als Glucuronid-Konjugate

### 1.5.5 Genomische Wirkmechanismen

Thyroidhormone entfalten ihre genomische Wirkung durch die Aktivierung der THR<sub>s</sub>. Während der Wachstumsphase sind die genomisch vermittelten Thyroidhormon Effekte essentiell für die Organanlage und Entwicklung<sup>1,2</sup>. Beim Erwachsenen werden hauptsächlich metabolische Abläufe beeinflusst. Insgesamt entwickelt sich durch den Einfluss der THR<sub>s</sub> eine katabole Stoffwechsellage<sup>12,85</sup>. Es kommt zu einer Erhöhung des Grundumsatzes. Lipoprotein-, Gallensäure-, Fett- und Glucose-Stoffwechsel werden beeinflusst<sup>134,135</sup>. Außerdem verstärken Thyroidhormone über den THR $\alpha$ 1 die positiv inotrope und chronotrope Wirkung von Katecholaminen am Herzen<sup>3,4</sup>. Die genauen molekularen Signalwege der THR<sub>s</sub> werden in Kapitel 1.2.3 aufgeführt.

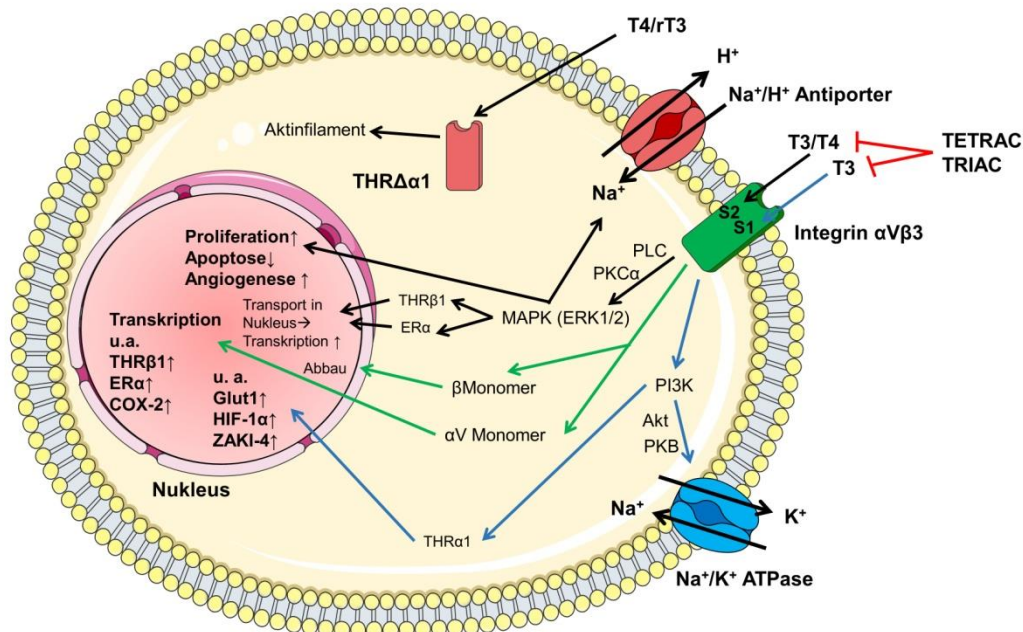
Zum Teil werden auch andere nukleäre Rezeptoren durch die Thyroidhormone beeinflusst, da sich viele Signalwege der THR<sub>s</sub> mit den Signalwegen anderer nukleärer Rezeptoren überschneiden („*crosstalk*“). Diese Signalweg-Überschneidungen können durch die Konkurrenz um den Heterodimerpartner RXR zustande kommen. Es ist aber auch möglich, dass die THR<sub>s</sub>, um die Bindung an ein *Response Element* konkurrieren<sup>661,662</sup>. THR $\beta$ 1 greift z.B in die HDL-Synthese ein, indem er an das *Response Element* (DR4) des ABCA1-Gens bindet. Normalerweise binden LXR und SREBP-2 an diese Sequenz. Durch die THR $\beta$  Bindung wird die Genexpression inhibiert<sup>113</sup>. Dies führt insgesamt zu einer verringerten HDL-Synthese<sup>114</sup>. Neben der Konkurrenz um RXR oder entsprechende *Response Elemente*, besteht auch die Möglichkeit, dass verschiedene nukleäre Rezeptoren, die gleichen Coaktivatoren oder Corepressoren rekrutieren. Die Coaktivatoren der SRC-Familie werden beispielsweise von vielen nukleären Rezeptoren rekrutiert. Stehen verschiedene Rezeptoren dabei in Konkurrenz, wirkt sich das auf die Genexpression der Zielgene aus<sup>663</sup>. Thyroidhormone beeinflussen über diese indirekten Wege folglich auch andere nukleäre Rezeptoren, eine direkte Bindung eines anderen nukleären Rezeptors wurde bisher aber noch nicht beschrieben.

### 1.5.6 Nicht-genomische Wirkmechanismen

Neben den genomischen Wirkmechanismen, bei denen Thyroidhormone ihre Wirkung durch die Modulation von entsprechenden Zielgenen entfalten, können auch nicht-genomische Signalwege beeinflusst werden. Lange ging man davon aus, dass die Metabolisierung der Thyroidhormone zur Inaktivierung und zur Förderung der Elimination dient<sup>5</sup>. Jedoch sind meist die sogenannten nicht-klassischen Thyroidhormone, die Metabolite von T<sub>4</sub> (1) und T<sub>3</sub> (2), für die nicht-genomischen Effekte verantwortlich. Es sind mehrere nicht-genomische Wirkungen für Thyroidhormone bekannt. Zum einen wird der Membranrezeptor Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 moduliert<sup>10</sup>. Zum anderen können Thyroidhormone durch die Bindung an eine verkürzte

THR $\alpha$  Isoform (p30) das Cytoskelett der Zelle stabilisieren<sup>12,576</sup>. Die Thyronamine sind zudem in der Lage über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, den TAAR1, eine akute Hypothermie und Bradykardie auszulösen. 3-T1AM (89) bindet ebenfalls den G-Protein gekoppelten  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor<sup>664</sup> und hemmt bestimmte Monoamin-Transporter.

Der Integrin  $\alpha\beta3$  Rezeptor wird häufig auf Endothelzellen und Tumorzellen exprimiert. Die Effekte des Integrin  $\alpha\beta3$  können entweder extrazellulär oder intrazellulär vermittelt werden. Extrazellulär wird über den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) die Angiogenese stimuliert<sup>665</sup>. Intrazellulär wird der Transport einiger Proteine vom Cytosol in den Nukleus gewährleistet<sup>666</sup>. Außerdem werden einige Kinasen aktiviert, wie die MAPK/ERK1/2 und die Serin-Threonin-Kinase Akt<sup>667</sup>. Diese Kinasen können letztendlich zu der Expression von verschiedenen Nukleoproteinen und Transkriptionsfaktoren, wie z.B HIF-1 $\alpha$  führen<sup>668</sup>. Auch einige Onkogene und Protoonkogene werden vermehrt exprimiert<sup>669</sup>.



**Abbildung 29: Nicht-genomischer Wirkmechanismus der Thyroidhormone.** Intrazelluläre Effekte des Integrin  $\alpha\beta3$  führen zur Aktivierung der MAPK (ERK1/2) und Akt. Die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Nukleoproteine wird dadurch induziert. Außerdem wird die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters erhöht. Über eine transkriptionell inkompetente Form des  $\text{THR}\alpha1$  ( $\text{THR}\Delta\alpha1$ ) wird das Cytoskelett stabilisiert<sup>12,670</sup>.

Der Integrin  $\alpha\beta3$ -Rezeptor besitzt eine Bindestelle für die Thyroidhormone T4 (1) und T3 (2), sowie für die Iodthyroacetate. Während die Iodthyroacetate eine antagonistische Wirkung auf den Rezeptor haben, sind T4 (1) und T3 (2) Agonisten<sup>10-12</sup>. Wahrscheinlich hat auch rT3 (10) eine agonistische Aktivität am Rezeptor<sup>10,671-674</sup>. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zur Proliferation und Angiogenese. Außerdem wird die Apoptose gehemmt.

T3 (2) und T4 (1) können an die S2 Domäne des Integrin  $\alpha\beta3$  binden. Im Gegensatz zu den THR $\alpha$ s hat T4 (1) eine wesentlich größere Bindungs-Affinität als T3 (2)<sup>10</sup>. Durch die Bindung an die Subdomäne S2 wird über die Phospholipase C (PLC) und die PKC die MAPK/ERK1/2 stimuliert. Wird der Rezeptor durch TETRAC (4) oder TRIAC (3) inhibiert ergeben sich antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften, die bei der Tumorthherapie Anwendung finden. Die von NanoPharmaceuticals LLC entwickelte Nanopartikel-Formulierung von TETRAC (4) ist seit 2015 für mehrere Krebsarten als *orphan drug* zugelassen. Unter anderem findet Nano-TETRAC Anwendung beim Glioblastom und bei Pankreaskarzinomen<sup>675,676</sup>.

Durch die MAPK (ERK1/2)-Kaskade wird auch der Transport von THR $\beta$ 1 und ER $\alpha$  in den Zellkern gefördert. Die Kinase bildet einen Komplex mit THR $\beta$ 1 und phosphoryliert den Rezeptor an Ser-142<sup>677</sup>. ER $\alpha$  wird ebenfalls phosphoryliert und kann so in den Zellkern translokieren. Außerdem wird die Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter Aktivität durch MAPK/ERK1/2 erhöht.

Zudem existiert auf dem Integrin  $\alpha\beta3$  eine T3 (2) spezifische Bindungsstelle in der Subdomäne S1 über die die PI3K aktiviert wird<sup>678,679</sup>. Die PI3K stimuliert den Transport von THR $\alpha$ 1 in den Nukleus. Dort wird unter anderem die Transkription des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF)-1 $\alpha$ , GLUT-1 und ZAKI-4 induziert. ZAKI-4 ist ein Calcineurin-Modulator des Gehirns. Außerdem wird durch PI3K die Serin-Threonin Kinase Akt stimuliert, die über die PKB die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität erhöht. Auch diese Bindungsstelle kann durch TETRAC (4) und TRIAC (3) blockiert werden<sup>668</sup>.

Bei der Internalisierung von Integrin  $\alpha\beta3$  werden die beiden Monomere  $\alpha$ V und  $\beta$ 3 separat verstoffwechselt. Während  $\alpha$ V im Nukleus recycelt wird, wird  $\beta$ 3 abgebaut.<sup>680</sup> Phosphoryliertes  $\alpha$ V bildet dabei im Nucleus einen  $\alpha$ V-MAPK-p300 Komplex der an die *Response* Elemente einiger Gene binden kann und deren Transkriptionsrate erhöht. Diese Zielgene sind beispielsweise THR $\beta$ 1, ER $\alpha$  und die COX-2<sup>681</sup>.

Die nicht-genomischen Effekte des Integrin  $\alpha\beta3$  hängen eng mit den genomischen Mechanismen der THR $\alpha$ s zusammen. Eine Integrin  $\alpha\beta3$  Aktivierung hat auch eine erhöhte Expression von THR $\alpha$ 1 und THR $\beta$ 1 zur Folge. Außerdem werden genomisch regulierte Protein, wie die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zusätzlich auf einem nicht-genomischen Weg aktiviert.

Über eine transkriptionell inkompetente Form des THR $\alpha$ 1 (THR $\Delta\alpha$ 1) können ebenfalls nicht-genomische Effekte vermittelt werden. Dieser Rezeptor wurde 2014 entdeckt und bisher ist nur wenig über THR $\Delta\alpha$ 1 bekannt. Da es sich um ein Fragment des THR $\alpha$ 1 mit einem Gewicht von 30kDa handelt, wird der Rezeptor auch als p30 bezeichnet<sup>576</sup>. Wahrscheinlich bildet sich dieses p30-Protein während der Translation. Der Rezeptor ist außerdem palmitoyliert. An den Cysteinresten Cys254 und Cys255 sind Palmitinsäuren gebunden.

Außerdem ist er an die Caveolin Proteine der Plasmamembran der jeweiligen Zelle assoziiert<sup>576,659</sup>.  $\text{THR}\Delta\alpha 1$  ist involviert in die Erhaltung des Cytoskeletts. Besonders T4 (**1**) und rT3 (**10**) haben eine hohe Bindungs-Affinität zu  $\text{THR}\Delta\alpha 1$  und sind daher hauptverantwortlich für die über den Rezeptor vermittelten Effekte<sup>12</sup>.

Thyronamine besitzen keine Aktivität an den THRs oder am Integrin  $\alpha\text{V}\beta 3$ <sup>6</sup>, sie können aber einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, den TAAR1 aktivieren. Der TAAR1 ist einer von sechs TAARs und wird in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, im Magen, sowie im Dünndarm, Leukozyten und auch im ZNS, speziell in Astrocyten exprimiert. Der TAAR1 wird normalerweise von endogenen Amin-Verbindungen, wie Dopamin und Serotonin aktiviert und moduliert daher u.a. die dopaminerge und serotonerge Neurotransmission. Außerdem spielt der TAAR1 eine Rolle bei kognitiven Prozessen. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor moduliert aber auch Stoffwechselprozesse und hat z.B. einen Einfluss auf Glucose-Spiegel<sup>682</sup>. Aktivieren Thyronamine den TAAR1 hat dies zur Folge, dass es innerhalb kürzester Zeit zu einem rapiden Abfall der Körpertemperatur und einer akuten Bradykardie kommt<sup>7</sup>. Es tritt ein Torpor-artiger Zustand auf. Bei diesem physiologischen Schlafzustand werden Stoffwechsel- und Energieumsatz-Prozesse auf ein Mindestmaß reduziert<sup>7</sup>. Vermutlich spielen noch andere TAARs bei der Vermittlung dieser Effekte eine Rolle, da es in TAAR1 knockout-Mäusen nach 3-T1AM-Applikation trotzdem zu einer ausgeprägten Hypothermie kam<sup>683</sup>. Thyronamine haben zudem noch weitere THR-unabhängige physiologische Wirkungen. 3-T1AM (**89**) scheint im Tier-Modell neuroprotektiv zu wirken und das Schlaganfall-Risiko zu senken<sup>684</sup>. Außerdem bindet 3-T1AM (**89**) den G-Protein gekoppelten  $\alpha_{2A}$ -Adrenozeptor<sup>664</sup> und ist in der Lage den Transport von Katecholaminen zu inhibieren, indem es bestimmte Monoamin-Transporter durch direkte Bindung hemmt. In der Zellmembran werden der Dopamin-Transporter (DAT) und Norepinephrine-Transporter (NET) inhibiert und auch der Transport in die Vesikel wird durch eine Hemmung des vesikulären Monoamintransporters (VMAT) gestört<sup>685</sup>.

### **1.5.7 Physiologische Effekte mit unbekanntem Wirkmechanismus**

Neben den nicht-genomischen Effekten der Thyroidhormone, die in den letzten 20 Jahren entdeckt wurden, sind auch noch nicht alle genomischen Wirkmechanismen genau aufgeklärt. Häufig konnte durch DNA-Chip-Analyse oder durch Knock-out Modelle der Einfluss der THRs in verschiedene Wachstums- oder Stoffwechselprozesse nachgewiesen werden<sup>92-94</sup>. Der genaue molekulare Mechanismus, die molekularen Zielstrukturen der Thyroidhormone und die entsprechenden regulierten Gene sind aber zum Teil noch nicht bekannt.

In der Wachstumsphase des Fötus, spielen THR<sub>s</sub> eine wichtige Rolle. Durch Förderung der Dendritenbildung und Myelinisierung wird die neuronale Entwicklung gewährleistet. Bisher ist bekannt, dass das Zusammenspiel mit RAR<sup>87,88</sup> und die Expression von CamK IV<sup>89</sup> dabei von essentieller Bedeutung sind. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass noch weitere bisher nicht bekannte Signalwege einen Einfluss haben. Bisher ist zudem auch nicht bekannt über welchen molekularen Mechanismus die auditorischen Funktionen des Fötus ausgebildet werden. In Knockout-Modellen konnte nachgewiesen werden, dass über THR<sub>β2</sub> die Ausbildung des Gehörs vermittelt wird<sup>80</sup>. Welche Gene dabei reguliert werden, konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

Auch bei Stoffwechselprozessen, die über Thyroidhormone reguliert werden, sind noch nicht alle Signalwege bekannt. Eine THR Aktivierung führt zu einer Erhöhung des Grundumsatzes<sup>136,137</sup>. Welche Prozesse genau dazu beitragen, ist aber noch unklar<sup>138</sup>. Man nimmt an, dass vor allem der Thyroidhormon-induzierte ATP-Verbrauch den Grundumsatz erhöht. Jedoch könnten auch noch andere THR-abhängige Effekte involviert sein. Wahrscheinlich trägt die Interaktion mit Signalwegen des Sympathikus auch zur Erhöhung des Grundumsatzes bei. Bei vielen Stoffwechselprozessen, wie z.B bei der Lipolyse oder auch bei der Beeinflussung der Herzleistung<sup>3,4</sup> und Thermogenese ist bereits belegt worden, dass die Katecholamin-Wirkung durch den Einfluss der THR<sub>s</sub> verstärkt wird<sup>108</sup>. Die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch unklar.

Bei der Differenzierung von Adipocyten spielen Thyroidhormone ebenfalls eine Rolle<sup>119</sup>. Der genaue Mechanismus ist aber auch hier noch nicht aufgeklärt. Die Differenzierung von Präadipozyten wird vor allem durch PPAR<sub>γ</sub> reguliert. Besonders in frühen Stadien, nimmt PPAR<sub>γ</sub> eine entscheidende Rolle ein, da der Rezeptor in der Lage ist die Expression der Transkriptionsfaktoren C/EBP<sub>α</sub>, C/EBP<sub>β</sub> und C/EBP<sub>δ</sub> zu induzieren<sup>237,242,243</sup>. C/EBPs sind die Hauptregulatoren der Adipocyten-Differenzierung<sup>244</sup>. Es wird vermutet, dass Thyroidhormone über die Interaktion mit dem Corepressor NCoR1 (TRAC-1) in diesen Prozess eingreifen<sup>159,686,687</sup>. Der nicht-ligandengebundene THR<sub>β1</sub> rekrutiert Corepressoren wie NCoR1. Anschließend bildet sich ein Komplex des THR<sub>β1</sub> mit PPAR<sub>γ</sub> und NCoR1. Durch diesen Komplex behält PPAR<sub>γ</sub> trotz Anwesenheit eines PPAR<sub>γ</sub>-Liganden die inaktive Konformation bei. Es kommt folglich zu einer Transrepression von PPAR<sub>γ</sub> Zielgenen, wie den C/EBPs, und damit zu einer verminderten Adipocyten-Differenzierung. Bindet T3 (**2**) an den nicht-ligandengebundenen THR<sub>β1</sub>, wird der THR<sub>β1</sub>/PPAR<sub>γ</sub>-Komplex aufgelöst und die Bindung und Aktivierung von PPAR<sub>γ</sub> kann wieder erfolgen<sup>688-690</sup>. *In vitro* Daten belegen, dass T3 (**2**) in der Lage ist in Kombination mit Insulin und Transferrin die Proliferation der Präadipozyten zu induzieren<sup>691,692</sup>. Außerdem scheint die Deiodase D2 bei der

Differenzierung der Adipocyten in braunen Fettgewebe von essentieller Bedeutung zu sein<sup>119</sup>.

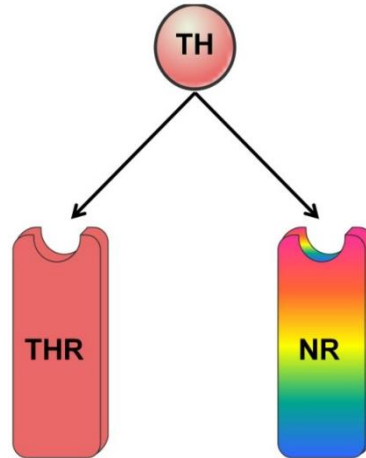
Thyroidhormone greifen auch in den Glucose-Stoffwechsel ein und induzieren die Gluconeogenese und Glykogenolyse<sup>693,694</sup>. Aber auch die insulinabhängige Aufnahme von Glucose durch Glucosetransporter wie GLUT-1 und GLUT-4 wird gefördert. Wie es zu der Expression der beiden Glucosetransporter kommt, konnte noch nicht geklärt werden. Bekannt ist bisher, dass das GLUT-4 Gen ein TRE besitzt<sup>122</sup>. Aber auch die GLUT-1 Expression wird durch den Einfluss von Thyroidhormonen erhöht<sup>695,696</sup>. Man geht davon aus, dass die Transkription von HIF-1 $\alpha$  durch Thyroidhormone über genomische und nicht-genomische Signalwege erhöht wird und es daraufhin zur Aktivierung von PI3K und ERK Signalkaskaden kommt, die letztendlich für die Expression von GLUT-1 und GLUT-4 sorgen<sup>697</sup>. Möglich ist aber auch, dass noch andere Signalwege zur verbesserten Glucose-Aufnahme in die Zellen beitragen.

Auch bei der Thyroidhormon-induzierten Thermogenese sind noch nicht alle Signalwege bekannt. Thyroidhormone sind in der Lage durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung von der Atmungskette und die Induktion von UCP1 und UCP3 die Thermogenese zu fördern. TRIAC (3) scheint dabei noch wesentlich potenter als T3 (2) zu sein. Die UCP1 Expression wird durch TRIAC (3) etwa 10 bis 50 mal stärker induziert<sup>698</sup>. UCP1 wird zwar durch THR $\beta$ 1 reguliert<sup>108</sup> und TRIAC (3) hat im Vergleich zu T3 (2) eine etwas höhere Bindungs-Aktivität an THR $\beta$ <sup>8,9</sup>, jedoch ist eine bis zu 50 fach stärkere Induktion damit noch nicht erklärbar. Es wird angenommen, dass TRIAC (3) zusätzlich bei der Rekrutierung des Coaktivator PGC-1 $\alpha$  eine Rolle spielt<sup>698</sup>. Die UCP-Expression wird unter anderem auch durch PPAR $\gamma$  reguliert. Der Coaktivator PGC-1 $\alpha$  wird rekrutiert und ermöglicht die Bindung an das PPRE<sup>699,700</sup>. TRIAC (3) könnte somit die PPAR $\gamma$ -abhängige UCP-Expression durch den Einfluss auf PGC-1 $\alpha$  verbessern. Dies ist aber noch nicht nachgewiesen und auch hier könnten noch andere durch TRIAC (3) induzierte Signalwege eine Rolle spielen.

Die genomischen Signalwege der Thyroidhormone sind sehr komplex. Viele Zielgene werden auch von anderen nukleären Rezeptoren reguliert und oft kommt es nur durch eine gegenseitige Beeinflussung zu entsprechenden physiologischen Effekten. Damit ist es zum Teil schwer nachvollziehbar welche molekularen Mechanismen für eine bestimmte Wirkung verantwortlich sind. Meist trägt eine Vielzahl einzelner genomischer Effekte zu der letztendlich resultierenden Wirkung bei. Die Entdeckung der nicht-genomischen Signalwege, die auch zum Teil mit den genomischen Wirkungen interferieren, zeigen, dass die molekularen Prozesse, die durch Thyroidhormone beeinflusst werden, noch lange nicht vollständig bekannt sind.

## 2. Zielsetzung

In den letzten 20 Jahren wurde deutlich, dass die Physiologie der Thyroidhormone noch lange nicht vollständig aufgeklärt ist. Die erst kürzliche Entdeckung der nicht-genomischen Signalwege<sup>11</sup>, der aktiven Transporter, die nötig sind, um T4 (1), T3 (2) und rT3 (10) in Zellen zu befördern<sup>577</sup> und der alternativen Abbauege, die zur Bildung von zum Teil aktiven Metaboliten mit THR-unabhängigen Signalwegen führen<sup>575</sup>, verdeutlicht dass es noch viele offene Fragen gibt.



**Abbildung 30: Sind Thyroidhormone in der Lage auch andere nukleäre Rezeptoren zu modulieren?**

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Interaktion verschiedener Thyroidhormone mit anderen nukleären Rezeptoren. Da Thyroidhormone eine Fettsäure-mimetische Struktur besitzen, die typisch für Liganden zahlreicher nukleärer Rezeptoren ist und Thyroidhormone außerdem einige Wirkungen besitzen, die sich weder mit THR-Signalwegen noch mit den bekannten nicht-genomischen Signalwegen erklären lassen, stellt sich die Frage, ob Thyroidhormone auch THR-unabhängige genomische Wirkmechanismen besitzen (Abbildung 30).

Um dies zu ermitteln, wurde zu Beginn dieser Arbeit mit Hilfe des Gal4-Hybrid-Reporter-Gen-Assay-Systems ein *Screening* mit sechs verschiedenen repräsentativen Thyroidhormon-Derivaten an 14 mit dem THR verwandten nukleären Rezeptoren und den drei RXR-Subtypen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass Thyroidhormone, vor allem TETRAC (4), hoch potente PPAR $\gamma$ -Agonisten sind und zum Teil zusätzlich dessen Heterodimer-Partner RXR aktivieren können. Nachfolgend sollte daher die Interaktion der Thyroidhormone mit dem PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer durch vielfältige Methoden charakterisiert und der Bindungsmodus genauer untersucht werden. Außerdem sollte die biologische und physiologische Relevanz dieses neuen Signalweges in zellulären Systemen aber auch mit Hilfe von *in vivo*-Experimenten charakterisiert werden.



### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ Bindung

Mit Hilfe verschiedener Assay-Systeme konnte die Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ - und die Thyroidhormon-RXR-Bindung belegt werden. Zunächst wurde die Aktivität der Thyroidhormone an 14 nukleären Rezeptoren mit einem Gal4-Luciferase-Reporter-Gen-Assays evaluiert und eine starke Bindungs-Aktivität der Thyroidhormone an PPAR $\gamma$  und RXR konnte detektiert werden. Durch die Durchführung einer Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) und eines Coaktivator-Rekrutierungs-Assays, die zellfreie artifiziertere Assay-Systeme darstellen, konnte eine direkte Bindung zusätzlich verifiziert werden. Außerdem konnte durch eine Kristallstruktur-Analyse der genaue Bindungsmodus von TETRAC (4) in der PPAR $\gamma$ -LBD analysiert werden.

##### 3.1.1 Gal4-Luciferase-Reporter-Gen Assay

Zuerst wurde mit Hilfe eines Gal4-Luciferase-Reporter-Gen Assays ein *Screening* mit sechs verschiedenen Thyroidhormonen durchgeführt. Die sechs Thyroidhormon-Derivate T4 (1), T3 (2), rT3 (10), TETRAC (4), TRIAC (3) und 3,5-T2 (11) stellten eine repräsentative Auswahl der endogenen Thyroidhormone bzw. L-Thyroxin-Metabolite mit Fettsäuremimetika-Struktur dar und sollten auf mögliche Interaktionen mit anderen nukleären Rezeptoren untersucht werden. Dazu wurde ein Assay-System verwendet, bei dem HEK293T Zellen mit einem Gal4-Rezeptor-Fusionsplasmid und einem *Firefly*-Luciferase-Plasmid, sowie einem Renilla-Plasmid transfiziert wurden. Transfiziert wurde mit einer Lipofektions-Methode, bei der zunächst Liposomen gebildet wurden, die die entsprechenden Plasmide umschloßen, welche anschließend über Endozytose in die Zellen gelangten. Das Gal4-Rezeptor-Fusionsplasmid bestand dabei aus einem Hybrid der DNA-Sequenz der nicht-humanen DBD des Hefe-Rezeptors Gal4 und der *hinge*-Region, sowie der LBD des entsprechenden zu untersuchenden nukleären Rezeptors und einem Cytomegalievirus (CMV)-Promotor, der konstitutiv aktiviert wurde. Das *Firefly*-Luciferase-Plasmid enthielt ein *Response* Element für die DBD von Gal4. Nach konstitutiver Expression des entsprechenden Gal4-Rezeptor-Fusionsproteins kam es zur Bindung der Testsubstanz in der Ligandenbindungstasche des nukleären Rezeptors. Dies führte zu einer Konformationsänderung der Helix 12 des Rezeptors und einer Rekrutierung von Cofaktoren und letztendlich zu einer Bindung der DBD des Gal4-Rezeptor-Fusionsproteins an das nicht-humane Gal4-*Response* Element in der Promotor-Region des *Firefly*-Luciferase-Plasmids. Nach Bindung an das Gal4-*Response* Element des *Firefly*-Luciferase-Plasmids, kam es zur Expression des *Firefly*-Luciferase-Enzyms. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das *Firefly*-Luciferase-Substrat Luciferin

wurde hinzugefügt. Das *Firefly*-Luciferase-Enzym katalysierte die Oxidation des Luciferins zu Oxyluciferin. Bei dieser Biolumineszenzreaktion wurden Photonen emittiert und ein Lumineszenz-Signal konnte detektiert werden<sup>701</sup>. Für die Normalisierung der Daten wurde zusätzlich ein Renilla-Plasmid transfiziert, dessen Promotor konstitutiv aktiviert wurde und daher für eine Testsubstanz-unabhängige Expression des Renilla-Enzyms sorgte. Nach Lyse und Messung der Lumineszenz nach Luciferin-Zugabe wurde ein *Firefly*-Luciferase-Inhibitor und ein Renilla-Luciferase-Substrat (Coelenterazin) hinzugefügt. Das Renilla-Enzym katalysierte die biolumineszente Umsetzung des Coelenterazins und ein weiteres Lumineszenz-Signal wurde gemessen. Dieses Lumineszenz-Signal spiegelte durch die konstitutive Expression des Renilla-Enzyms die Transfektions-Effizienz, sowie die Anzahl der Zellen und damit auch die Zell-Toxizität der Testsubstanz wider<sup>701–703</sup>.

Um die Bindungs-Aktivität der Testsubstanz auszuwerten, wurde der entsprechende Lumineszenz-Wert nach Zugabe des *Firefly*-Luciferase-Substrats durch den Wert nach Zugabe des Renilla-Luciferase-Substrats dividiert und dieser Quotient mit 1000 multipliziert. Durch diese Normalisierung konnten Einflüsse, wie z.B. die Transfektions-Effizienz, bei der Auswertung der Aktivitäts-Daten ausgeschlossen werden. Die verschiedenen Bindungs-Aktivitäts-Daten der Testsubstanzen wurden als *fold* Aktivierung, bei der man die *relative light unit* (RLU)-Werte der Testsubstanz mit einer Negativ-Kontrolle ins Verhältnis setzt, verglichen. Durch die Messung der *fold* Aktivierung bei verschiedenen Konzentrationen einer Testsubstanz ergab sich eine sigmoidale Aktivitätskurve, die mit Hilfe einer nicht-linearen Regression zur Berechnung des EC<sub>50</sub>-Wertes diente. Der EC<sub>50</sub>-Wert entsprach jeweils dem Wendepunkt der sigmoidalen Aktivitätskurve. Je niedriger der EC<sub>50</sub>-Wert, desto potenter war die Testsubstanz.

Trotz des artifiziellen Charakters des Gal4-Luciferase-Reporter-gen Assays, verglichen mit Vollängen-Rezeptor-basierten Assays, die physiologische Bedingungen besser simulieren, bietet das Gal4-Testsystem einige Vorteile. Es kommt beispielsweise nicht zu einer unspezifischen Bindung des Gal4-Response Elements, da eine nicht-humane DBD in Form von Gal4 verwendet wird. Dies begünstigt eine deutlich empfindlichere Detektion des Lumineszenz-Signals, da das sog. „Hintergrund-Rauschen“ minimiert wird. Außerdem werden dennoch die zellulären Gegebenheiten berücksichtigt und somit zumindest teilweise die physiologischen Bedingungen der Bindung wiedergespiegelt. Beispielsweise wird der Transport über Membran-Barrieren, der Einfluss metabolischer Enzyme und einige andere zelluläre Aspekte berücksichtigt.

	PPAR $\alpha$	PPAR $\gamma$	PPAR $\delta$	FXR	LXR $\alpha$	LXR $\beta$	RXR $\alpha$	RXR $\beta$	RXR $\gamma$	RAR $\alpha$	RAR $\beta$	RAR $\gamma$	VDR	CAR
T4 (1)	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
T3 (2)	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
rT3 (10)	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
TETRAC (4)	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Green
TRIAC (3)	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
3,5-T2 (11)	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

bei 10 $\mu$ M fold Akt. < 5	bei 10 $\mu$ M fold Akt. $\geq$ 5	bei 10 $\mu$ M fold Akt. $\geq$ 10
---------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------------

**Abbildung 31: heatmap** der agonistischen Aktivität verschiedener Thyroidhormone (bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M) an 14 unterschiedlichen nukleären Rezeptoren bestimmt in einem Gal4-Luciferase-Reportergen Assay (HEK293T-Zellen). Die Ergebnisse wurden als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n  $\geq$  3, Duplikate.

Insgesamt wurden 14 nukleäre Rezeptoren, die mit dem THR verwandt sind oder zu den drei RXR-Subtypen gehören, untersucht. Dabei konnte eine starke Potenz der Thyroidhormone an PPAR $\gamma$  detektiert werden. Vor allem die Thyroidhormone T4 (1), TETRAC (4) und TRIAC (3) besaßen eine hohe *fold* Aktivierung. Die Iodthyroacetate zeigten zudem bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M eine Bindungs-Aktivität an den unterschiedlichen RXR-Subtypen. TETRAC (10  $\mu$ M, 4) aktivierte alle drei RXR-Subtypen (fold Akt.  $\pm$  SEM: RXR $\alpha$  = 8,9  $\pm$  0,9; RXR $\beta$  = 24  $\pm$  2; RXR $\gamma$  = 7,8  $\pm$  1,3) und zudem mit etwas geringerer Bindungs-Aktivität die Rezeptoren PPAR $\delta$  (fold Akt.  $\pm$  SEM: 6,5  $\pm$  0,1), RAR $\alpha$  (fold Akt.  $\pm$  SEM: 7,9  $\pm$  1,9) und VDR (fold Akt.  $\pm$  SEM: 7,7  $\pm$  1,2). TRIAC (10  $\mu$ M, 3) aktivierte die beiden RXR-Subtypen RXR $\alpha$  (fold Akt.  $\pm$  SEM: 6,4  $\pm$  0,3) und RXR $\beta$  (fold Akt.  $\pm$  SEM: 7,5  $\pm$  1,1). Zudem war auch T4 (1) in der Lage RXR $\alpha$  zu aktivieren, jedoch mit einer niedrigeren Potenz (Tabelle 16).

An sämtlichen anderen untersuchten Rezeptoren zeigte sich keine bzw. nur eine geringfügige Aktivität der Thyroidhormone (Abbildung 31). Daraus lässt sich schließen, dass Thyroidhormone, darunter vor allem T4 (1) und die Iodthyroacetate TETRAC (4) und TRIAC (3), neben dem THR selektiv PPAR $\gamma$  und den Heterodimer-Partner der beiden nukleären Rezeptoren, RXR, binden.

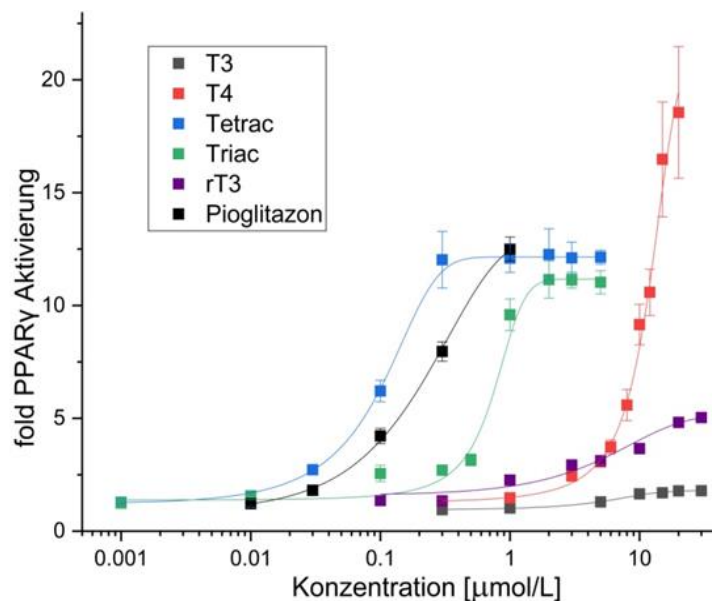
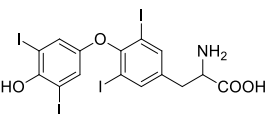
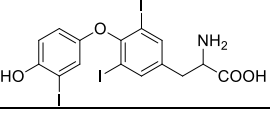
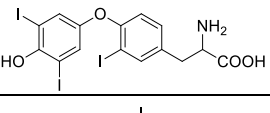
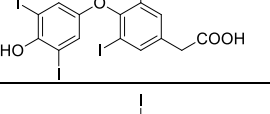
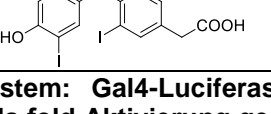


Abbildung 32: PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven der verschiedenen Thyroidhormone und Pioglitazon (7) im Vergleich. Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reporter-gen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen (einzelne PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1 Abbildung 61-66).

Tabelle 16: Bestimmung der Bindungs-Aktivität von Thyroidhormonen an einer Auswahl nukleärer Rezeptoren.

Thyroidhormon		PPAR $\gamma$	RXR $\alpha$
		EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (max. Akt.) <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (max. Akt.) <sup>a</sup>
<b>T4</b> (1)		12 $\pm$ 1 (22 $\pm$ 3 fold)	15,4 $\pm$ 0,1 (7,4 $\pm$ 0,1 fold)
<b>T3</b> (2)		5,8 $\pm$ 0,7 (1,8 $\pm$ 0,1 fold)	i.a.
<b>rT3</b> (10)		3,8 $\pm$ 0,6 (5,2 $\pm$ 0,3 fold)	i.a.
<b>TETRAC</b> (4)		0,10 $\pm$ 0,01 (17,0 $\pm$ 0,9 fold)	1,32 $\pm$ 0,09 (9,1 $\pm$ 0,3 fold)
<b>TRIAC</b> (3)		0,37 $\pm$ 0,05 (11,4 $\pm$ 0,3 fold)	12 $\pm$ 2 (13 $\pm$ 2 fold)

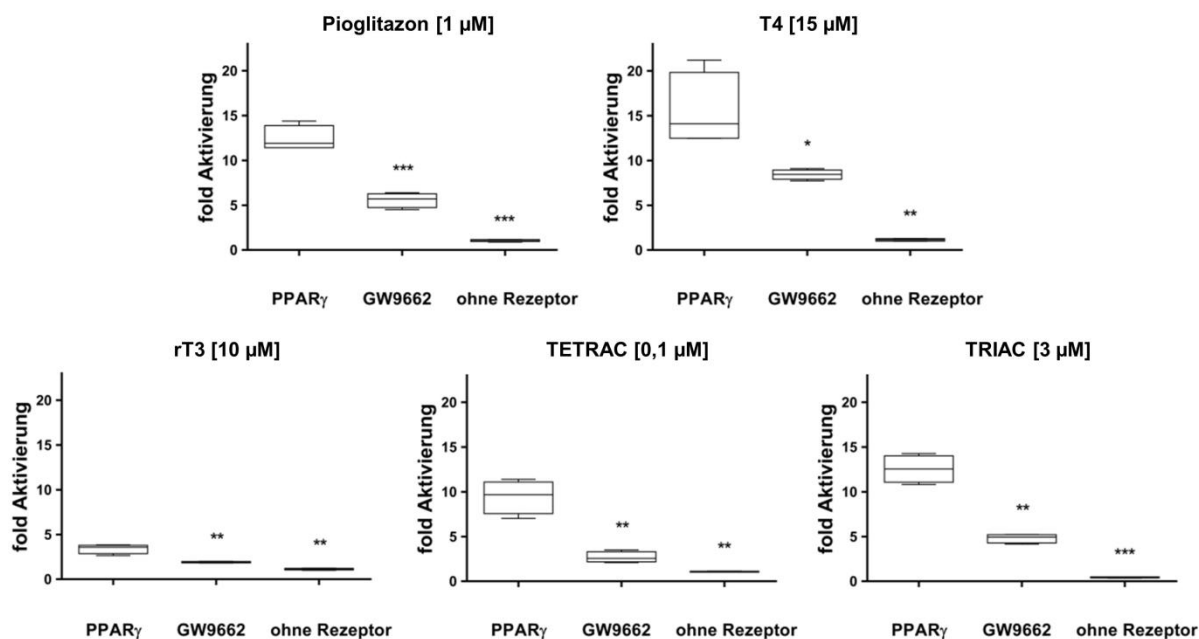
Assay-System: Gal4-Luciferase-Reporter-gen Assay in HEK293T-Zellen, <sup>a</sup> Die Ergebnisse wurden als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, i.a. = inaktiv bei 10  $\mu$ M (einzelne Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1 Abbildung 61-69).

Die PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven und die ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte der verschiedenen Thyroidhormone und der Referenz-Substanz Pioglitazon (**7**) zeigten, dass Thyroidhormone sehr potente PPAR $\gamma$ -Agonisten mit hoher maximaler Aktivierung sind (Abbildung 32 und Tabelle 16, einzelne PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1 Abbildung 61-66). Verglichen mit der Aktivierungs-Effizienz des Referenz-Agonisten Pioglitazon (**7**, 16  $\pm$  1 fold) besaß T4 (**1**, 22  $\pm$  3 fold) eine höhere maximale Aktivierung. TETRAC (**4**) hingegen zeigte eine ähnliche Aktivierungs-Effizienz (17,0  $\pm$  0,9 fold), war jedoch wesentlich potenter als Pioglitazon (**7**) (EC<sub>50</sub>(TETRAC, **4**) = 0,10  $\pm$  0,01  $\mu$ M; EC<sub>50</sub>(Pioglitazon, **7**) = 0,35  $\pm$  0,06  $\mu$ M). Während die Triiodthyronine T3 (**2**, EC<sub>50</sub> = 5,8  $\pm$  0,7  $\mu$ M; 1,8  $\pm$  0,1 fold) und rT3 (**10**, EC<sub>50</sub> = 3,8  $\pm$  0,6  $\mu$ M; 5,2  $\pm$  0,3 fold) nur eine geringe maximale Aktivierung und Potenz an PPAR $\gamma$  besaßen, war das Diiodthyronin 3,5-T2 (**11**) nicht in der Lage PPAR $\gamma$  zu aktivieren.

Vor allem die deaminierten Iodthyroacetate, deren chemische Struktur am stärksten verwandt mit der Struktur von Fettsäuren ist, da sie keine Aminosäure-Funktion, sondern eine freie Carbonsäure aufweisen, besaßen im Gal4-Luciferase-Reporter-gen Assay eine hohe Potenz an PPAR $\gamma$  (EC<sub>50</sub>(TETRAC, **4**) = 0,10  $\pm$  0,01  $\mu$ M; EC<sub>50</sub>(TRIAC, **3**) = 0,37  $\pm$  0,05  $\mu$ M).

Die Interaktion einer Carboxyl-Gruppe oder eines bioisosteren Ersatzes einer Carboxyl-Gruppe ist essentiell für die Bindung von PPAR $\gamma$ -Liganden<sup>304</sup>. Die hydrophoben Wechselwirkungen der meisten PPAR $\gamma$ -Liganden hingegen tragen nur wenig zur Ligandenbindung bei und sind eher unspezifisch. Daher sind PPAR $\gamma$ -Liganden strukturell relativ unterschiedlich<sup>30</sup>. Nach oxidativer Deaminierung stellen die Thyroidhormone in Form von Iodthyroacetaten folglich potenzielle PPAR $\gamma$ -Liganden dar. Dies konnte im Gal4-Luciferase-Reporter-gen Assay verifiziert werden.

T4 (**1**), TETRAC (**4**) und TRIAC (**3**) wiesen zudem eine Bindungs-Aktivität am Heterodimer-Partner von THR und PPAR $\gamma$ , dem RXR, auf. Exemplarisch wurden die EC<sub>50</sub>-Werte der Bindung mit RXR $\alpha$  ermittelt. Während T4 (**1**) und TRIAC (**3**) den Rezeptor mit einer eher geringen Potenz aktivierten (EC<sub>50</sub>(T4, **1**) = 15,4  $\pm$  0,1  $\mu$ M; 7,4  $\pm$  0,1 fold; EC<sub>50</sub>(TRIAC, **3**) = 12  $\pm$  2  $\mu$ M; 13  $\pm$  2 fold), wies das Iodthyroacetat TETRAC (**4**) eine deutlich höhere Potenz auf (EC<sub>50</sub>(TETRAC, **4**) = 1,32  $\pm$  0,09  $\mu$ M; 9,1  $\pm$  0,3 fold). Die Triiodthyronine und das Diiodthyronin 3,5-T2 (**11**) zeigten keine Bindungs-Aktivität an RXR. Insgesamt war die Bindungs-Aktivität an RXR geringer verglichen mit der Aktivität an PPAR $\gamma$  (RXR $\alpha$ -Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1 Abbildung 67-69). Jedoch könnte die Bindung von RXR, als Heterodimer-Partner von PPAR $\gamma$  von Bedeutung sein. Dies wurde unter anderem während der Untersuchung der Coaktivator-Rekrutierung (siehe Kapitel 3.1.3) evaluiert.

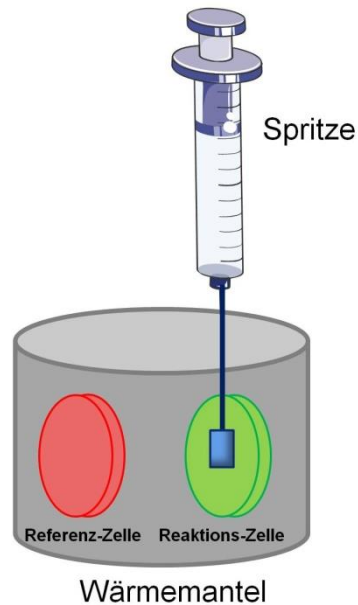


**Abbildung 33: Kontrollversuche zur Verifizierung der PPAR $\gamma$ -Aktivierung im Gal4-Luciferase-Reporter-Gen-Assay.** Nach Zugabe einer 10  $\mu$ molaren Lösung des PPAR $\gamma$  Antagonisten GW9662 (24) war das Lumineszenz-Signal der an PPAR $\gamma$  aktiven Thyroidhormon-Derivate signifikant verringert. Außerdem kam es zu einer signifikanten Verringerung des Lumineszenz-Signal, wenn ein Experiment ohne Transfektion eines Gal4-Rezeptor-Fusionsplasmids durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n = 4, Duplikate, HEK293T-Zellen, zweiseitiger *Student's* t-test: n.s. - nicht signifikant, # p < 0,1; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Um die direkte PPAR $\gamma$ -Aktivierung zu verifizieren, wurden zwei Kontrollversuche durchgeführt. In einem ersten Kontrollversuch wurde nach der Transfektion ein Gemisch aus dem entsprechenden Thyroidhormon in einer Konzentration im Bereich des ermittelten EC<sub>50</sub>-Wertes und 10  $\mu$ M des kovalent bindenden PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW9662 (24) zur Inkubation verwendet. Durch das Blockieren der Ligand-Bindetasche durch GW9662 (24), sollte die Bindung der Thyroidhormone verhindert werden. Für alle an PPAR $\gamma$  aktiven Thyroidhormone und auch für die Positivkontrolle Pioglitazon (7) konnte eine signifikante Reduktion des Lumineszenz-Signals detektiert werden. In einem zweiten Kontrollversuch wurde ausschließlich eine Transfektion des *Firefly*-Luciferase-Plasmids und des Renilla-Plasmids ohne ein Gal4-Rezeptor-Fusionsplasmid durchgeführt. Ohne die Transfektion eines Rezeptor-Plasmids zeigte sich für alle Testsubstanzen ein signifikant vermindertes Lumineszenz-Signal. Anhand dieser Kontrollversuche konnte ausgeschlossen werden, dass das Lumineszenz-Signal, das durch die Zugabe der Thyroidhormone induziert wurde, unabhängig von einer Rezeptor-Bindung entstand. Außerdem verhinderte die Blockade der PPAR $\gamma$ -Bindungstasche durch GW9662 (24) eine Aktivierung des Rezeptors (Abbildung 33). Somit musste eine direkte Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung vorliegen.

### 3.1.2 ITC

Um die Ergebnisse des Gal4-Luciferase-Reportergen-Assays zu bestätigen, wurden anschließend eine ITC-Messungen mit den rekombinanten Proteinen der PPAR $\gamma$ -LBD und RXR $\alpha$ -LBD durchgeführt.

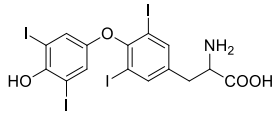
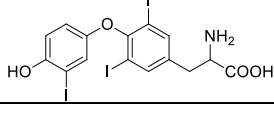
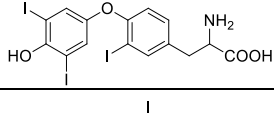
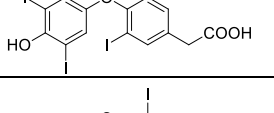
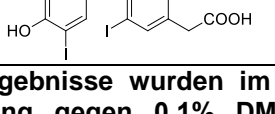


**Abbildung 34: Schematischer Aufbau eines ITC-Gerätes. Die Referenz-Zelle und die Reaktionszelle werden von einem Mantel umgeben, der in beiden Zellen für eine konstante Temperatur sorgt. Wird durch die Spritze eine Substanz- oder Protein-Lösung in die Reaktions-Zelle injiziert, die entsprechende andere Lösung enthält, und es kommt zu einer Bindung, wird die Wärmeenergie die dabei frei oder verbraucht wird durch den Wärmemantel ausgeglichen und registriert. Diese Änderung der hinzugegebenen Wärmemenge wird pro Injektion aufgezeichnet und dient der Ermittlung einer Titrationskurve<sup>704</sup>.**

Die ITC ist eine zellfreie Methode und dient der Bestimmung verschiedener Bindungskonstanten. Dabei wird eine Referenz-Zelle mit Wasser gefüllt und konstant auf 25°C beheizt. Die Reaktions-Zelle wird entweder mit einer Lösung des entsprechenden Proteins oder der Testsubstanz befüllt. Über der Reaktions-Zelle befindet sich eine Spritze in die die jeweils andere Lösung gefüllt wird und aus der injektionsweise mit einem gewissen Zeitabstand ein bestimmtes Volumen zur Reaktions-Zelle titriert wird. Auf Grund der limitierten Löslichkeit der Thyroidhormone im ITC-Puffer wurde jeweils eine inverse Titration durchgeführt, bei der sich die Protein-Lösung in der Spritze und die Testsubstanz-Lösung in der Reaktions-Zelle befand. Da die Reaktions-Zelle ein größeres Volumen besitzt und zudem die Lösung kontinuierlich gerührt wird, werden in die Reaktions-Zelle die Lösungen mit schlechterer Löslichkeit gefüllt. Auch die Reaktions-Zelle wurde konstant auf 25°C beheizt. Wenn nach der jeweiligen Injektion eine Bindung zwischen Testsubstanz und Protein auftritt,

wird Energie in Form von Wärme frei oder verbraucht. Der Mantel, der die Reaktions-Zelle umschließt registriert diese Wärmeänderung in der Zelle und passt die Wärmemenge, die über den Mantel hinzugegeben wird, um die Temperatur konstant zu halten, an (Abbildung 34). Diese veränderte Wärmemenge wird aufgezeichnet und die entstehenden Peaks können integriert werden und ergeben eine Titrationskurve aus der die entsprechenden Bindungskonstanten berechnet werden können. Neben der Dissoziationskonstante  $K_D$ , kann die Reaktionsenthalpie ( $\Delta H$ ) und das stöchiometrische Verhältnis der Bindung ( $n$ ) ermittelt werden. Anschließend kann anhand der Daten auch die Entropie ( $\Delta S$ ) und die freie Enthalpie (Gibbs-Energie,  $\Delta G$ ) bestimmt werden<sup>704</sup>.

**Tabelle 17: Messung der  $K_D$ -Werte mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC).**

Thyroidhormon		PPAR $\gamma$		RXR $\alpha$	
		EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (max. Akt.) <sup>a</sup>	$K_D$ [ $\mu$ M] <sup>b</sup>	EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (max. Akt.) <sup>a</sup>	$K_D$ [ $\mu$ M] <sup>b</sup>
<b>T4</b> (1)		12 ± 1 (22 ± 3 fold)	0,40 ± 0,04	15,4 ± 0,1 (7,4 ± 0,1 fold)	0,93 ± 0,01
<b>T3</b> (2)		5,8 ± 0,7 (1,8 ± 0,1 fold)	0,71 ± 0,01	i.a.	n.d.
<b>rT3</b> (10)		3,8 ± 0,6 (5,2 ± 0,3 fold)	0,63 ± 0,02	i.a.	n.d.
<b>TETRAC</b> (4)		0,10 ± 0,01 (17,0 ± 0,9 fold)	0,11 ± 0,03	1,32±0,09 (9.1±0.3 fold)	1,52 ± 0,26
<b>TRIAC</b> (3)		0,37 ± 0,05 (11,4 ± 0,3 fold)	0,20 ± 0,01	12 ± 2 (13 ± 2 fold)	1,32 ± 0,05

<sup>a</sup> Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen-Assay (HEK293T-Zellen) als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO ± S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate (einzelne Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1 Abbildung 61-69).

<sup>b</sup> Die Ergebnisse wurden mittels ITC bestimmt,  $n = 2$  (siehe Anhang Kapitel 5.2.2 Abbildung 72-79), alle Fehler wurden als ± S.E.M. angegeben.

i.a. = inaktiv bei 10  $\mu$ M, n.d. = nicht definiert.

Alle im Gal4-Luciferase-Reportergen-Assay getesteten Thyroidhormone, die eine Aktivität an PPAR $\gamma$  bzw. RXR $\alpha$  aufwiesen, zeigten auch während der ITC-Messungen eine Bindungs-Affinität. Vergleicht man die ermittelten  $K_D$ -Werte mit den EC<sub>50</sub>-Werten ergaben sich für TETRAC (4) und TRIAC (3) nahezu identische Werte für zelluläre Bindungs-Potenz und Bindungs-Affinität zum Protein. T4 (1), T3 (2) und rT3 (10) zeigen eine deutlich höhere



Bindungs-Affinität im ITC verglichen mit den Aktivitäts-Daten im zellulären Assay-System (Tabelle 17). Eine mögliche Begründung könnte sein, dass alle drei Thyroidhormon-Derivate aktive Transporter, wie MCTs oder OATs benötigen um Zellmembranen zu überwinden<sup>590-593</sup>. MCT8, MCT10 und OAT1C1 besitzen dabei die größte Thyroidhormon-Selektivität. Die MCTs sind sowohl in der Peripherie als auch in einigen Hirnarealen exprimiert. Während MCT10 ubiquitär exprimiert wird, ist MCT8 ebenfalls in sehr vielen Kompartimenten, unter anderem auch in Nierenzellen zu finden<sup>592,705</sup>. OAT1C1 ist vermutlich hauptsächlich für den Transport von Thyroidhormonen über die Blut-Hirn-Schranke und in anderen Arealen des Gehirns verantwortlich. In zellulären Assay-Systemen, bei denen Zelllinien genutzt werden, die diese Transporter exprimieren, können daher abweichende Ergebnisse für die Potenz beobachtet werden, die durch die Membran-Barriere und aus einer Übersättigung der aktiven Transporter resultieren können. Sowohl der Transport in die Zelle, wie auch der Export können dadurch beeinflusst werden. In diesen Fällen, z.B. auch bei der Verwendung der Nierenzelllinie HEK293T, können die Aktivitätsdaten zellulärer Assay-Systeme von den Daten, die durch eine einer zellfreie Messung bestimmt wurden, abweichen.

**Tabelle 18: Bindungskonstanten der Interaktion verschiedener Thyroidhormone mit PPAR $\gamma$ .**

Thyroidhormon	n	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/(mol*K)]	$\Delta G$ [kJ/mol]
<b>T4 (1)</b>	1,00 $\pm$ 0,01	-36,6 $\pm$ 0,7	-0,2 $\pm$ 1,3	-36,8 $\pm$ 0,5
<b>T3 (2)</b>	1,02 $\pm$ 0,01	-15,4 $\pm$ 0,5	66,1 $\pm$ 1,5	-35,1 $\pm$ 0,1
<b>rT3 (10)</b>	1,02 $\pm$ 0,02	-24,0 $\pm$ 1,0	38,3 $\pm$ 3,2	-35,4 $\pm$ 0,1
<b>TETRAC (4)</b>	1,01 $\pm$ 0,01	-71,6 $\pm$ 3,4	-106,9 $\pm$ 13,4	-39,7 $\pm$ 0,6
<b>TRIAC (3)</b>	1,02 $\pm$ 0,01	-54,5 $\pm$ 0,6	-54,5 $\pm$ 2,6	-38,3 $\pm$ 0,2

Die Daten wurden mittels ITC erhoben, n = 2 (siehe Anhang Kapitel 5.2.2 Abbildung 72-76), alle Fehler sind als  $\pm$  S.E.M. angegeben.

Alle getesteten Thyroidhormone zeigten eine Stöchiometrie der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung von 1:1. Die am stärksten exotherme Bindung wies TETRAC (4) auf, während bei der T3- und rT3-PPAR $\gamma$ -Bindung eine weniger stark exotherme Reaktion vorlag. Die T3- und rT3-Bindung war jedoch entropisch begünstigt im Vergleich zu der Bindung der anderen Thyroidhormone. Insgesamt schien die PPAR $\gamma$ -Bindung der deaminierten Thyroidhormon-Derivate vor allem stark exotherm begünstigt zu sein. Die Bindung der Thyroidhormone T4 (1), T3 (2) und rT3 (10) hingegen war schwächer exotherm, jedoch entropisch günstiger als die Bindung der Iodthyroacetate. Alle Bindungen liefen freiwillig exergonisch ab. Die freie Enthalpie war zudem bei allen Thyroidhormonen in einem ähnlichen Bereich (Tabelle 18).

**Tabelle 19: Bindungskonstanten der Interaktion verschiedener Thyroidhormone mit RXR $\alpha$ .**

Thyroidhormon	n	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/(mol*K)]	$\Delta H$ [kJ/mol]
<b>T4 (1)</b>	1,01 $\pm$ 0,04	-37,8 $\pm$ 0,5	-11,3 $\pm$ 1,9	-34,4 $\pm$ 0,1
<b>TETRAC (4)</b>	1,02 $\pm$ 0,01	-24,4 $\pm$ 0,1	29,7 $\pm$ 1,8	-33,3 $\pm$ 0,4
<b>TRIAC (3)</b>	0,98 $\pm$ 0,02	-15,1 $\pm$ 0,4	61,9 $\pm$ 1,7	-33,6 $\pm$ 0,1

Die Daten wurden mittels ITC erhoben, n = 2 (siehe Anhang Kapitel 5.2.2 Abbildung 77-79), alle Fehler sind als  $\pm$  S.E.M. angegeben.

Auch die Thyroidhormon-RXR $\alpha$ -Bindung besaß eine Stöchiometrie von 1:1. Die Bindung von T4 (1), TETRAC (4) und TRIAC (3) lief jeweils exotherm ab. Die T4-RXR $\alpha$ -Bindung schien entropisch zwar nicht begünstigt zu sein, jedoch überwog der stark exotherme Charakter der Bindung. Im Gegensatz zur PPAR $\gamma$ -Bindung war die RXR $\alpha$ -Bindung der deaminierten Thyroidhormon-Derivate entropisch begünstigt. Sowohl die Bindung von T4 (1), als auch die von TETRAC (4) und TRIAC (3) waren exergonisch (Tabelle 19).

Mittels ITC-Messungen konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es zu einer direkten Bindung der Thyroidhormone an PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  kommt. Auch in diesem artifiziellen, zellfreien System zeigte sich eine starke Bindungs-Affinität der verschiedenen Thyroidhormone. Desweiteren konnte die Bindung an Hand verschiedener Bindungskonstanten näher charakterisiert werden.

### 3.1.3 Coaktivator-Rekrutierungs-Assay

Im zellfreien Coaktivator-Rekrutierungs-Assay wurde zusätzlich nachgewiesen, dass die beiden Iodothyroacetat-Derivate TETRAC (4) und TRIAC (3) nach der Bindung an PPAR $\gamma$  in der Lage waren die Rekrutierung der Coaktivatoren SRC-1 und CBP zu induzieren.

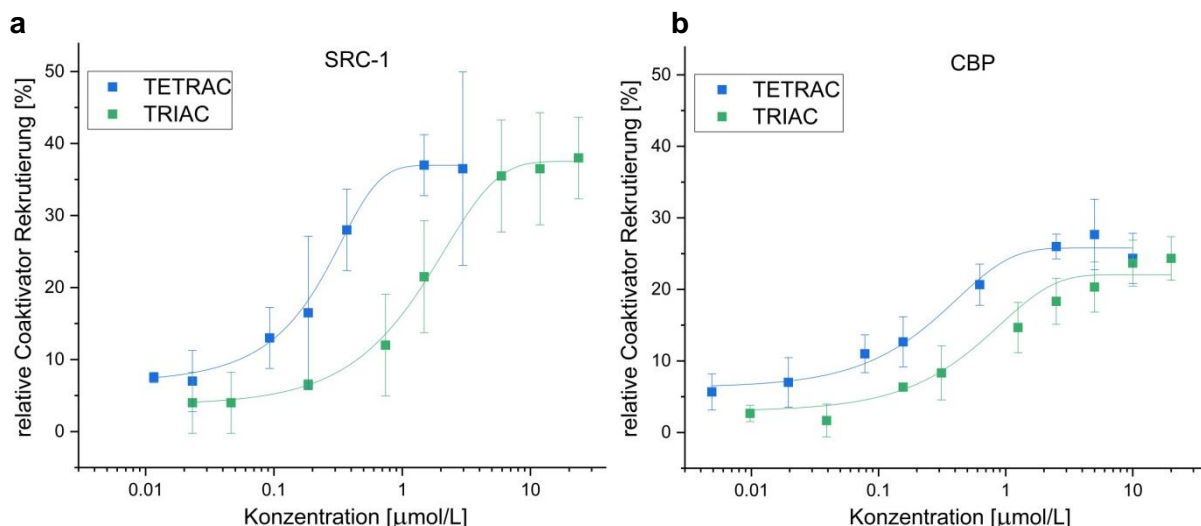
Bei einem Coaktivator-Rekrutierungs-Assay (*homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer* (HT-FRET) Assay) werden zwei Methoden miteinander kombiniert. Zum einen wird die *time-resolved fluorometry* (TRF) zum anderen der Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) verwendet. Bei der TRF wird Energie, z.B. in Form eines Lasers für Nano- bzw. Picosekunden verwendet, um die Elektronen eines Fluorophors anzuregen und in ein energiereicheres Niveau zu bringen. Dieser Zustand ist relativ instabil und nach kurzer Zeit kommt es zu einer Rückkehr der Elektronen in das Ausgangs-Energieniveau. Das Fluorophor emittiert zudem, bei der Rückkehr der Elektronen, ein Lichtsignal bei einer charakteristischen Wellenlänge.

Bei dem FRET handelt es sich um einen strahlungsfreien Transfer von Energie, sobald ein entsprechender FRET-Donor mit einem FRET-Akzeptor in enge Nachbarschaft von etwa 10 bis 100 Å gebracht wird. Der Energie-Transfer wird dabei nicht über Photonen, sondern über eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung übertragen. Da der Transfer dieser Energie nicht direkt messbar ist, werden häufig Fluoreszenzfarbstoffe als FRET-Donor und Akzeptor verwendet. Durch die TRF kann die Energieübertragung evaluiert werden. Eine Anregung eines FRET-Donors, der meist aus Lanthanoid-Komplexen, wie z.B. Terbium-Kryptat besteht, führt zu einer Emission von Licht einer charakteristischen Wellenlänge. Auf Grund ihrer langen Emissions-Dauer verwendet man meist Lanthanoide. Dadurch kann das Fluoreszenz-Signal über einen längeren Zeitraum erfasst und somit die „Hintergrund-Fluoreszenz“ minimiert werden. Durch die FRET-Energieübertragung von Donor zu Akzeptor, wird die Fluoreszenz-Intensität (FI) des Donors verringert. Die Intensität der FRET-Akzeptor-Fluoreszenz wird hingegen erhöht<sup>706,707</sup>. Zur Auswertung des Experiments wird die Intensität der Fluoreszenz-Emission des Akzeptors mit der des Donors ins Verhältnis gesetzt. Durch die Kombination der TRF und des FRETs ist eine sehr empfindliche Bestimmung der Rekrutierung von Coaktivatoren möglich.

Im durchgeführten Versuch wurde ein PPAR $\gamma$ -LBD-Protein verwendet, das mit einem *green fluorescent protein* (GFP) *gelabelt* war und somit als Fluoreszenz-Resonanz Akzeptor diente. Der entsprechende Coaktivator wurde über Biotin mit einem Terbium-Kryptat *gelabelten* Streptavidin verknüpft und diente so als Fluoreszenz-Resonanz Donor.

Durch die Bindung von TETRAC (**4**) bzw. TRIAC (**3**) in die PPAR $\gamma$ -Ligand-Bindetasche, kam es zu einer Rekrutierung des entsprechenden Coaktivators. Somit wurden Akzeptor und Donor zusammengeführt. Da Donor und Akzeptor nahe genug beieinander waren, kam es zur Energieübertragung und die FI des Donors wurde geringer und die des Akzeptors wurde erhöht.

Als Coaktivatoren wurden SRC-1 und CBP ausgewählt. SRC-1 spielt vor allem bei der PPAR $\gamma$ -induzierten Thermogenese eine Rolle. Durch die Interaktion von SRC-1 mit PGC-1 $\alpha$  wird UCP1 vermehrt exprimiert und letztendlich die Thermogenese induziert<sup>699,700,708,709</sup>. CBP hingegen hat einen Einfluss auf die PPAR $\gamma$ -induzierte Adipocyten-Differenzierung<sup>710,711</sup>. PPAR $\gamma$  spielt vor allem in frühen Stadien der Adipocyten-Differenzierung eine Rolle, indem C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  rekrutiert werden<sup>237,242-244</sup>. CBP wird dabei vor allem bei der Induktion von C/EBP $\alpha$  rekrutiert<sup>710,711</sup>.



**Abbildung 35: Coaktivator-Rekrutierungs-Assay (agonistischer Modus). (a) Relative TETRAC- und TRIAC-induzierte Coaktivator Rekrutierung von SRC-1. (b) Relative TETRAC- und TRIAC-induzierte Coaktivator Rekrutierung von CBP. Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.**

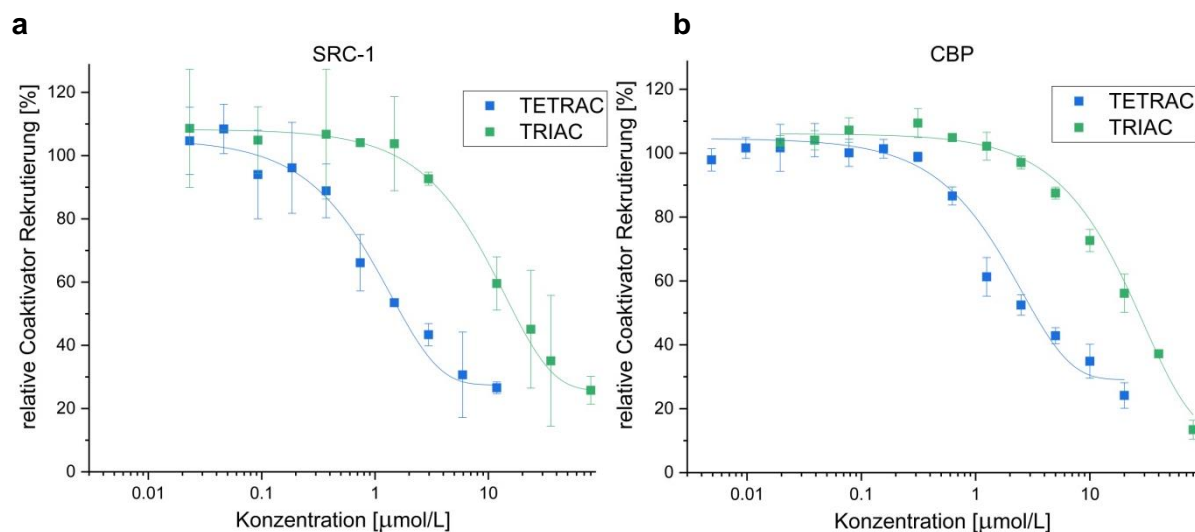
**Tabelle 20: EC<sub>50</sub>-Werte der Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 und CBP durch TETRAC (4) und TRIAC (3).**

Thyroidhormon	SRC-1	CBP
	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ] (max. Akt.) <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ] (max. Akt.) <sup>a</sup>
TETRAC (4)	0,26 $\pm$ 0,03 (37 $\pm$ 1%)	0,26 $\pm$ 0,07 (27 $\pm$ 1%)
TRIAC (3)	1,46 $\pm$ 0,09 (38 $\pm$ 1%)	1,1 $\pm$ 0,2 (28 $\pm$ 1%)

<sup>a</sup> Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.

Im agonistischen Modus wurde das nicht-ligandengebundene PPAR $\gamma$ -LBD-Protein verwendet und mit verschiedenen Konzentrationen TETRAC (4) bzw. TRIAC (3) inkubiert. Anschließend wurde die relative Coaktivator Rekrutierung ermittelt, indem der Quotient der FI von Akzeptor zu Donor nach Thyroidhormon-Inkubation mit dem Quotienten der FI von Akzeptor zu Donor nach Rosiglitazon-Inkubation ins Verhältnis gesetzt wurde. TETRAC (4) und TRIAC (3) waren beide in der Lage die Coaktivatoren SRC-1 und CBP zu rekrutieren. Die Rekrutierungs-Effizienz war geringer als die der Positiv-Kontrolle Rosiglitazon (23),

jedoch konnte die hohe PPAR $\gamma$ -Potenz der beiden Thyroidhormone auch in diesem Testsystem bestätigt werden (Abbildung 35 & Tabelle 20).



**Abbildung 36: Coaktivator-Rekrutierungs-Assay (antagonistischer Modus).** (a) Relative TETRAC- und TRIAC-induzierte Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 nach Verdrängung von Rosiglitazon (23). (b) Relative TETRAC- und TRIAC-induzierte Coaktivator Rekrutierung von CBP nach Verdrängung von Rosiglitazon (23). Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.

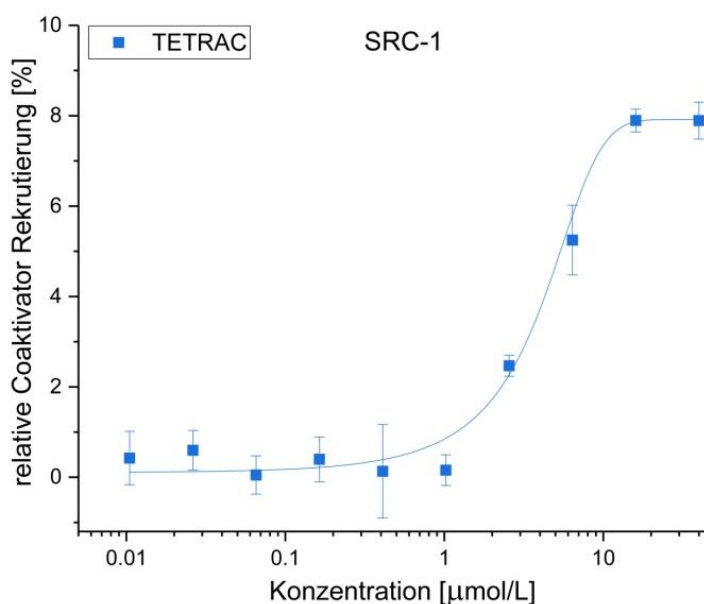
**Tabelle 21: IC<sub>50</sub>-Werte der Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 und CBP durch TETRAC (4) und TRIAC (3) nach Verdrängung von Rosiglitazon (23).**

Thyroidhormon	SRC-1	CBP
	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ] (max. Akt.) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ] (max. Akt.) <sup>a</sup>
TETRAC (4)	0,9 $\pm$ 0,1 (22 $\pm$ 7%)	1,4 $\pm$ 0,2 (28 $\pm$ 4%)
TRIAC (3)	11 $\pm$ 1 (20 $\pm$ 3%)	~ 30 (n.d.)

<sup>a</sup> Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate, n.d. = nicht definiert.

Eine weitere Messreihe im antagonistischen Modus, bei der Rosiglitazon (23) bereits gebunden an das PPAR $\gamma$ -LBD-Protein vorlag und die Verdrängung von Rosiglitazon (23) aus der Bindungstasche bestimmt wurde, wurde zusätzlich durchgeführt. Sowohl TETRAC (4) als auch TRIAC (3) waren in der Lage Rosiglitazon (23) aus der PPAR $\gamma$ -Bindungstasche zu verdrängen und anschließend die Coaktivatoren SRC-1 und CBP mit einer ähnlichen

Rekrutierungs-Effizienz zu rekrutieren, die im agonistischen Modus gemessen wurde (Abbildung 36 & Tabelle 21).



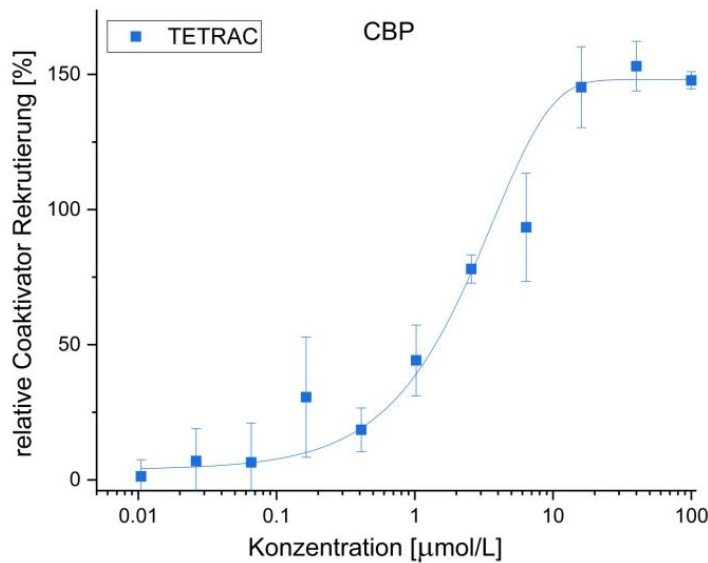
**Abbildung 37: TETRAC (4) induzierte Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 zur RXR $\alpha$ -LBD. Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.**

**Tabelle 22: EC<sub>50</sub>-Werte der Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 durch TETRAC-Bindung an RXR $\alpha$ .**

Thyroidhormon	SRC-1
	EC <sub>50</sub> [µM] (max. Akt.) <sup>a</sup>
TETRAC (4)	4,6 $\pm$ 0,5 (8 $\pm$ 1%)

<sup>a</sup> Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.

Neben der Rekrutierung von Coaktivatoren zur PPAR $\gamma$ -LBD wurde auch die Liganden-abhängige Rekrutierung von SRC-1 zur RXR $\alpha$ -LBD untersucht. Im Vergleich zur Positivkontrolle SR11237 war die Rekrutierungs-Effizienz jedoch sehr gering. Dennoch konnte eine Liganden-induzierte Rekrutierung von SRC-1 nach Inkubation mit TETRAC (4) nachgewiesen werden (Abbildung 37 & Tabelle 22).



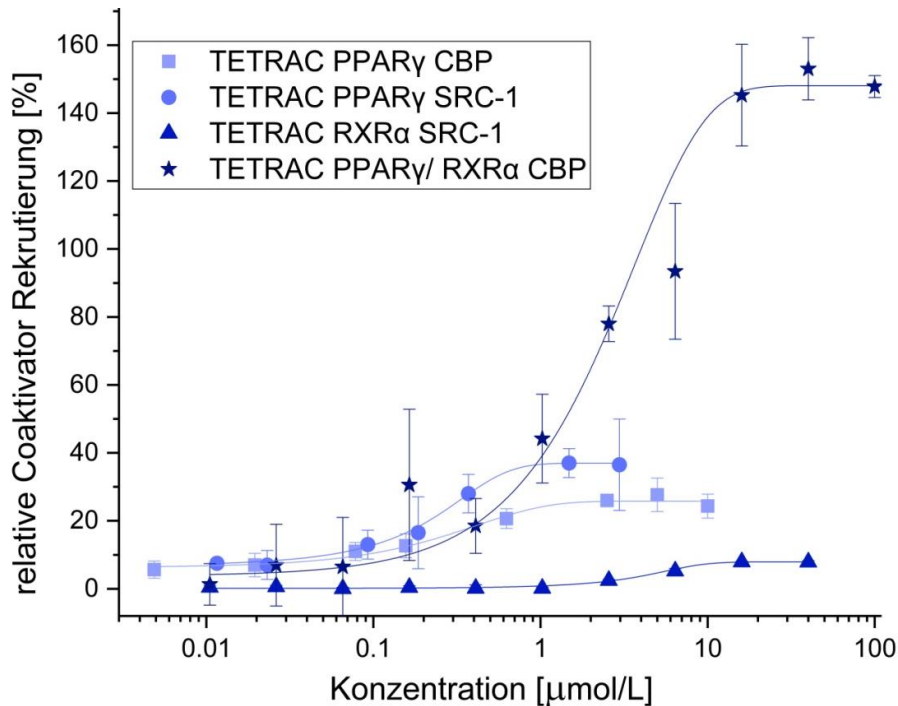
**Abbildung 38: TETRAC (4) induzierte Coaktivator Rekrutierung von CBP nach Bindung an das PPAR $\gamma$ /tRXR $\alpha$ -Heterodimer. Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.**

**Tabelle 23: EC<sub>50</sub>-Werte der Coaktivator Rekrutierung von CBP durch TETRAC- Bindung an das PPAR $\gamma$ /tRXR $\alpha$ -Heterodimer.**

Thyroidhormon	CBP
	EC <sub>50</sub> [μM] (max. Akt.) <sup>a</sup>
TETRAC (4)	3,4 $\pm$ 1,0 (162 $\pm$ 13%)

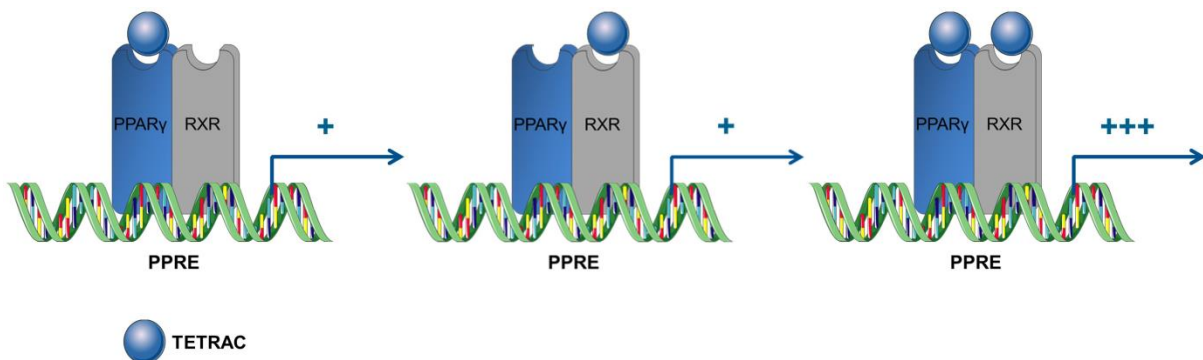
<sup>a</sup> Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.

Um die Coaktivator Rekrutierung von CBP zum PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimer zu evaluieren, wurde ein weiterer Assay durchgeführt. Dabei wurde ein PPAR $\gamma$ -LBD-Protein ohne GFP-Marker mit einer Lösung eines GFP-markierten RXR $\alpha$ -LBD-Proteins gemischt. Da das PPAR $\gamma$ -Monomer nicht *gelabelt* war und ein RXR-Monomer eingesetzt wurde (tRXR), das durch eine mutierte Coaktivator Bindungsstelle nicht in der Lage war Coaktivatoren zu rekrutieren, konnte ein Fluoreszenz-Resonanz-Signal nur nach Rekrutierung von CBP zum PPAR $\gamma$ :RXR $\alpha$  Heterodimer erfolgen. Die Rekrutierungs-Effizienz war im Vergleich zu der Monomer-Rekrutierung deutlich erhöht (Abbildung 38 & Tabelle 23).



**Abbildung 39:** Vergleich der Rekrutierung der Coaktivatoren CBP und SRC-1 nach der Bindung von TETRAC (4) an die PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  Monomere und an das PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimer. Die Ergebnisse wurden als relative Coaktivator Rekrutierung aus dem Verhältnis der FI der Testsubstanz gegen Rosiglitazon (23)  $\pm$  SD bestimmt, n = 3, Triplikate.

Vergleicht man die relative Coaktivator Rekrutierung der Coaktivatoren CBP und SRC-1 nach der Bindung von TETRAC (4) an die PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  Monomere und an das PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimer, war die maximale relative Coaktivator Rekrutierung stark erhöht (Abbildung 39). Vermutlich kam es zu einer Bindung beider Heterodimer-Partner und somit zu einer wesentlich stärkeren Coaktivator-Rekrutierung.



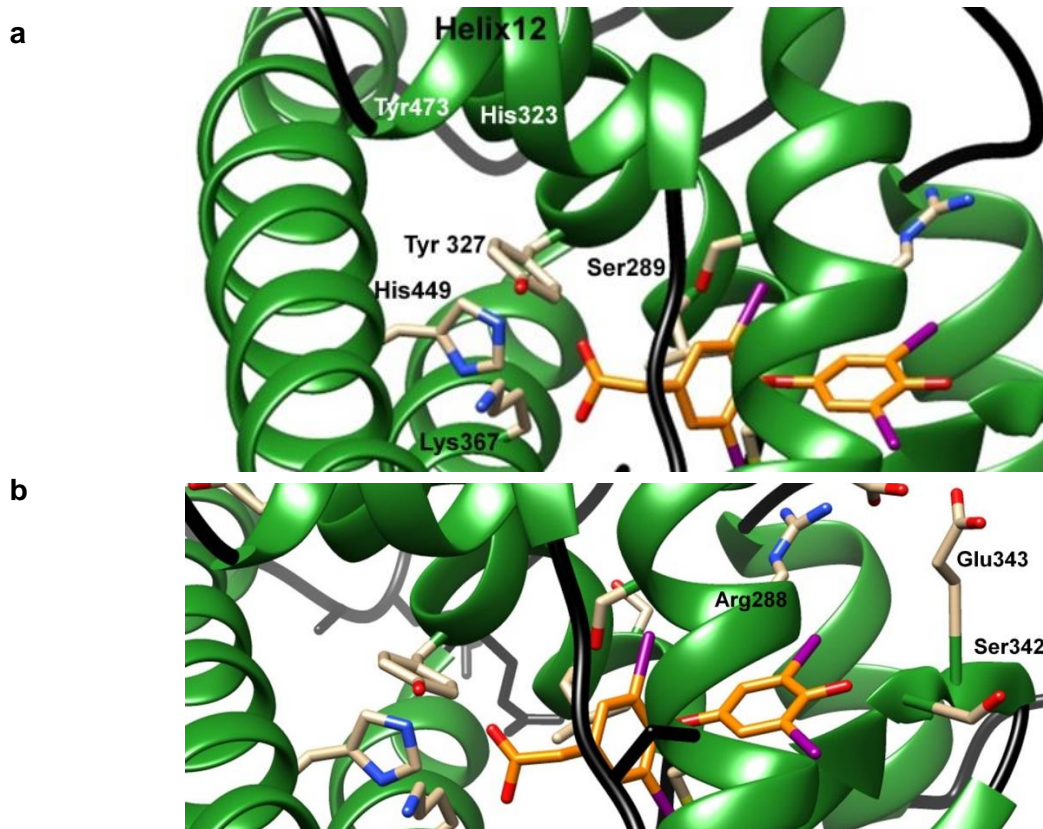
**Abbildung 40:** Das permissive Heterodimer. Insgesamt gibt es drei Möglichkeiten ein permissives Heterodimer wie PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  zu aktivieren. Entweder einer der beiden Heterodimer-Partner liegt gebunden vor oder beide Heterodimer-Partner werden von einem Liganden aktiviert. Die Rekrutierungs-Effizienz von Coaktivatoren bei Liganden-Bindung beider Heterodimer-Partner steigt um ein Vielfaches im Vergleich zur Bindung eines einzelnen Heterodimer-Partners<sup>424,425</sup>.



Im Versuchsaufbau wurde ein mutierter RXR verwendet, der selbst nicht in der Lage war Coaktivatoren zu rekrutieren. Da PPAR $\gamma$  zudem nicht mit GFP *gelabelt* war, konnte nur eine Rekrutierung des Coaktivators zum PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimer gemessen werden. Das PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimer stellt ein permissives Heterodimer dar, bei dem entweder durch die reine Bindung von TETRAC (4) an RXR oder von TETRAC (4) an PPAR $\gamma$  oder aber durch die TETRAC-Bindung an beide Heterodimer-Partner eine Rekrutierung von Coaktivatoren induziert werden kann. In allen drei Fällen kann es zur Konformationsänderung der Helix 12 von PPAR $\gamma$  kommen und somit zur Rekrutierung von Coaktivatoren. Bei permissiven Heterodimeren geht man davon aus, dass die Bindung eines RXR Liganden die Konformation des Heterodimer-Partners von RXR ebenfalls beeinflussen kann, auch wenn dieser permissive Heterodimer-Partner nicht-ligandengebunden vorliegt. Gleiches gilt auch für eine reine PPAR $\gamma$ -Aktivierung. Es kommt daher unabhängig von einer Ligandenbindung zur Konformationsänderung der Helix 12 des jeweiligen nicht-ligandengebundenen permissiven Heterodimer-Partners. Anschließend können durch die Konformationsänderung Coaktivatoren binden und es kommt letztendlich zur Transkription von entsprechenden Zielgenen ohne dass ein Ligand den permissiven Heterodimer-Partner von RXR bzw. PPAR $\gamma$  gebunden hat. Da die Rekrutierungs-Effizienz bei der Untersuchung des Heterodimers im Vergleich zu den Monomeren stark erhöht war, ist davon auszugehen, dass beide Heterodimer-Partner mit TETRAC (4) interagieren und daher für permissive Heterodimere charakteristische additive Effekten bezüglich der Rekrutierungs-Effizienz auftraten (Abbildung 40)<sup>424,425</sup>.

### 3.1.4 Kristallstrukturanalyse

Um die direkte PPAR $\gamma$ -Bindung zusätzlich zu belegen und den exakten Bindungsmodus zu untersuchen, wurde eine Kristallstruktur-Analyse von TETRAC (4) und der PPAR $\gamma$ -LBD durchgeführt. Der Kristallisationsprozess wurde mittels Dampfdiffusions-Methode (*Vapour Diffusion*) induziert, bei der der Konzentrationsgradient zwischen einem „sitzenden Tropfen“ (*sitting drop*) des Protein-TETRAC-Gemisches und einer TETRAC-Reagenzienlösung kontinuierlich ausgeglichen wurde, bis es zur Kristallisation kam.

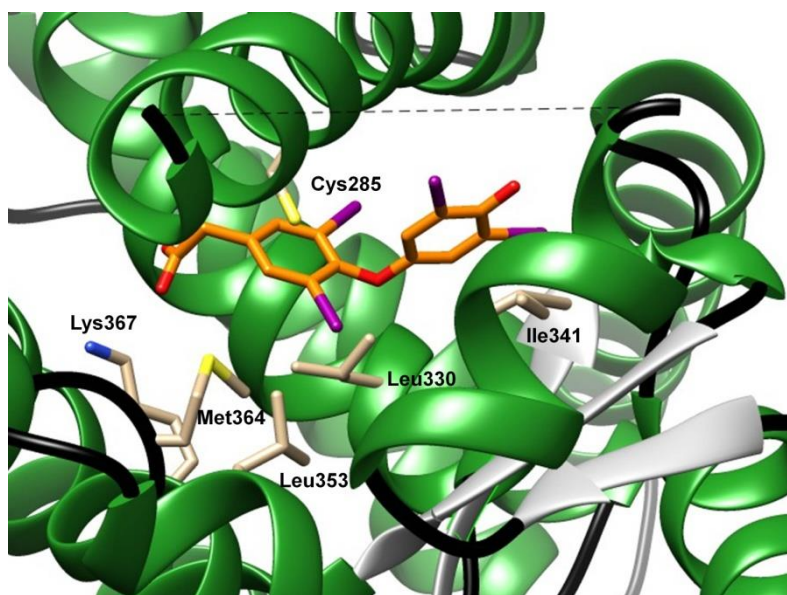


**Abbildung 41:** Kristallstruktur von TETRAC (4) und PPAR $\gamma$ . (a) Interaktion der Carboxyl-Gruppe von TETRAC (4) mit Tyr327, His449 und Lys367. (b) Die Hydroxyl-Gruppe des Tyrosin-Restes von TETRAC (4) interagiert mit Arg288, Ser342 und Glu343 über zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindungen (Daten-Sammlung und *refinement* siehe Anhang Kapitel 5.2.3).

TETRAC (4) bindet wie die meisten PPAR $\gamma$ -Liganden an der kanonischen orthosterischen Bindungsstelle. Jedoch weicht der exakte Bindungsmodus von TETRAC (4) vom Bindungsmodus der Glitazone und Fettsäuren, für die eine Kristallstruktur mit PPAR $\gamma$  vorliegt, ab. Die Carboxyl-Gruppe interagiert mit den Aminosäuren Tyr327, His449 und Lys367 (Abbildung 41a), während Glitazone, andere PPAR $\gamma$ -Liganden mit Carboxyl-Gruppe und endogene Fettsäuren, die PPAR $\gamma$  aktivieren, bevorzugt mit den Aminosäuren Ser289, His323, His449 und Tyr473 interagieren. TETRAC (4) bildet vor allem keine direkte Wasserstoffbrücken-Bindung mit Tyr473 in der Helix 12 aus. Trotz der fehlenden direkten

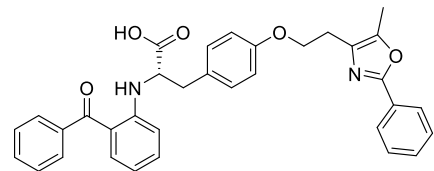
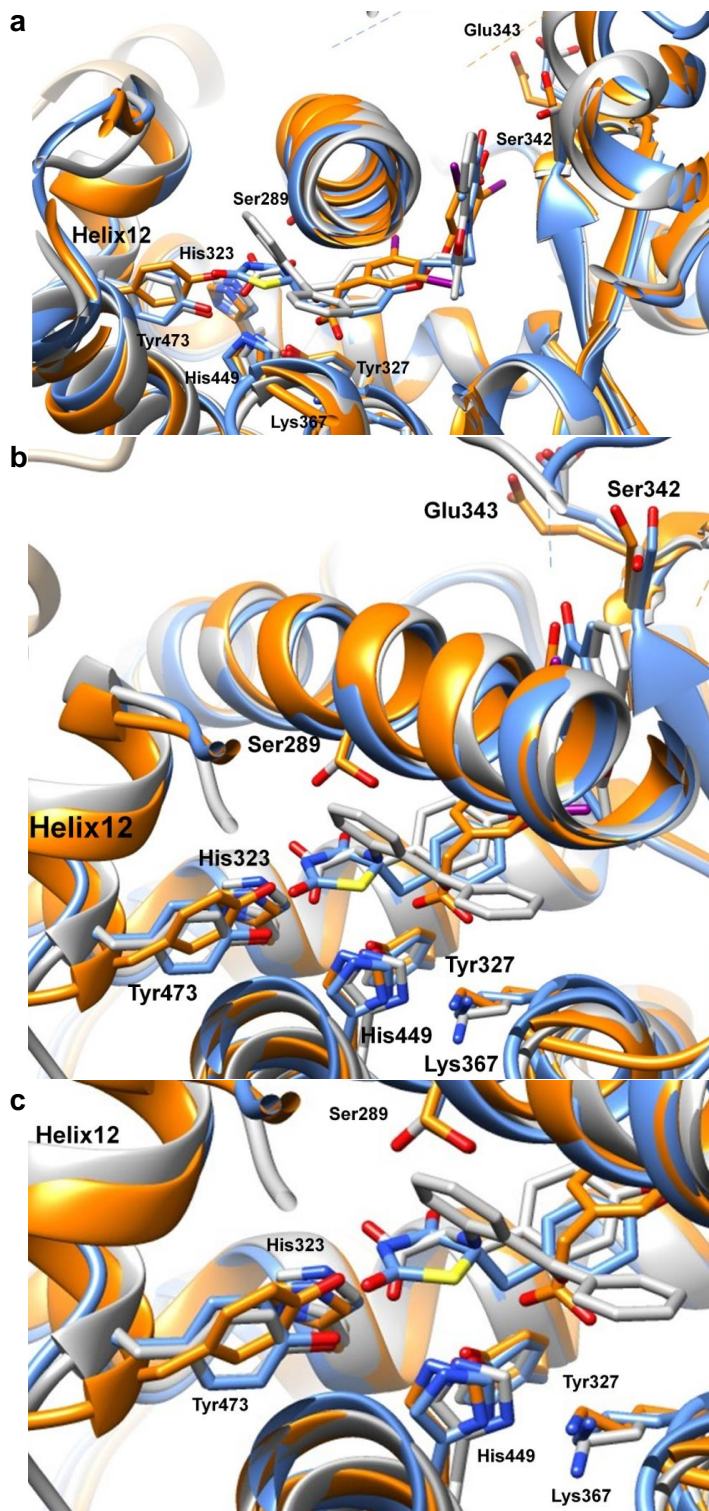
Interaktion mit der Helix 12, war TETRAC (4) jedoch in der Lage PPAR $\gamma$  mit hoher Potenz und Aktivierungs-Effizienz zu binden (siehe Kapitel 3.1.1 Gal4-Luciferase-Reportergen Assay).

Eine weitere Besonderheit des Bindungsmodus von TETRAC (4) ist die zusätzliche polare Interaktion der Hydroxyl-Gruppe des Tyrosin-Restes mit Arg288, Ser342 und Glu343 über Wasserstoffbrücken-Bindungen (Abbildung 41b). Normalerweise zeichnen sich PPAR $\gamma$ -Liganden durch eine polare Wechselwirkung über die entsprechende Carboxyl-Struktur oder einen bioisosteren Ersatz der Carboxyl-Gruppe aus. Diese zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindung, die ermöglicht, dass TETRAC (4) von beiden Seiten des Moleküls stabilisiert wird, stellt daher eine neuartige PPAR $\gamma$ -Liganden-Interaktion da.

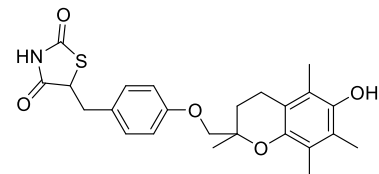


**Abbildung 42: Unpolare Wechselwirkungen von TETRAC (4). TETRAC (4) interagiert mit den Aminosäuren Leu330, Ile341, Leu353, Met364 und Lys367 der PPAR $\gamma$ -Ligandenbindungstasche (Daten-Sammlung und *refinement* siehe Anhang Kapitel 5.2.3).**

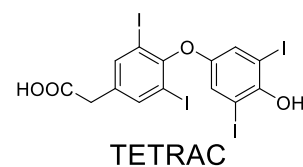
Neben den polaren Wechselwirkungen stellen Interaktionen mit hydrophoben Aminosäuren einen wichtigen Bestandteil der PPAR $\gamma$ -Ligandenbindung dar. Über van-der-Waals-Kräfte werden häufig Interaktionen zwischen den Aminosäuren Leu330, Val339, Leu353 und Met364, die die Ligandenbindungstasche ausbilden und den entsprechenden PPAR $\gamma$ -Liganden vermittelt<sup>30,300</sup>. Bei der TETRAC-PPAR $\gamma$ -Bindung interagieren die beiden Benzen-Ringe und die vier Iod-Atome von TETRAC (4) mit dem lipophilen Teil der Bindungstasche. Die Benzen-Ringe, die über eine Ether-Bindung aneinander gekoppelt sind, werden dabei *sandwichartig* von hydrophoben Aminosäuren umgeben und interagieren über van-der-Waals-Kräfte mit der Ligandenbindungstasche. Vor allem die Aminosäuren Leu330, Ile341, Leu353, Met364 und Lys367 spielen dabei eine Rolle.



Farglitazar



Troglitazon

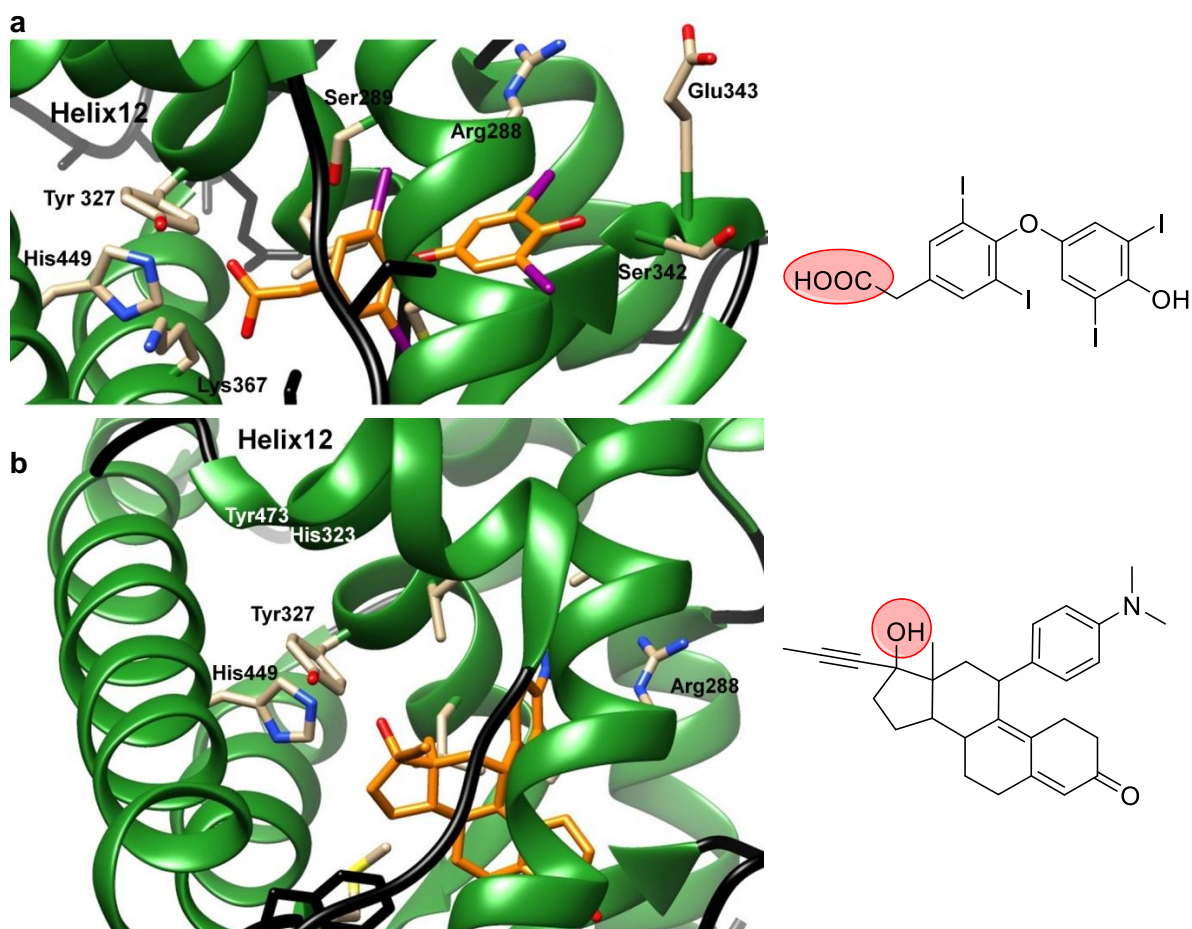


TETRAC

Abbildung 43: Vergleich der Bindungsmodi von Farglitazar (90, grau, PDB-ID: 1FM9)<sup>517</sup>, Troglitazon (91, hellblau, PDB-ID: 6DGO) und TETRAC (4, orange). (a) Die Konformation der drei PPAR $\gamma$ -Liganden ist ähnlich. (b) TETRAC (4) und PPAR $\gamma$  interagieren über zwei polare Wechselwirkungen im Gegensatz zu Farglitazar (90) und Troglitazon (91). (c) TETRAC (4) unterscheidet sich vor allem durch die Ausrichtung der Carboxyl-Gruppe und die fehlende Interaktion mit Tyr473 (Helix 12) (Daten-Sammlung und *refinement* siehe Anhang Kapitel 5.2.3).



Im Vergleich zu den PPAR $\gamma$ -Liganden Farglitazar (**90**)<sup>517</sup> und Troglitazon (**91**) zeigt sich, dass TETRAC (**4**) eine ähnliche U-förmige Konformation in der PPAR $\gamma$ -Bindung eingeht, die typisch für PPAR $\gamma$ -Liganden ist. Allerdings unterscheidet sich die Ausrichtung der Carboxyl-Gruppe von Farglitazar (**90**) bzw. der Thiazolidindion-Gruppe, dem Bioisoster einer Carboxyl-Gruppe, von Troglitazon (**91**) von der Ausrichtung der Carboxyl-Gruppe von TETRAC (**4**). Während Farglitazar (**90**) und Troglitazon (**91**) vor allem Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den Aminosäuren Ser289, His323, His449 und Tyr473 eingehen, interagiert TETRAC (**4**) mit Tyr327, His449 und Lys367. Außerdem ist TETRAC (**4**) im Gegensatz zu Farglitazar (**90**)<sup>517</sup> und Troglitazon (**91**) in der Lage mit der Hydroxyl-Gruppe des Tyrosin-Restes eine zusätzliche polare Interaktion einzugehen (Abbildung 43).



**Abbildung 44:** (a) Interaktion der Carboxyl-Gruppe von TETRAC (**4**) mit der PPAR $\gamma$ -LBD (Datensammlung und refinement siehe Anhang Kapitel 5.2.3). (b) Polare Wechselwirkungen der Hydroxyl-Gruppe von Mifepriston und PPAR $\gamma$ . Der Bindungsmodus von Mifepriston (PDB-ID: 3QT0)<sup>712</sup> ähnelt der TETRAC-PPAR $\gamma$ -Bindung.

Ein ähnliches Interaktions-Profil wie TETRAC (**4**) weist der Progesteron- und Glucokortikoid-Rezeptor-Antagonist und PPAR $\gamma$ -Agonist Mifepriston auf. Auch Mifepriston interagiert nicht direkt mit der Helix 12, sondern bildet Wasserstoffbrücken-Bindungen mit Tyr327 und His449 aus. Zudem tritt ebenfalls eine Interaktion mit der Aminosäure Arg288 auf (Abbildung 44). Im

Vergleich zu Rosiglitazon (**23**) und TETRAC (**4**) besitzt Mifepriston einen ähnlichen EC<sub>50</sub>-Wert (~0,1 µM) und die Aktivierungseffizienz von Mifepriston entspricht annähernd der von Rosiglitazon (**23**)<sup>712</sup>. Eine direkte Interaktion mit der Helix 12 scheint daher nicht zwingend erforderlich zu sein, um PPAR $\gamma$  mit hoher Effizienz zu aktivieren.

### 3.2 Physiologische Effekte der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung (*in vitro*)

Nachdem die direkte Interaktion der Thyroidhormone mit dem PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer nachgewiesen und eingehend charakterisiert werden konnte, sollte anschließend auch untersucht werden, ob Thyroidhormone PPAR $\gamma$ -abhängige biologische Effekte ausüben können. Dazu wurde zunächst ein Adipocyten-Differenzierungs-Experiment durchgeführt. Anschließend wurde untersucht, ob Thyroidhormone noch weitere Zielgene von PPAR $\gamma$  in ihrer Expression beeinflussen können. Um potenzielle *crosstalk*-Effekte zwischen den THRs und PPAR $\gamma$  zu vermeiden wurden die beiden THR-Isoformen zuvor durch *small interfering* RNA (siRNA)-Interferenz *gesilenced*.

#### 3.2.1 Adipocyten-Differenzierung

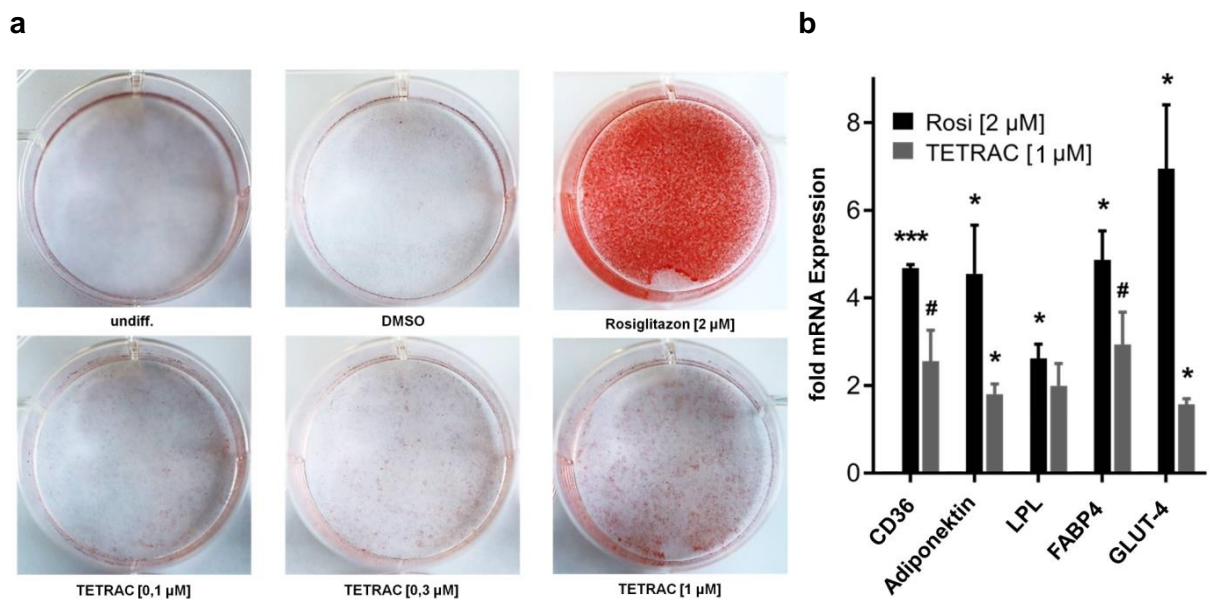
Nachdem die direkte PPAR $\gamma$ -Aktivierung mit Hilfe biochemischer und biophysikalischer Experimente untersucht wurde, sollten die biologischen Effekte, die durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung auftreten, genauer analysiert werden. Da PPAR $\gamma$  maßgeblich zur Adipocyten-Differenzierung beiträgt, wurde untersucht, ob TETRAC (**4**) als potentestes Thyroidhormon an PPAR $\gamma$ , in der Lage ist die Adipocyten-Differenzierung zu induzieren. Dass Thyroidhormone bei der Adipocyten-Differenzierung eine Rolle spielen, ist schon länger bekannt. *In vitro* Experimente mit T3 (**2**), die 1987 durchgeführt wurden, zeigten, dass T3 (**2**) in der Lage ist in Kombination mit Insulin und Transferrin die Proliferation von Präadipocyten zu induzieren<sup>691,692</sup>. Bisher wurde als Ursache angenommen, dass der nicht-ligandengebundenen THR $\beta$ 1 den Corepressor NCoR1 rekrutiert und anschließend PPAR $\gamma$  bindet. Dies führt zur Transrepression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen und einer verminderten Adipocyten-Differenzierung<sup>159,686,687</sup>. Durch T3-Bindung des THR $\beta$ 1 wird der THR $\beta$ 1/PPAR $\gamma$ -Komplex aufgelöst und die Transaktivierung von PPAR $\gamma$  kann wieder erfolgen<sup>688–690</sup>. Jedoch ist auch das im Vergleich zu T3 (**2**) an THR weniger potente Thyroidhormon-Derivat TETRAC (**4**)<sup>153</sup> in der Lage die Differenzierung der Adipocyten zu induzieren. Es ist daher wahrscheinlich, dass Thyroidhormone vor allem durch die direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  eine Differenzierung der Präadipocyten induzieren.

Untersucht wurde die Adipocyten-Differenzierung mit murinen Präadipocyten (murine 3T3-L1-Zellen). Da PPAR $\gamma$  zwischen dem Menschen und der Maus-Spezies hoch konserviert

vorliegt, werden murine Zelllinien häufig zur Evaluierung von Experimenten zur Untersuchung von PPAR $\gamma$ -abhängigen Effekten genutzt und finden auch in diesem Experiment Verwendung<sup>713</sup>. Die murinen 3T3-L1-Fibroblasten wurden zunächst drei Tage kultiviert bevor die Zugabe von Insulin, Dexamethason und Isobutylmethylxanthin, sowie der entsprechenden Testsubstanz für zwei Tage erfolgte. Anschließend wurden die Zellen für weitere zwei Tage mit Insulin versetzt und nachfolgend wurde zu den Zellen bis zum 14. Tag ein Kultivierungs-Medium hinzugegeben. Eine alleinige Zugabe eines PPAR $\gamma$ -Agonisten wie beispielsweise Rosiglitazon (**23**) ist nicht ausreichend, um die Adipocyten-Differenzierung zu stimulieren. Daher werden einige zusätzliche Substanzen in Form von Insulin, Dexamethason und Isobutylmethylxanthin bei der Inkubation zugesetzt. Das Insulin ist ein stark adipogenes Hormon, das eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie z.B GLUT-4 und FAS, induziert, die an der Adipocyten-Differenzierung beteiligt sind und außerdem MAPK-Signalwege stimuliert. Insulin ist daher essentiell für die Reifung der Adipocyten<sup>714,715</sup>. Dexamethason wird während des Experiments benötigt, da unter anderem PPAR $\gamma$  durch das Glucokortikoid induziert wird und auch die für die Adipocyten-Differenzierung ebenfalls essentiellen Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  vermehrt exprimiert werden<sup>716</sup>. Isobutylmethylxanthin ist ein kompetitiver nicht-selektiver Phosphodiesterase-Hemmer und ist beteiligt an der Induktion von cAMP und PKA. Vor allem PKA ist für die Adipocyten-Differenzierung von Bedeutung, da über die PKA-Signalwege unter anderem PPAR $\gamma$  induziert wird. Außerdem werden die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  durch Isobutylmethylxanthin induziert<sup>717</sup>. Evaluiert wurde das Experiment zum einen visuell mit einer sog. *Oil Red O* Färbung, bei der ein Farbstoff in Adipocyten akkumuliert und die Intensität der Färbung das Ausmaß der Differenzierung widerspiegelt. Zum anderen wurde eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) durchgeführt. Dabei wurden die Adipocyten analog kultiviert und differenziert und die Expression einiger für die Adipocyten-Differenzierung essentiellen PPAR $\gamma$ -Zielgene quantifiziert.

Bei einer PCR werden meist 20 - 50 Zyklen durchlaufen, wobei jeder Zyklus aus den drei Phasen der Denaturierung, der Primer-Hybridisierung und der Elongation besteht. Bei der Denaturierung (94 – 96°C) wird zunächst die doppelsträngige DNA der zu vervielfältigen *template*-DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Dabei müssen die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den DNA-Basen aufgebrochen werden. Außerdem werden potenzielle Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den komplementären *forward* und *reverse Primer*n, die zur Vervielfältigung der *template*-DNA nötig sind, unterbunden. *Primer* sind Oligonukleotide, die komplementär zur *template*-DNA sind und diese daher über Wasserstoffbrücken binden können. Durch eine Hydroxyl-Gruppe an ihrem 3'-Ende dienen *Primer* als Startpunkt für DNA-Polymerasen, die für die Replikation der DNA sorgen.

Nach der Denaturierung erfolgt eine Abkühlungs-Phase (meist bei 55 - 65°C) und die *Primer* können an die entsprechende *template*-DNA binden. Die optimale Temperatur dieser Primer-Hybridisierungs-Phase hängt von der Basen-Sequenz und der Länge der *Primer* ab. Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei einer zu niedrig gewählten Temperatur unspezifische Wechselwirkungen mit anderen DNA-Sequenzen auftreten können. Bei einer zu hohen Temperatur könnte es dagegen zu einer Denaturierung der *Primer-template*-DNA-Bindung kommen. Sobald die spezifische Anlagerung an den jeweiligen DNA-Strang mit den jeweils komplementären *forward* und *reverse Primern* stattgefunden hat, wird die Elongations-Phase (68 - 72°C) eingeleitet. Während dieser Phase bindet eine hitzebeständige DNA-Polymerase (meist eine Taq-Polymerase) an das am 3'-Ende des angelagerten *Primers* und fügt, komplementär zur *template*-DNA, entsprechende Nukleotide hinzu. So entsteht eine neue doppelsträngige DNA, die wiederum in einem neuen Zyklus amplifiziert werden kann. Bei der qPCR kann z.B. mit Hilfe des Farbstoffs *SYBR Green* eine Quantifizierung der DNA-Menge durchgeführt werden. Der Farbstoff interkalierte zwischen doppelsträngiger DNA und es kommt zu einem Fluoreszenz-Signal, das mit dem Fluoreszenz-Signal eines sog. *housekeeping* Gens, das konstitutiv exprimiert wird, ins Verhältnis gesetzt werden kann<sup>718,719</sup>.



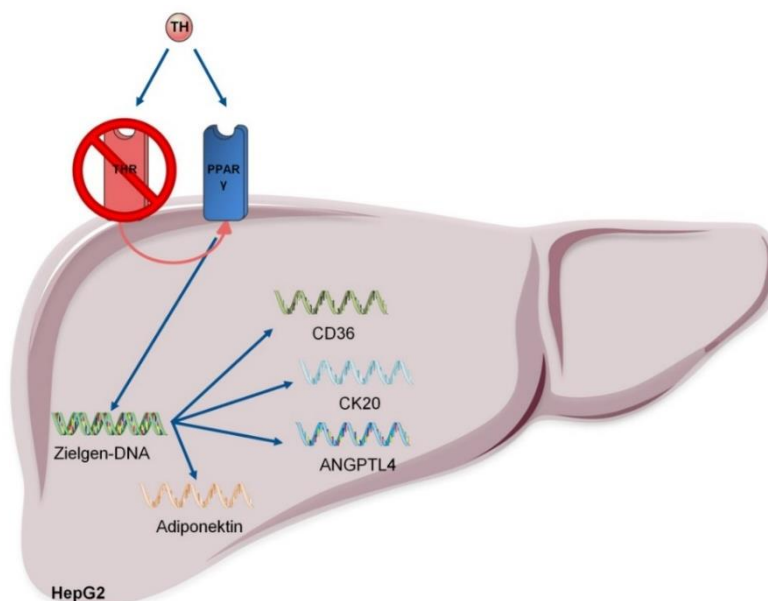
**Abbildung 45: Evaluierung der Adipocyten-Differenzierung (murine 3T3-L1 Fibroblasten).** (a) Nach der *Oil Red O* Färbung zeigte sich eine moderate dosis-abhängige Farbvertiefung bei den mit TETRAC (4) behandelten Präadipocyten (n = 3). (b) qPCR Auswertung der Induktion von essentiellen Zielgenen, die an der Adipocyten-Differenzierung beteiligt sind. Im Vergleich zu Rosiglitazon (23) kam es zu einer moderaten Induktion der PPAR $\gamma$ -Zielgene. Die Ergebnisse wurden als *fold* mRNA Expression gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n = 3, Duplikate, zweiseitiger *Student's* t-test: n.s. - nicht signifikant, # p < 0,1; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.



Als Positiv-Kontrolle wurde jeweils Rosiglitazon (**23**) in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  verwendet, welches in der Lage war, die Adipocyten-Differenzierung stark zu induzieren. Dies war durch die intensive Rotfärbung ersichtlich. TETRAC (**4**) war ebenfalls in der Lage die Adipocyten-Differenzierung dosis-abhängig zu induzieren. Im Vergleich zu Rosiglitazon (**23**) war der Effekt jedoch nur moderat ausgeprägt, da die Rotfärbung deutlich weniger intensiv war (Abbildung 45a). Zur genaueren Evaluierung der Adipocyten-Differenzierung wurde die Expression der Zielgene CD36, Adiponektin, LPL, FABP4 und GLUT-4 untersucht. Alle getesteten Zielgene werden durch PPAR $\gamma$  reguliert und während der Adipocyten-Differenzierung vermehrt exprimiert. TETRAC (**4**) war im Vergleich zu Rosiglitazon (**23**) in der Lage die Expression der Zielgene moderat zu erhöhen. Vor allem CD36 und FABP4, die hauptsächlich dafür sorgen, dass Fettsäuren in das Zellinnere transportiert werden, wurden durch TETRAC (**4**) induziert. Adiponektin und GLUT-4 wurden ebenfalls induziert, allerdings in geringerem Ausmaß. Die LPL-Expression wurde zwar durch TETRAC (**4**) induziert, jedoch konnte keine statistisch signifikante Induktion des Gens nachgewiesen werden (Abbildung 45b). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass TETRAC (**4**) in der Lage war die PPAR $\gamma$ -abhängige Adipocyten-Differenzierung zu induzieren.

### 3.2.2 Knockdown Experimente

Um weitere PPAR $\gamma$ -abhängige biologische Effekte der Thyroidhormone zu evaluieren wurde zusätzlich die Expression einiger PPAR $\gamma$ -Zielgene in Hepatozyten (HepG2) untersucht (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Quantifizierung von Adiponektin, ANGPTL4, CK20 und CD36 nach siRNA-Interferenz der THRs (Zelllinie: HepG2, Auswertung auf mRNA-Ebene mittels qPCR, Auswertung auf Protein-Ebene mittels *Western blot*-Analyse).**

Da sog. *crosstalk*-Effekte zwischen den THR $\alpha$ s und PPAR $\gamma$  bei der Evaluierung der PPAR $\gamma$ -Zielgen-Expression vermieden werden sollten, wurden die THR $\alpha$ s vor der Quantifizierung mittels siRNA-Interferenz (auch siRNA *silencing*) *gesilenced*. Beim siRNA *silencing* wird zunächst eine doppelsträngige RNA durch Endonukleasen sog. *Dicer*-Proteine in die entsprechende verkürzte siRNA gespalten<sup>720</sup>. Diese siRNA (*sense* RNA-Strang) muss komplementär zur entsprechenden mRNA des zu *silencing* Proteins (*antisense* RNA-Strang) sein. Gelangt die siRNA in die Zelle bildet sich ein sog. *RNA-induced silencing complex* (RISC)<sup>721</sup>. Dieser Komplex besteht aus der entsprechenden siRNA und Proteinen der Argonaut-Familie und bildet aus der noch doppelsträngigen siRNA eine einzelsträngige Sequenz<sup>721,722</sup>. Anschließend bindet die nun einzelsträngige siRNA an die komplementäre mRNA des Proteins, das *gesilenced* werden soll. Danach wird der gesamte Komplex durch Ribonukleasen abgebaut und somit die Expression des entsprechenden Proteins verhindert<sup>723,724</sup>.

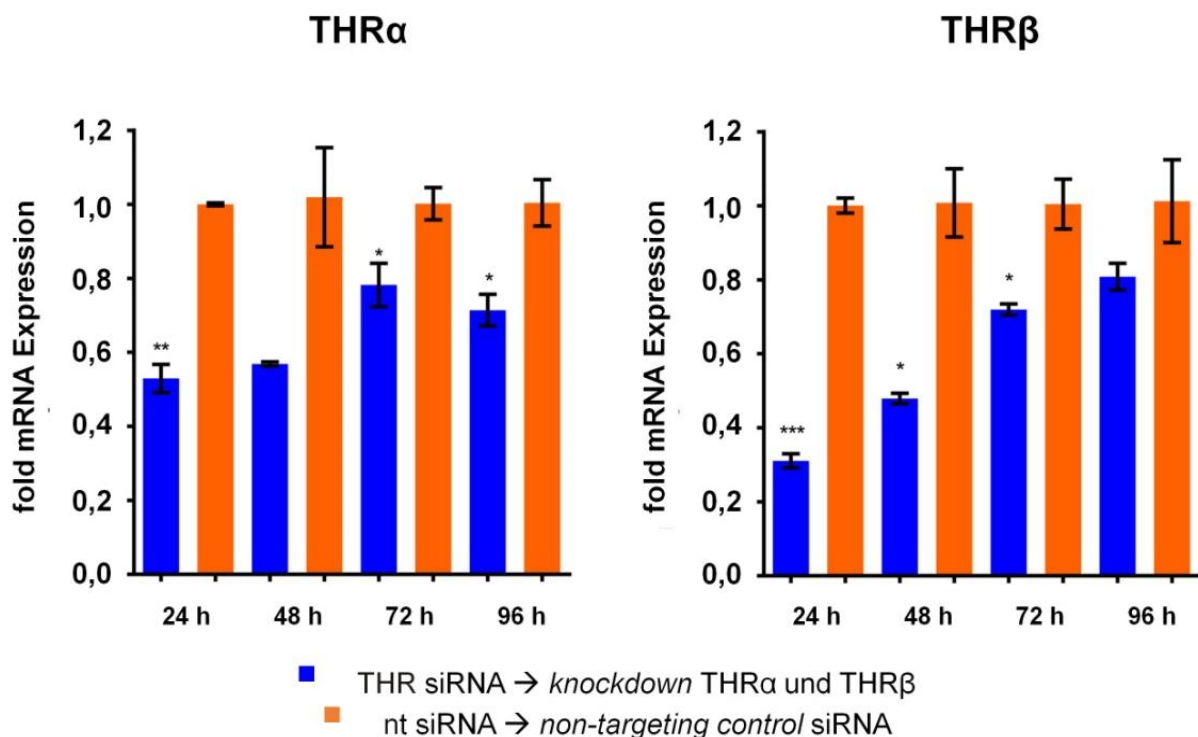
Zunächst wurde ermittelt zu welchem Zeitpunkt der *knockdown* der THR $\alpha$ s am effizientesten abläuft. Dafür wurden die HepG2-Zellen bei den Untersuchungen auf mRNA-Ebene mit THR $\alpha$ -komplementärer und THR $\beta$ -komplementärer siRNA für 24, 48, 72 und 96 Stunden inkubiert (Abbildung 47 & Tabelle 24). Bei den Experimenten auf Protein-Ebene wurden die HepG2-Zellen für 24 und 48 Stunden mit der entsprechenden siRNA *gesilenced* (Abbildung 52 & Tabelle 25). Zudem wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils Negativ-Kontrollen, bei denen die Zellen mit einer *non-targeting* siRNA transfiziert wurden, durchgeführt. Die *non-targeting* siRNA bindet an keine entsprechende RNA, dient aber dazu gleiche Transfektions-Bedingungen zu schaffen und stellt somit eine geeignete Negativ-Kontrolle zur Evaluierung der *knockdown*-Effizienz dar. Da bei der Transfektion der siRNA mittels Elektroporation, die Zell-Zahl signifikant sinkt, kommt es auf Grund dieses zelltoxischen Effektes der Transfektions-Methode zu einer verminderten Expression der entsprechenden Zielgene. Daher ist es notwendig als Kontrolleexperiment, ebenfalls eine Transfektion mit einer *non-targeting* siRNA durchzuführen.

Nach Verifizierung, des erfolgreichen *knockdowns* von THR $\alpha$  und THR $\beta$  (Abbildung 47 und Abbildung 52), wurden die Hepatozyten (HepG2-Zellen) mit TETRAC (4), dem potentesten Thyroidhormon-Derivat an PPAR $\gamma$  und T4 (1), dem Derivat mit der höchsten maximalen Aktivierung an PPAR $\gamma$ , inkubiert. Außerdem wurden die Zellen ebenfalls mit Pioglitazon (7), das als Positiv-Kontrolle diente, inkubiert. Es wurden jeweils Konzentrations-Reihen hergestellt und zur Inkubation verwendet, die den errechneten EC<sub>50</sub>-Werten der jeweiligen Testsubstanz entsprachen. Anschließend wurde die Zielgen-Expression sowohl auf mRNA-Ebene mittels qPCR als auch auf Protein-Ebene mittels *Western Blot*-Analyse evaluiert. Die Expression der Zielgene Adiponektin, ANGPTL4, CK20 und CD36 wurden dabei auf mRNA-

Ebene analysiert, während die Expression von CD36 repräsentativ auch auf Protein-Ebene untersucht wurde.

### 3.2.2.1 Auswertung auf mRNA-Ebene mittels qPCR

Um die Ergebnisse auf mRNA-Ebene zu verifizieren wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem während der Inkubation 10  $\mu$ M des PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW9662 (**24**) hinzugefügt wurde (rot gefärbte Balken). Außerdem wurde jeweils ein Kontrollexperiment mit einer *non-targeting* siRNA ausgeführt (orange gefärbte Balken), das als Referenz diente. Die PPAR $\gamma$ -Zielgen-Expression nach der Inkubation der HepG2-Zellen mit den Testsubstanzen ohne vorherige Transfektion (grün gefärbte Balken) bestätigte, dass durch die Elektroporation ein deutlicher Einfluss auf die Expression der entsprechenden Gene vorlag. Daher wurde die fold mRNA Expression der THR $\alpha$ / $\beta$ -*knockdown*-Zellen (blau gefärbte Balken) mit der fold mRNA Expression der mit *non-targeting* siRNA transfizierten Zellen verglichen, um den Einfluss der Transfektions-Methode auf die Zielgen-Expression zu nivellieren.



**Abbildung 47: *knockdown*-Effizienz auf mRNA-Ebene.** HepG2 Zellen wurden sowohl mit THR $\alpha$ -komplementärer als auch THR $\beta$ -komplementärer siRNA inkubiert. Die *knockdown*-Effizienz wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mittels qPCR evaluiert. Die Ergebnisse wurden als fold mRNA Expression gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n = 3, Triplikate, zweiseitiger *Student's* t-test: n.s. - nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Tabelle 24: *knockdown*-Effizienz auf mRNA-Ebene nach 24, 48, 72 und 96 Stunden.

Zeitpunkt	<i>knockdown</i> -Effizienz	
	THR $\alpha$	THR $\beta$
24 Std.	47 $\pm$ 4%	69 $\pm$ 2%
48 Std.	43 $\pm$ 1%	52 $\pm$ 1%
72 Std.	22 $\pm$ 6%	28 $\pm$ 1%
96 Std.	29 $\pm$ 4%	19 $\pm$ 4%

Auswertung durch qPCR, HepG2-Zellen, n = 3, Triplikate.

Zuerst wurde evaluiert nach welcher Transfektions-Dauer der *knockdown* am effizientesten war. Dazu wurden die HepG2-Zellen sowohl mit THR $\alpha$ -komplementärer und THR $\beta$ -komplementärer siRNA als auch mit *non-targeting* siRNA für 24, 48, 72 und 96 Stunden inkubiert. Die blau gefärbten Balken spiegeln dabei die nach der Transfektion mit THR-siRNA verbliebene Expression der beiden THR-Isoformen wider. Auf mRNA-Ebene war die *knockdown*-Effizienz bei beiden Isoformen nach 24 Stunden am höchsten. Daher wurde bei sämtlichen folgenden Experimenten zur Ermittlung der Zielgen-Expression auf mRNA-Ebene eine Transfektions-Dauer von 24 Stunden gewählt (Abbildung 47 & Tabelle 24).

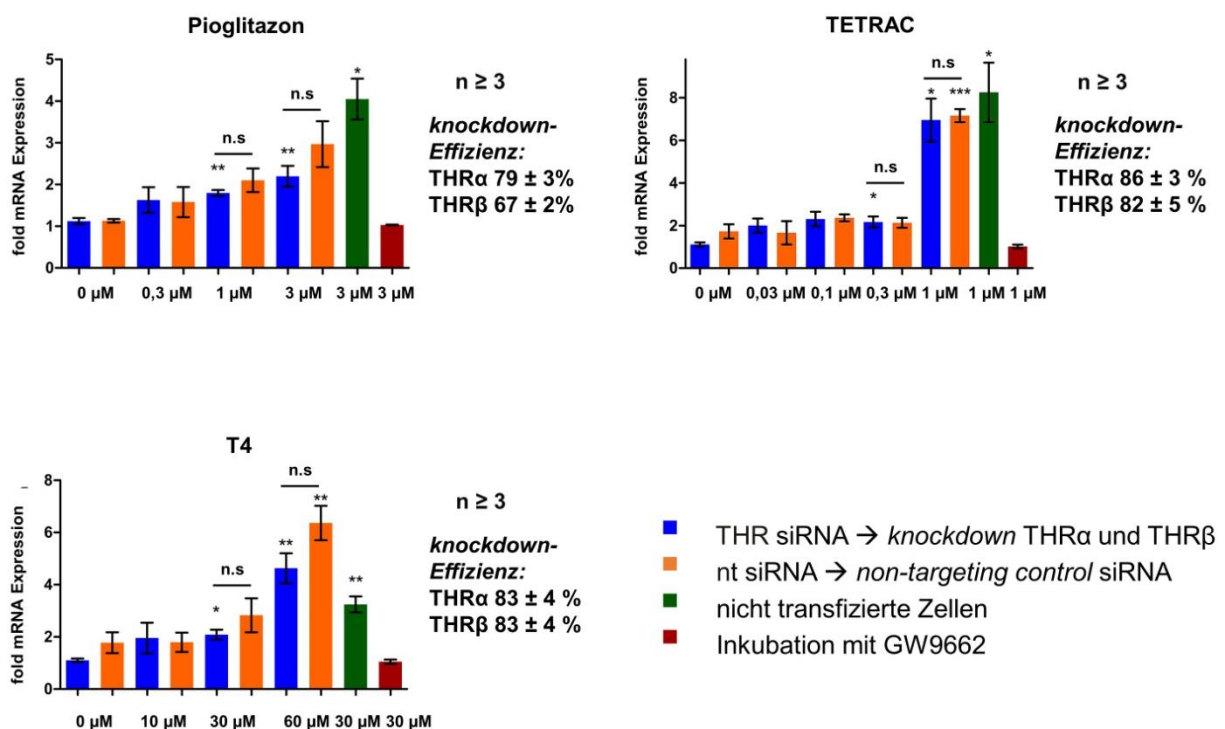
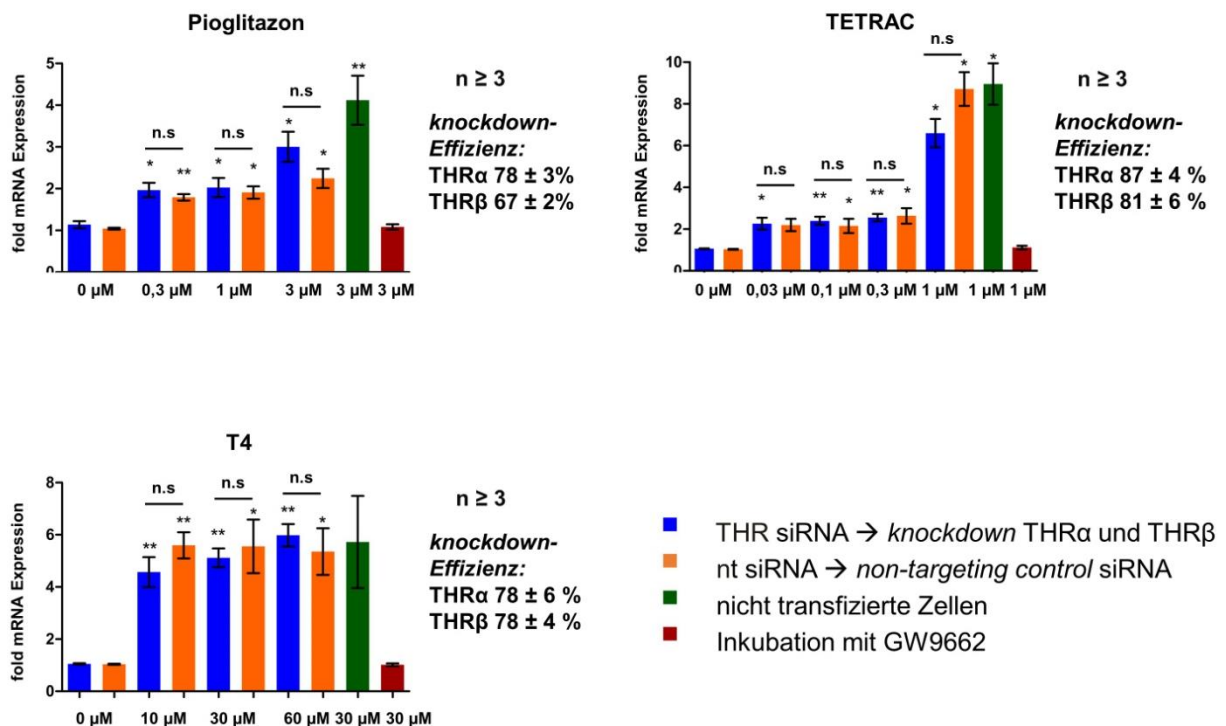


Abbildung 48: qPCR-Evaluierung der Expression von Adiponektin auf mRNA-Ebene induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1) (in HepG2-Zellen). Die Ergebnisse wurden als fold mRNA Expression gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n  $\geq$  3, Triplikate, zweiseitiger *Student's* t-test: n.s. – nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Adiponektin zählt zu den Adipokinen, die im Fettgewebe synthetisiert werden und durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung induziert werden. Adiponektin senkt die Gluconeogenese und erhöht die Glucose-Aufnahme in die Zellen. Daher sorgt Adiponektin für eine verbesserte Insulinsensitivität. Neben dem Einfluss auf den Glucose-Stoffwechsel, besitzt Adiponektin zudem antiinflammatorische Eigenschaften, da die Expression von TNF- $\alpha$  gehemmt wird. Außerdem werden verschiedene UCPs vermehrt exprimiert und somit die Thermogenese induziert<sup>264–268</sup>.

TETRAC (4), T4 (1) und Pioglitazon (7) waren in der Lage die Expression von Adiponektin durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung dosis-abhängig zu induzieren. Die THR-Expression hatte dabei keinen Einfluss auf die PPAR $\gamma$ -Zielgen-Expression. Das Kontrollexperiment mit dem PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW9662 (24), zeigte zudem, dass durch die Blockade der PPAR $\gamma$ -Bindungstasche, die Expression des Zielgens verhindert wurde (rot gefärbte Balken) (Abbildung 48).

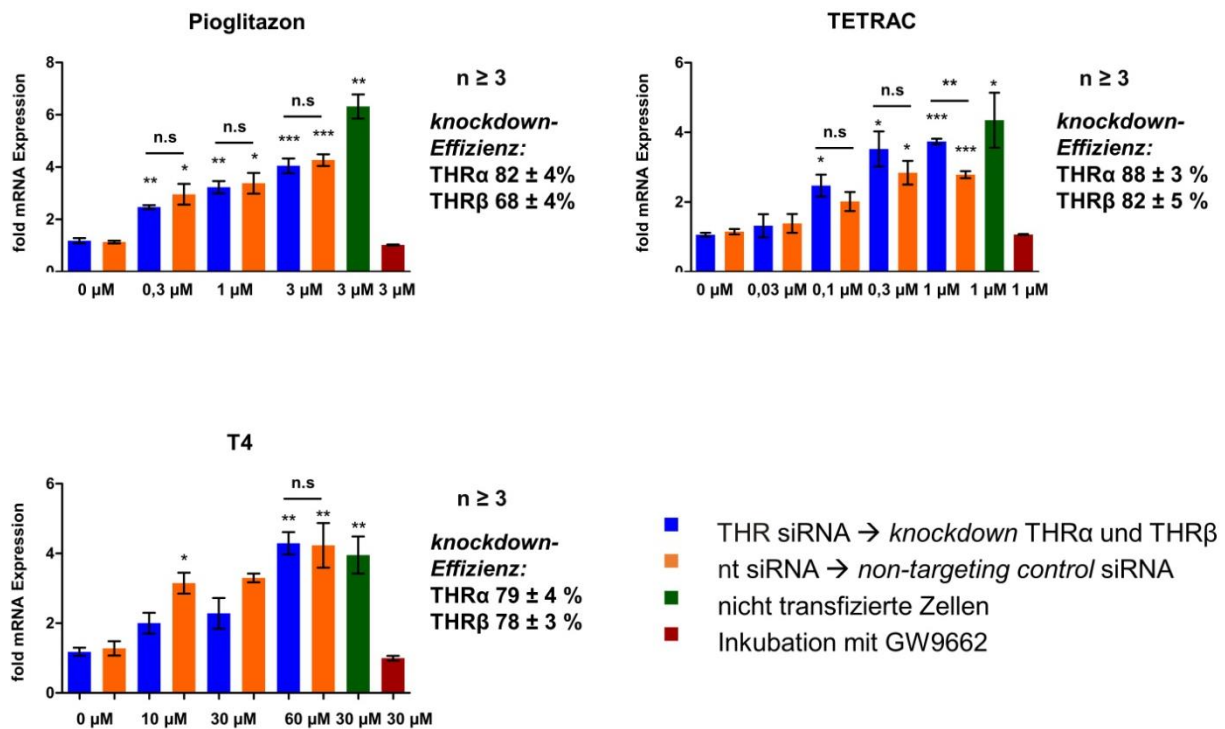


**Abbildung 49: qPCR-Evaluierung der Expression von ANGPTL4 auf mRNA-Ebene induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1) (in HepG2-Zellen). Die Ergebnisse wurden als fold mRNA Expression gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n  $\geq$  3, Triplikate, zweiseitiger Student's t-test: n.s. –nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.**

Auch ANGPTL4 ist ein durch PPAR $\gamma$  induziertes Adipokin. Es reguliert unter anderem den Lipid-Stoffwechsel durch Hemmung der LPL und Stimulation der Lipolyse. Außerdem kann ANGPTL4 die Insulinsensitivität verbessern, indem die Gluconeogenese inhibiert wird<sup>269,270</sup>.







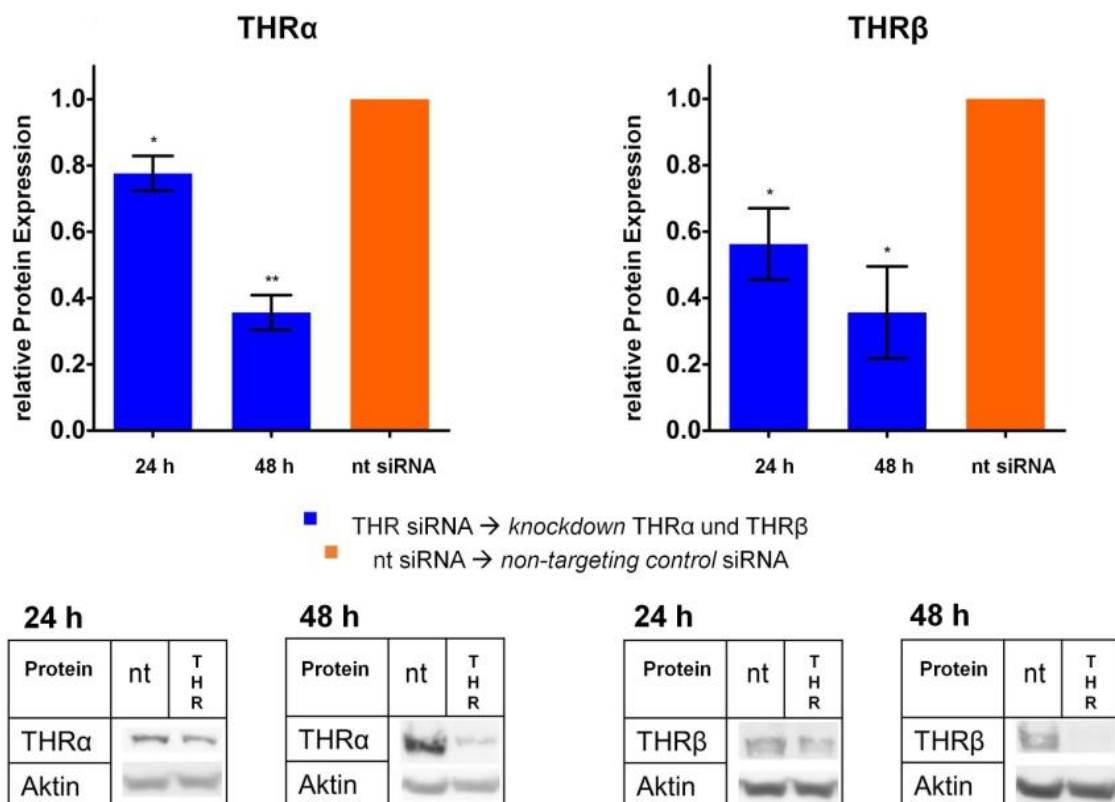
**Abbildung 51: qPCR-Evaluierung der Expression von CD36 auf mRNA-Ebene induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1) (in HepG2-Zellen). Die Ergebnisse wurden als fold mRNA Expression gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Triplikate, zweiseitiger *Student's t*-test: n.s. –nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**

CD36 ist ein Fettsäure-Transporter, der die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen katalysiert<sup>459,465</sup>. Auch CD36 ist ein PPAR $\gamma$ -Zielgen, das durch die Thyroidhormone TETRAC (4) und T4 (1), sowie durch die Positiv-Kontrolle Pioglitazon (7) dosis-abhängig induziert werden konnte. Die Expression von CD36 wurde dabei unabhängig von der Expression der THRs induziert und schien daher auf einer direkten Aktivierung von PPAR $\gamma$  zu beruhen. Dies ließ sich durch die signifikante Reduktion der Expression von CD36 nach Zugabe des PPAR $\gamma$  Antagonisten GW9662 (24) bestätigen (Abbildung 51).

### 3.2.2.1 Auswertung auf Protein-Ebene mittels *Western Blot*-Analyse

Um die *knockdown*-Effizienz und die durch PPAR $\gamma$ -Bindung induzierte Zielgen-Expression auch auf Protein-Ebene zu belegen, wurden zusätzlich *knockdown*-Experimente durchgeführt, die mittels *Western Blot*-Analyse evaluiert wurden. Dabei wurde repräsentativ die Expression von CD36 untersucht. Bevor eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt werden konnte, wurde das Protein-Gemisch zunächst durch Gel-Elektrophorese entsprechend der Protein-Größe und –Ladung aufgetrennt. Um die nun aufgetrennten Proteinbanden von der Polyacrylamid-Gel-Matrix auf eine Membran zu übertragen, wurde ein Elektrotransfer durchgeführt. Anschließend wurden die verbleibenden Bindungsstellen auf der Membran

durch ein chemisches Polymer blockiert und ein *Immunoblotting* durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein primärer Antikörper verwendet, der mit spezifischen Epitopen des zu detektierenden Proteins wechselwirken konnte. Danach wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper versetzt, der an die Fc-Region des primären Antikörpers binden konnte. Durch diese Interaktion kam es zur Signalverstärkung, da der Sekundärantikörper einen polyklonalen Antikörper darstellte, der gegen mehrere Epitope auf dem Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet war und somit auch mehrfach an den Primärantikörper binden konnte. Der Sekundärantikörper selbst war zusätzlich an ein Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase, HRP) Enzym gekoppelt, das die chemolumineszente Umsetzung (*enhanced chemiluminescence*, ECL) von Luminol katalysieren konnte. Nach der Zugabe des Substrats Luminol konnte das resultierende Lumineszenz-Signal mit Hilfe eines Röntgen-Film-Entwicklers detektiert werden. Durch densitometrische Bestimmung der Röntgen-Film-Scans wurde die Protein-Menge quantifiziert.



**Abbildung 52: knockdown-Effizienz auf Protein-Ebene (Western blot-Analyse) nach 24 und 48 Stunden (in HepG2-Zellen).** Die Ergebnisse wurden als fold mRNA Expression gegen 0,1% DMSO ± S.E.M. bestimmt, n = 3, zweiseitiger *Student's t-test*: n.s. - nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 (sämtliche *Western blots* zur *knockdown*-Effizienz sind im Anhang 5.2.4.1, Abbildung 80 - 83 zu finden).



Tabelle 25: zeitabhängige *knockdown*-Effizienz auf Protein-Ebene.

Zeitpunkt	<i>knockdown</i> -Effizienz	
	THR $\alpha$	THR $\beta$
24 Std.	22 $\pm$ 5%	44 $\pm$ 11%
48 Std.	64 $\pm$ 9%	58 $\pm$ 14%

Auswertung mit qPCR, HepG2-Zellen, n = 3, (sämtliche Western blots zur *knockdown*-Effizienz sind im Anhang 5.2.4.1, Abbildung 80 - 83 zu finden).

Auf Protein-Ebene war die *knockdown*-Effizienz der THR $\alpha$ s nach 48 Stunden am effizientesten (Abbildung 52 & Tabelle 25, sämtliche Western blots zur CD36-Expression sind im Anhang 5.2.4.2, Abbildung 84 – 95 zu finden). Der verzögerte *silencing*-Effekt im Vergleich zur mRNA-Ebene könnte vor allem durch die Stabilität und die lange Halbwertszeit des THR-Proteins begründet sein. Erst wenn das THR-Protein abgebaut wird, macht sich die fehlende Neubildung des Rezeptors durch Gen-*silencing* bemerkbar. Daher ist es essentiell die *knockdown*-Effizienz sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene zu bestimmen. Nur wenn auch das Rezeptor-Protein der THR $\alpha$ s vermindert exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass der THR-Einfluss auf die Expression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen auf ein gewisses Maß reduziert ist.

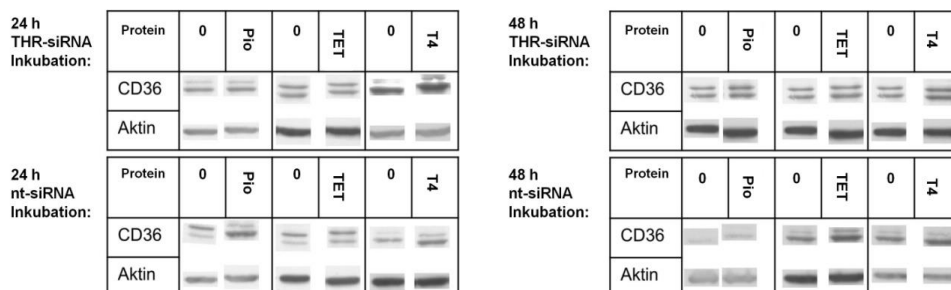
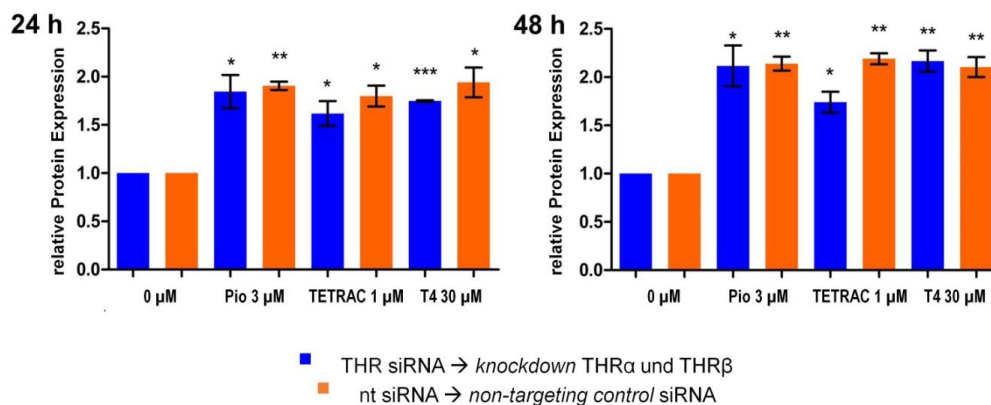


Abbildung 53: Evaluierung der Expression von CD36 auf Protein-Ebene (*Western blot*-Analyse) induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1) nach 24 und 48 Stunden siRNA Behandlung (HepG2-Zellen). Die Ergebnisse wurden als relative Protein Expression gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n  $\geq$  3, zweiseitiger *Student's t*-test: n.s. –nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 (sämtliche *Western blots* zur CD36-Expression sind im Anhang 5.2.4.2, Abbildung 84 – 95 zu finden).

Auch auf Protein-Ebene konnte nachgewiesen werden, dass TETRAC (4) und T4 (1) in der Lage waren die Expression von CD36 zu induzieren. Obwohl nach 48 Stunden die *knockdown*-Effizienz am stärksten ausgeprägt war, war zu diesem Zeitpunkt die Zielgen-Expression von CD36 höher als nach 24 Stunden. Daraus ließ sich ableiten, dass eine Anwesenheit der THR $\alpha$ s nicht notwendig gewesen ist, um die Expression von CD36 zu induzieren. Außerdem konnte damit ebenfalls ausgeschlossen werden, dass mögliche *crosstalk*-Effekte zwischen den THR $\alpha$ s und PPAR $\gamma$  eine nennenswerte Rolle bei der Induktion der CD36-Expression spielen (Abbildung 53, sämtliche *Western blots* zur CD36-Expression sind im Anhang 5.2.4.2, Abbildung 84 – 95 zu finden).

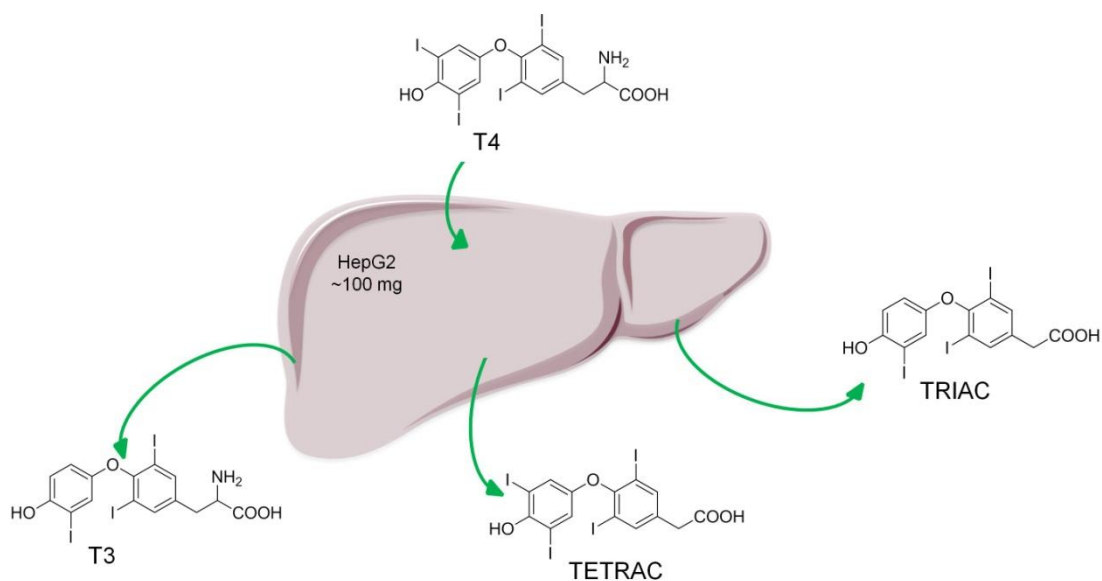
### 3.3 Physiologische Bedeutung der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Thyroidhormone PPAR $\gamma$  und RXR binden können und auch biologische Effekte die über die PPAR $\gamma$ /RXR-Aktivierung induziert werden von Thyroidhormonen stimuliert werden, sollte nun eine mögliche physiologische Relevanz dieser Entdeckung durch geeignete *in vitro* und *in vivo* Experimente abgeschätzt werden. Um relevante physiologische Effekte nachzuweisen, muss die endogene Konzentration des entsprechenden Thyroidhormons in Kompartimenten, die PPAR $\gamma$  exprimieren, in etwa dem berechneten EC<sub>50</sub>-Wert entsprechen. Die Serumspiegel-Daten, die in der Literatur verfügbar sind, zeigen, dass sowohl für TETRAC (4) als auch T4 (1) die endogene Konzentration etwa 100-fach niedriger ist, als der entsprechende EC<sub>50</sub>-Wert an PPAR $\gamma$ . Während TETRAC (4) einen EC<sub>50</sub>-Wert von 100 nM besitzt, beträgt die endogene Konzentration im Plasma 1,6 nM<sup>581</sup>. T4 (1) hat einen EC<sub>50</sub>-Wert von 12  $\mu$ M und eine Serumkonzentration von 113 nM<sup>579</sup>. Damit scheint eine endogene Relevanz der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung eher unwahrscheinlich zu sein. Jedoch könnte auf Grund der relativ lipophilen, Iod-reichen chemischen Struktur eine Akkumulation z.B. im Fettgewebe auftreten. Das braune und weiße Fettgewebe sind der Hauptexpressions-Ort von PPAR $\gamma$ <sup>236–238</sup>. Auch in der Leber könnten sich die Thyroidhormone potenziell anreichern. Außerdem findet die Metabolisierung von T4 (1) zu den entsprechenden Metaboliten intrazellulär statt<sup>616,653,654,657</sup>. Die Aussagekraft von Serum- und Plasmaspiegeln ist daher wahrscheinlich nicht repräsentativ, um eine endogene Relevanz abzuschätzen. Auch T3 (2) wird beispielsweise erst intrazellulär durch Deiodasen in relevanten Konzentrationen gebildet um die THR $\alpha$ s zu aktivieren (Serumkonzentration  $\sim$  1,3 – 2,1 nM<sup>579,594,595</sup>; EC<sub>50</sub>(THR $\alpha$ ) = 0,5 – 3,4 nM<sup>150–153</sup>; EC<sub>50</sub>(THR $\beta$ ) = 1,2 – 6,2 nM<sup>150–153</sup>).

Um zu evaluieren, ob es in den betreffenden Kompartimenten zu einer ausreichenden Anreicherung von vor allem dem potentesten Thyroidhormon-Derivat TETRAC (4) kommen kann, wurde ein *in vitro* Experiment mit HepG2-Zellen und ein *in vivo* Experiment mit Mäusen

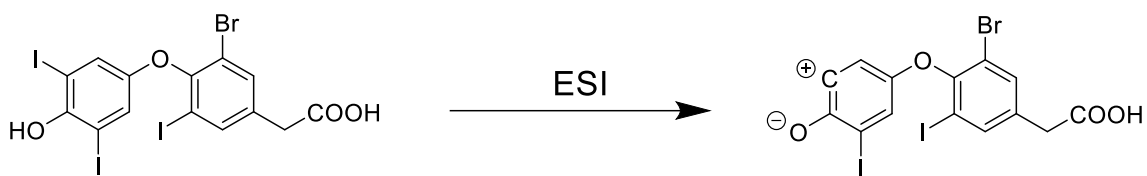
durchgeführt. Bei dem *in vitro* Experiment sollte das Enzym-System, das für die Metabolisierung von T4 (1) zu TETRAC (4) zuständig ist, mit T4 (1) für 24 Stunden gesättigt werden und anschließend die TETRAC-Menge mittels *Liquid*-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) quantifiziert werden. Bei dem *in vivo* Experiment wurde zunächst ein Br-T4-Derivat synthetisiert und der Maus verabreicht, da Interferenzen mit der endogenen T4-Produktion der Maus ausgeschlossen werden sollten. Anschließend wurde die Expression entsprechender Zielgene von PPAR $\gamma$  nach Verabreichung von Br-T4 (92) quantifiziert.

### 3.3.1 Quantifizierung von Thyroidhormonen in HepG2 Zellen durch LC-MS/MS



**Abbildung 54: Quantifizierung von Thyroidhormonen in HepG2 Zellen durch LC-MS/MS. Nach Inkubation von HepG2-Zellen mit T4 (1) für 24 Stunden sollten die Metabolite T3 (2), TETRAC (4) und TRIAC (3) mittels LC-MS/MS quantifiziert werden.**

Die hepatische Konversion von T4 (1) zu TETRAC (4) sollte in einem *in vitro* Modell mit HepG2 Zellen untersucht werden. Dazu wurden jeweils 100 mg HepG2-Zellen für 24 Stunden mit einem Überschuss an T4 (1) inkubiert, um das Enzym-System zu sättigen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen abgelöst und das Zellpellet mit einer 0,9%igen Kochsalzlösung mehrmals gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit einer Festphasenextraktion aufgereinigt und verschiedene Thyroidhormone mittels LC-MS/MS quantifiziert (Abbildung 54).



**Abbildung 55: Fragmentierung des internen Standards Br-TETRAC (93) (LC-MS/MS-Analytik siehe Anhang Kapitel 5.2.5, Abbildung 96 & 97).**

Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines internen Standards in Form von Br-TETRAC (4). Ein interner Standard sollte dem Analyten, in diesem Fall TETRAC (4), TRIAC (3) und T3 (2), möglichst ähnlich sein, jedoch nicht in der Analysenprobe enthalten sein und eine andere Retentionszeit aufweisen, damit Analyt und interner Standard in einer Analyse nebeneinander quantifiziert werden können. Da sich bei der Massenspektroskopie bei der die Elektrospray Ionisation (ESI) verwendet wurde, zeigte, dass bei Thyroidhormon-Derivaten zunächst das Iod-Atom am äußeren Benzen-Ring abgespalten wird (in 3'- oder 5'-Position), wurde als interner Standard ein an Position 3 bromiertes TETRAC-Derivat synthetisiert und verwendet, das nach der ersten Fragmentierung nicht identisch mit den Fragmenten des zu quantifizierenden TETRAC (4) war.

**Tabelle 26: Quantifizierung von T3 (2), TETRAC (4) und TRIAC (3) nach T4-Inkubation mittels LC-MS/MS und Vergleich mit den EC<sub>50</sub>-Werten an PPAR<sub>γ</sub>.**

Thyroidhormon	Zellpellets: Konzentration (ng/100 mg Zellen) <sup>a</sup>	Inkubations- medium: Konzentration (ng/100 mg Zellen) <sup>a</sup>	Trypsin/EDTA /DMEM: Konzentration (ng/100 mg Zellen) <sup>a</sup>	Gesamt: Konzentration (ng/100 mg Zellen) <sup>a</sup>	PPAR <sub>γ</sub> EC <sub>50</sub> [ng/mL] <sup>b</sup>
<b>T3 (2)</b>	115 ± 3 ng	41 ± 8 ng	18 ± 1 ng	174 ± 6 ng	3776 ± 456
<b>TETRAC (4)</b>	0,46 ± 0,09 ng	31 ± 6 ng	13 ± 1 ng	44 ± 6 ng	75 ± 7,5
<b>TRIAC (3)</b>	nicht detektierbar	nicht detektierbar	nicht detektierbar	nicht detektierbar	230 ± 31

<sup>a</sup> Die Konzentrationen wurden in HepG2-Zellen bestimmt, Konz. ± S.E.M., n = 3

<sup>b</sup> Die Ergebnisse wurden in HEK293T-Zellen als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO ± S.E.M. bestimmt, n ≥ 3.

Mit Hilfe der LC-MS/MS konnte festgestellt werden, dass 100 mg HepG2-Zellen innerhalb von 24 Stunden aus T4 (1) etwa 174 ng T3 (2) und 44 ng TETRAC (4) (Verhältnis 4:1) bilden konnten. Vergleicht man diese Werte mit den ermittelten EC<sub>50</sub>-Werten scheint es durchaus

möglich zu sein, dass ausreichende Mengen bzw. Konzentrationen an TETRAC (4) in der Leber gebildet werden können, um eine physiologisch relevante PPAR $\gamma$ /RXR-Aktivierung zu bewirken. Da ungefähr 75 ng/mL TETRAC (4) benötigt werden, um PPAR $\gamma$  mit einer mittleren effektiven Konzentration zu aktivieren und 100 mg HepG2-Zellen in der Lage waren 44 ng TETRAC (4) zu synthetisieren, könnte der EC<sub>50</sub>-Wert mit 200 mg enzymatisch aktivem Lebergewebe sogar überschritten werden. Die Menge an TRIAC (3) war nicht detektierbar. Möglicherweise wäre eine längere Inkubationszeit mit T4 (1) notwendig gewesen, damit eine detektierbare Menge an TRIAC (3) gebildet worden wäre.

Auffällig war zudem, dass die höchste TETRAC-Menge im Inkubationsmedium zu finden war (31 ± 6 ng). Dieses Medium entspricht dem Medium, in dem T4 (1) zu den Zellen gegeben wurde und das kurz vor dem Ablösen der Zellen entnommen wurde. In der Mischung aus Trypsin/EDTA/DMEM befanden sich zudem ein größerer Teil TETRAC (13 ± 1 ng, 4). Im Zellpellet hingegen konnte am wenigsten TETRAC (4) detektiert werden (0,46 ± 0,09 ng). Dies spricht dafür, dass das TETRAC (4) aus den Zellen diffundiert ist und sich daher im extrazellulären Medium befand. Da eine Zelllinie keinen Zellverband widerspiegelt, der vergleichbar mit einem vollständigen Organ wäre, ist eine Interpretation dieser Beobachtung nur begrenzt möglich. Außerdem könnte der pH-Wert des Mediums (pH = 7 – 7,4) möglicherweise dazu beigetragen haben, dass TETRAC (4) nach Diffusion aus der Zelle zumindest teilweise deprotoniert wurde und daher das Diffusions-Gleichgewicht gestört war. Eine Diffusion zurück in die Zelle könnte durch die negative Ladung des Carboxylats verhindert worden sein. T3 (2) hingegen besitzt auf Grund seiner Aminosäure-Struktur eine wesentlich schwächere Acidität und benötigt zudem einen aktiven Transporter, um aus der Zelle in den Extrazellularraum zu gelangen. Dies könnte die Beobachtung erklären, dass T3 (2) im Gegensatz zu TETRAC (4) vor allem intrazellulär (115 ± 3 ng) zu finden war (Tabelle 26). Vermutlich lässt sich die Beobachtung, dass sich TETRAC (4) extrazellulär und T3 (2) intrazellulär anreichert nicht auf ein physiologisches System übertragen. Wahrscheinlicher ist, dass auch TETRAC (4) sich endogen auf Grund seines lipophilen Charakters ebenfalls eher intrazellulär anreichert.

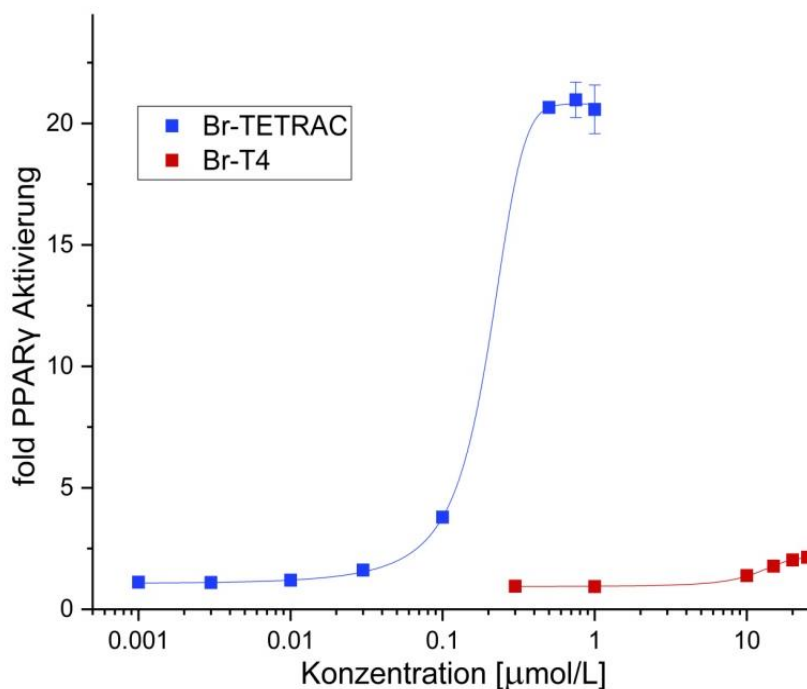
### 3.3.2 *In vivo* pharmakologische Charakterisierung

Zusätzlich zum *in vitro* Experiment wurde auch ein *in vivo* Experiment mit C57BL6/JRj Mäusen durchgeführt, um die endogene Relevanz der PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Thyroidhormone zu evaluieren. Es sollte ermittelt werden, ob die Expression verschiedener PPAR $\gamma$ -Zielgene nach Applikation eines T4-Derivats in den entsprechenden Mäuse-Lebern ansteigt. Dabei wurde den Mäusen ein an der 3-Position mit Brom substituiertes T4-Derivat in Form von Br-T4 (92) appliziert, um Interferenzen mit den endogenen Thyroidhormon-

Spiegeln und der Thyroidhormon-Bildung der Mäuse zu vermeiden. Anschließend wurde die PPAR $\gamma$ -Zielgen-Expression nach einer Stunde, nach acht Stunden und nach 24 Stunden quantifiziert, um eine zeitabhängige Zielgen-Expression zu untersuchen.

T4 (1), TETRAC (4) und TRIAC (3) besaßen im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay (siehe Kapitel 3.1.1) jeweils die höchste maximale Aktivierung an PPAR $\gamma$ . Daher sind diese Derivate vermutlich auch endogen von größerer Bedeutung, wenn man die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch Thyroidhormone betrachtet. Bei der Quantifizierung der Thyroidhormone in HepG2-Zellen, wurde deutlich, dass innerhalb von 24 Stunden wahrscheinlich nur TETRAC (4) in einer für die PPAR $\gamma$ -Bindung relevanten Menge, gebildet werden konnte. Daher ist davon auszugehen, dass auch in dem *in vivo* Experiment vor allem T4 (1) und TETRAC (4) und weniger TRIAC (3) zu einer Expression der verschiedenen PPAR $\gamma$ -Zielgene beitragen, da die PPAR $\gamma$ -Zielgene spätestens nach 24 Stunden quantifiziert wurden.

Da nur eine geringe synthetische Veränderung beim Br-T4 (92) im Vergleich zu T4 (1) vorgenommen wurde, sollte der Metabolismus analog zur Konversion von T4 (1) zu TETRAC (4) ablaufen. Vor der Durchführung des Versuchs wurde die Bindungs-Aktivität des Br-T4 (92) und des entsprechend gebildeten Br-TETRAC (93) im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay untersucht.



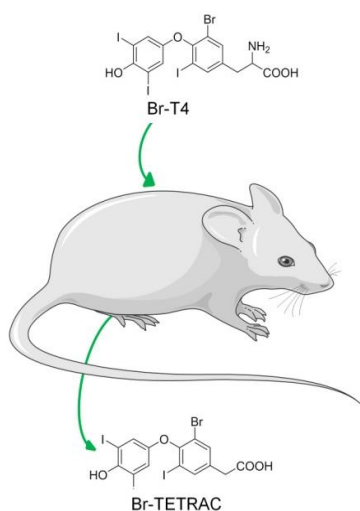
**Abbildung 56: Aktivität von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93) im Gal4-Luciferase Reportergen Assay. Die Ergebnisse wurden in HEK293T-Zellen als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n  $\geq$  3, Duplikate (einzelne PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1, Abbildung 70 & 71).**

**Tabelle 27: Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93) mittels Gal4-Luciferase-Reportergen Assay.**

Substanz	PPAR $\gamma$
	EC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] (max. Akt.) <sup>a</sup>
Br-T4 (92)	12,9 $\pm$ 0,3 (2,3 $\pm$ 0,1)
Br-TETRAC (93)	0,30 $\pm$ 0,01 (21 $\pm$ 1)

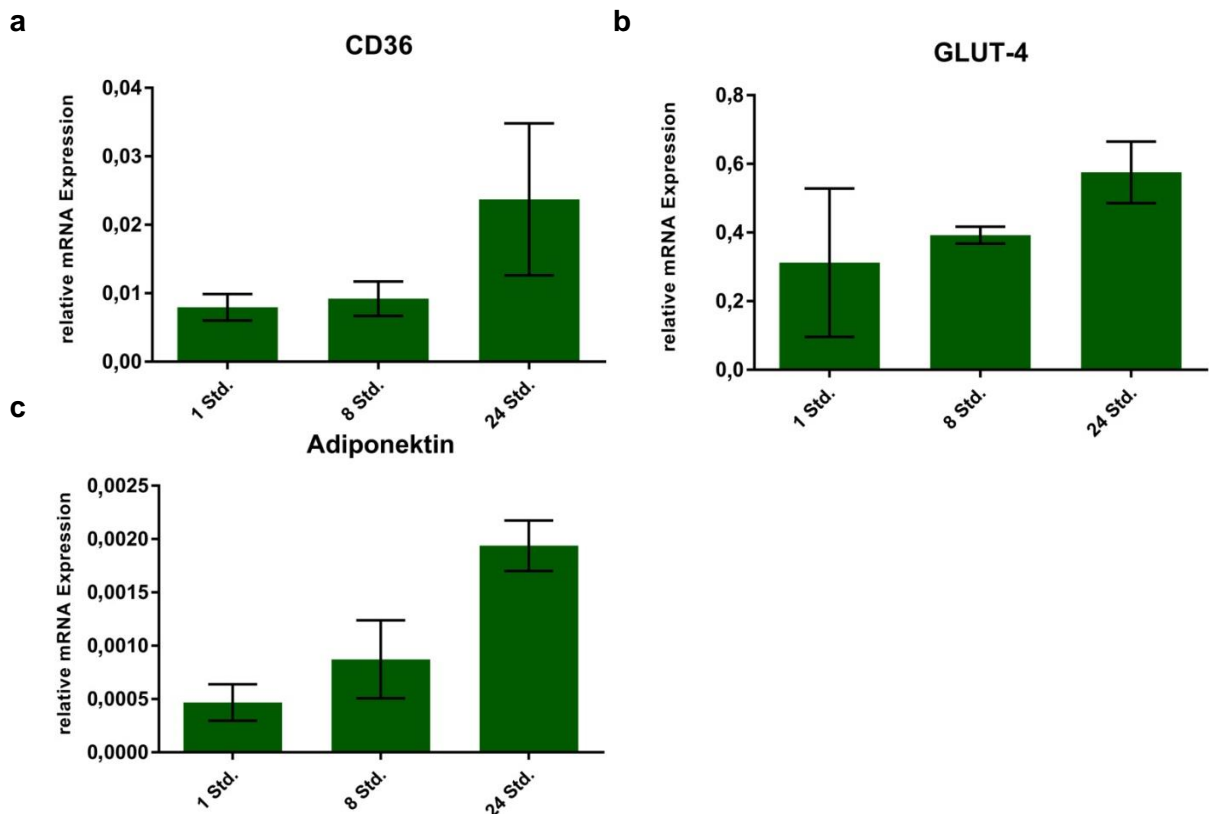
<sup>a</sup> Die Ergebnisse wurden in HEK293T-Zellen als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n  $\geq$  3, Duplikate (einzelne PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1, Abbildung 70 & 71).

Im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay zeigte Br-T4 (92) im Gegensatz zu T4 (1) fast keine Aktivität an PPAR $\gamma$ . Br-TETRAC (93) hingegen war nahezu äquipotent im Vergleich zu TETRAC (4) (Abbildung 56 & Tabelle 27, einzelne PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven siehe Anhang Kapitel 5.2.1, Abbildung 70 & 71). Da Br-T4 (92) somit nur geringfügig in der Lage seien sollte die Expression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen zu induzieren, muss eine Metabolisierung zum weitaus aktiveren und potenteren Br-TETRAC (93) stattfinden, um eine signifikante Erhöhung der Zielgen-Expression zu detektieren.



**Abbildung 57: *In vivo* Evaluierung der PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Thyroidhormone. Jeweils 3 C57BL6/JRj Mäuse wurden mit 3 mg/kg Br-T4 (92) behandelt und nach jeweils einer, acht und 24 Stunden wurden die Lebern entnommen und die Expression einiger PPAR $\gamma$ -Zielgene mittels qPCR untersucht.**

Nachdem die Bindungs-Aktivität von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93) im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay evaluiert wurde, wurde das *in vivo* Experiment durchgeführt. Hierzu wurden jeweils drei C57BL6/JRj Mäuse mit 3 mg/kg Br-T4 (92) behandelt (Abbildung 57). An drei verschiedenen Zeitpunkten (1, 8 und 24 Stunden) nach der Applikation, wurden die Mäuse getötet und ihre Leber entnommen. Nach Isolierung der Hepatozyten wurde die Expression der PPAR $\gamma$ -regulierten Gene CD36, GLUT-4 und Adiponektin auf mRNA-Ebene untersucht.



**Abbildung 58: qPCR-Auswertung der Expression von (a) CD36, (b) GLUT-4 und (c) Adiponektin in den isolierten Hepatocyten der C57BL6/JRj Mäuse nach Br-T4-Applikation. Die Ergebnisse wurden als relative mRNA Expression ( $2^{-\Delta Ct}$ )  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n = 3, Triplikate.**

Die Expression aller drei PPAR $\gamma$ -Zielgene stieg in den untersuchten Mäuse-Lebern zeitabhängig an. Die Fettsäuretranslokase CD36, die die Aufnahme von Fettsäuren in die Zellen induziert<sup>459,465</sup>, wurde nach einer und nach acht Stunden nur gering exprimiert. Erst nach 24 Stunden kam es zu einem Anstieg der Expression. Auch der Glucosetransporter GLUT-4 wurde zeitabhängig induziert und zeigte nach 24 Stunden die höchste relative mRNA Expression. Die Expression des Adipokins Adiponektin, das für eine Reduktion der Gluconeogenese und eine erhöhte Glucose-Aufnahme in die Zellen sorgt und damit für eine verbesserte Insulinsensitivität<sup>264–268</sup>, zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Auch Adiponektin wurde nach 24 Stunden deutlich stärker exprimiert (Abbildung 58). Da nach 24 Stunden die Induktion der Transkription jeweils am stärksten war, sprach dies dafür, dass ausgehend von Br-T4 (**92**), das an PPAR $\gamma$  wesentlich aktivere Br-TETRAC (**93**) gebildet wurde und für die Zielgen-Expression sorgte. Auch im *in vitro*-Experiment mit HepG2-Zellen konnte analog nach 24 Stunden eine für eine PPAR $\gamma$ -Aktivierung relevante Menge TETRAC (**4**) nachgewiesen werden. Folglich konnte abgeleitet werden, dass die Mäuse, die mit Br-T4 (**92**) behandelt wurden, in der Leber ausreichend Br-TETRAC (**93**) synthetisierten, um eine physiologisch relevante PPAR $\gamma$ -Aktivierung zu ermöglichen. Auf Grund von Matrix-Effekten konnte die exakte Menge an gebildetem Br-TETRAC (**93**) jedoch nicht quantifiziert werden.

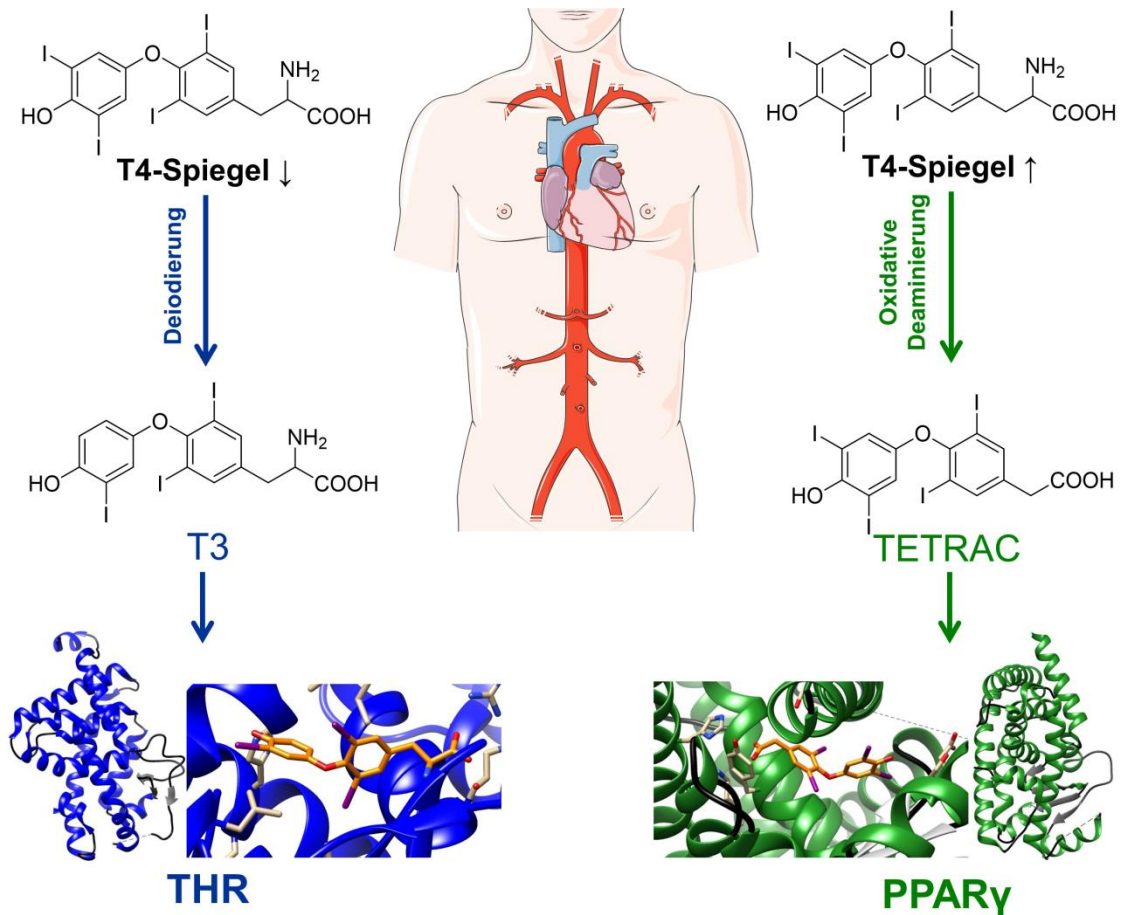


### 3.4 Diskussion

Das endokrine System der Thyroidhormone ist ein hochkomplexes Zusammenspiel aus zahlreichen klassischen und nicht-klassischen Hormonen, aktivierenden und deaktivierenden Metabolisierungs-Schritten sowie zahlreichen Rezeptor-Proteinen, das eine Vielzahl physiologischer Prozesse reguliert und einige Besonderheiten aufweist. Häufig dienen metabolische Prozesse zur reinen Erhöhung der Hydrophilie von Molekülen und damit einer verbesserten Elimination. Jedoch zeigt schon der Hauptabbauweg der Deiodierung, dass Thyroidhormone eine Sonderstellung einnehmen. Thyroidhormone werden zunächst durch eine Deiodierung von T4 (1) an der 5'-Position zum an den THR<sub>s</sub> biologisch aktiveren T3 (2) metabolisiert. Es kommt folglich nicht wie bei gewöhnlichen Abbau-Mechanismen zur Inaktivierung, sondern zu einer Aktivierung der Thyroidhormone. Auch die lange als inaktive Thyroidhormon-Metabolite betrachteten weiteren Abbauprodukte, die sog. nicht-klassischen Thyroidhormone, zeigen, dass sie nicht nur zum Zweck der besseren Elimination gebildet werden, sondern auch physiologische Funktionen besitzen<sup>616,725</sup>. Während in den letzten Jahren vor allem die Entdeckung der nicht-genomischen Signalwege der Thyroidhormone im Vordergrund stand, konnte in dieser Arbeit nun gezeigt werden, dass Thyroidhormone, insbesondere TETRAC (4), auch andere genomische Wirkmechanismen besitzen, indem sie das PPAR<sub>γ</sub>/RXR-Heterodimer aktivieren.

#### 3.4.1 Physiologische Bedeutung der Thyroidhormon-PPAR<sub>γ</sub>-Interaktion

Während die THR<sub>s</sub> beim Erwachsenen für einen erhöhten Grundumsatz, die Bereitstellung von Glucose, die Lipolyse und die Thermogenese verantwortlich sind und damit katabole Stoffwechselprozesse fördern<sup>12,85</sup>, nimmt PPAR<sub>γ</sub> eine weitgehend gegensätzliche Rolle bei Stoffwechselprozessen ein. Fettsäuren werden durch PPAR<sub>γ</sub>-Aktivierung ins Fettgewebe transportiert und akkumulieren nach Veresterung mit Glycerol in sog. Lipidtröpfchen, die als Energiespeicher dienen. Außerdem besitzt PPAR<sub>γ</sub> adipogene Effekte durch die Induktion der Adipocyten-Differenzierung, sorgt für eine verbesserte Glucose-Aufnahme in die Zellen und eine erhöhte Insulinsensitivität<sup>241,248,251,252</sup>. Insgesamt fördert PPAR<sub>γ</sub> daher im Gegensatz zu den THR<sub>s</sub> anabole Stoffwechselprozesse.



**Abbildung 59:** Die durch Deiodierung und oxidative Deaminierung zuerst gebildeten Metabolite T3 (2) und TETRAC (4) aktivieren zwei gegensätzliche Signalwege, die über die THR $\alpha$ s und PPAR $\gamma$  vermittelt werden. Dabei könnten die T4-Spiegel von entscheidender Bedeutung sein, welches Derivat gebildet wird. Es ist möglich, dass die Bildung von TETRAC (4) eine Art zusätzlichen Rückkopplungsmechanismus darstellt. Durch die Aktivierung anaboler PPAR $\gamma$ -Signalwege könnte den katabolen THR-Signalwegen entgegengewirkt werden und TETRAC (4) somit eine Rolle bei der Wiederherstellung der Homöostase spielen.

Interessanterweise sind jeweils die zuerst gebildeten Metabolite der Deiodierung bzw. der oxidativen Deaminierung die jeweils potentesten Derivate an den THR $\alpha$ s bzw. am PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimer. Es scheint daher eine enge Verknüpfung mit dem jeweiligen metabolischen Prozess und der Aktivierung des entsprechenden nukleären Rezeptors zu geben.

**Tabelle 28: Expressionsmuster der an der T3- und TETRAC-Bildung beteiligten Enzyme**

Abbauweg	Enzym	Expressions-Muster
<b>Deiodierung</b>	Deiodase 1 (D1) <sup>620</sup>	Hauptexpressionsort: Leber, Niere und Schilddrüse
	Deiodase 2 (D2) <sup>620,621</sup>	Hauptexpressionsort: ZNS, Hypothalamus, Hypophyse, weißes und braunes Fettgewebe, Skelettmuskel
<b>oxidative Deaminierung</b>	L-Aminosäure Oxidasen (LAAOs)	Hauptexpressionsort: Leber, Niere, Milz und Leukozyten <sup>616</sup>
	L- $\alpha$ -Aminosäure Transaminasen (LATs): z.B. Thyroidhormon Transaminase (EC 2.6.1.26)	Hauptexpressionsort: Leber und Niere <sup>648</sup>
	Kynurenin/Alpha-Aminoacidipat Aminotransferase (AADAT) <sup>657</sup>	Hauptexpressionsort: Leber, GI-Trakt, Nieren, Herz, Gehirn, Pankreas, Prostata, Hoden und Eierstöcke <sup>659</sup>
	MAO <sup>653,654</sup> (MAO-A, MAO-B)	Ubiquitär MAO-A: ZNS, Leber, Lungenendothel, GI-Trakt, Plazenta MAO-B: ZNS und Blutplättchen
	SSAO <sup>653,654</sup>	Hauptexpressionsort: Adipocyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Blut-Plasma <sup>660</sup>

**Tabelle 29: Expressionsmuster der THR $\alpha$ s und PPAR $\gamma$**

Rezeptor	Isoform	Expressions-Muster
<b>THR</b>	THR $\alpha$ 1	ubiquitär Hauptexpressionsort: Skelettmuskel, Herz, braunes Fettgewebe, Knochen und ZNS <sup>72</sup>
	THR $\beta$ 1	ubiquitär systemische Splicevariante der THR $\beta$ Isoform Hauptexpressionsort: Leber und Niere, aber auch im braunen Fettgewebe <sup>78</sup>
	THR $\beta$ 2	ubiquitär Hauptexpressionsort: Hypophyse, Innenohr <sup>79</sup> , Retina <sup>56</sup> und in einigen Hirnarealen <sup>80-86</sup>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	PPAR $\gamma$ 1	Hauptexpressionsort: Darm, Gehirn, Gefäßzellen und Immunzellen <sup>232,233</sup>
	PPAR $\gamma$ 2	Hauptexpressionsort: Fettgewebe <sup>236-238</sup>
	PPAR $\gamma$ 3	Hauptexpressionsort: Makrophagen <sup>234</sup>

Möglicherweise spielt es eine Rolle in welchem Kompartiment T4 (1) akkumuliert, um entsprechende PPAR $\gamma$ -induzierte anabole oder THR-induzierte katabole Stoffwechselprozesse einzuleiten.

Kompartimente, in denen vorwiegend D2, das hauptsächlich für die Bildung von T3 (2) verantwortlich ist, exprimiert wird, sind vor allem das ZNS, der Hypothalamus, die Hypophyse, das weiße und braune Fettgewebe und die Skelettmuskeln<sup>620,621</sup>. D1 ist zwar ebenfalls in der Lage T4 (1) zu T3 (2) zu deiodieren, jedoch spielt D1 bei der T3-Synthese verglichen mit D2 nur eine untergeordnete Rolle. D1 ist hauptsächlich in Leber, Niere und Schilddrüse zu finden<sup>620</sup>. Da der exakte Metabolismus von TETRAC (4) bisher noch nicht vollständig aufgeklärt ist und vorwiegend *in vitro*-Daten zu Enzymen vorliegen, die in der Lage sind T4 (1) zu TETRAC (4) umzuwandeln, ist noch nicht bewiesen welche Kompartimente tatsächlich endogen für die TETRAC-Synthese verantwortlich sind. Wahrscheinlich findet die Biosynthese hauptsächlich in der Leber und der Niere statt, da dort zumindest die LAAOs, die LATs, insbesondere die Thyroidhormon Transaminase, die

AADAT und die MAOs exprimiert werden<sup>648,653,654,657,659</sup>. Zum Teil kann TETRAC (4) aber vermutlich auch in Adipocyten gebildet werden, da dort die SSAO exprimiert wird, die in *in vitro* Experimenten in der Lage war die Synthese von TETRAC (4) zu katalysieren<sup>653,654</sup>.

Außerdem spielt die Expression von den THR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  eine Rolle. THR $\alpha$  ist zwar genauso wie THR $\beta$ , ubiquitär exprimiert, hauptsächlich findet man THR $\alpha$ 1 jedoch im Skelettmuskel, Herz, braunen Fettgewebe, Knochen sowie im ZNS. THR $\beta$ 1 stellt die systemische Splicevariante der THR $\beta$  Isoform dar und wird vor allem in Leber und Niere, aber auch im braunen Fettgewebe exprimiert<sup>78</sup>. THR $\beta$ 2 findet man neben der Hypophyse auch im Innenohr<sup>79</sup> und in der Retina<sup>56</sup> sowie in einigen Hirnarealen<sup>80–86</sup>.

PPAR $\gamma$  wird hingegen hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert (PPAR $\gamma$ 2)<sup>236–238</sup>, ist aber auch in Leber, Darm, Gehirn, Gefäßzellen und Immunzellen (PPAR $\gamma$ 1)<sup>232,233</sup>, sowie in Makrophagen (PPAR $\gamma$ 3) zu finden<sup>234</sup>.

Da THR $\alpha$  und THR $\beta$  in ähnlichen Kompartimenten exprimiert werden, in denen T3 (2) gebildet werden kann, ist davon auszugehen, dass eine Akkumulation von T4 (1) in Skelettmuskeln, braunen Fettgewebe, sowie im ZNS, Hypophyse und Hypothalamus zu einer Induktion von THR-Signalwegen führt. Die PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch TETRAC (4) hingegen, könnte endogen vor allem im weißen Fettgewebe eine Rolle spielen. In Kompartimenten, wie Leber und Niere ist eine Bildung von TETRAC (4) und T3 (2) möglich. Da dort sowohl die THR $\alpha$  als auch PPAR $\gamma$  zu finden sind, könnten beide Signalwege in diesen Kompartimenten von Bedeutung sein.

Die Thyroidhormon-Spiegel werden durch eine Rückkopplung mit der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse reguliert. Die Rückkopplung erfolgt nahezu ausschließlich über freies T4 (1), das nicht an Transthyretin gebunden vorliegt. Das freie T4 (1) ist in der Lage die TSH-Synthese und -Ausschüttung in der Hypophyse zu beeinflussen, indem es an THR $\alpha$  in der Hypophyse bindet, die wiederum in der Promotor-Region des TSH-Gens binden und für eine Transrepression sorgen<sup>602</sup>. Neben diesem Hauptregelkreis gibt es noch einige zusätzliche Rückkoppelungsschleifen. Auch die TRH-Synthese im Hypothalamus (*Long-Feedback-Mechanismus*) kann direkt durch T4 (1) und auch T3 (2) beeinflusst werden. Folglich wird auch die TSH-Ausschüttung inhibiert<sup>603</sup>. Zudem gibt es einen Ultra-Short-Rückkopplungsmechanismus, der den hemmenden Effekt von TSH auf sich selbst (Brokken-Wiersinga-Prummel-Regelkreis) beschreibt. Außerdem hat TSH einen Einfluss auf die Deiodasen-Aktivität und kann die Expression von D2 direkt induzieren<sup>612</sup>. Zusätzlich kann die Deiodasen-Funktion von D2 auch durch Ubiquitinierung bzw. Deubiquitinierung beeinflusst werden. Bei erhöhten T4-Spiegeln wird die Enzym-Aktivität von D2 durch Ubiquitinierung des Enzyms inhibiert<sup>620,621</sup>.

T3 (2) spielt bei der negativen Rückkopplung nur eine untergeordnete Rolle. Da T3 (2) meist intrazellulär am Wirkort gebildet wird, spiegeln die Blutspiegel von T3 (2) nicht den aktuellen Bedarf oder Überschuss an Thyroidhormonen wider und sind daher als Referenz-Wert nicht geeignet. Zudem würde eine Rückkopplung über T3 (2) deutlich länger dauern, da T3 (2) zunächst durch Deiodasen gebildet werden muss<sup>602</sup>.

Möglicherweise könnte eine Verschiebung der Expressionsmuster von Enzymen, die an der Bildung von T3 (2) und TETRAC (4) beteiligt sind, eine zusätzliche Rolle bei der Rückkopplung von Thyroidhormonen spielen. Da bereits bekannt ist, dass die Rückkopplung über den Einfluss auf die Deiodase-Aktivität erfolgen kann, lässt sich vermuten, dass zusätzlich auch vermehrt Enzyme zur Bildung von TETRAC (4) exprimiert werden könnten. Diese entsprechenden Enzyme könnten dafür sorgen, dass neben der eingeschränkten katabolen THR-Aktivität eine anabole Stoffwechsel-Lage durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$  induziert wird. Da der Metabolismus der Iodthyroacetate aber noch nicht komplett aufgeklärt ist, bedarf es zur Bestätigung dieser Hypothese noch einer genaueren Untersuchung. Zum einen müssen die Enzyme, die an der oxidativen Deaminierung beteiligt sind und die exakte TETRAC-Synthese untersucht werden. Zum anderen muss nachgewiesen werden, dass TETRAC (4) tatsächlich im hyperthyreoten Zustand induziert wird.

Neben dieser potenziellen Funktion könnte TETRAC (4), aber auch TRIAC (3) und T4 (1) als endogener PPAR $\gamma$ -Agonist auch verantwortlich für einige noch nicht geklärte molekulare Wirkmechanismen der Thyroidhormone sein. Bisher ging man davon aus, dass die beobachtete Induktion<sup>661–663,726</sup> einiger PPAR $\gamma$ -Signalwege alleine auf einem *crosstalk* zwischen den THRs und PPAR $\gamma$  beruht. Auf Grund der Konkurrenz um den Heterodimer-Partner RXR, aber auch um Response Elemente<sup>661,662</sup>, wie z.B. DR1, das eigentlich als PPAR $\gamma$  Response Element gilt<sup>726</sup>, überschneiden sich die Signalwege der THRs und PPAR $\gamma$ . Aber auch um Coaktivatoren, wie SRC-1, CBP und PGC-1 $\alpha$ , stehen die Rezeptoren in Konkurrenz<sup>663</sup>.

Beispielsweise wird der Einfluss der Thyroidhormone auf die Adipocyten-Differenzierung bisher durch den Corepressor NCoR1 (TRAC-1) begründet<sup>159,686,687</sup>. Der nicht-ligandengebundene THR $\beta$ 1 rekrutiert Corepressoren wie NCoR1 und kann durch Assoziation an PPAR $\gamma$  bewirken, dass trotz Anwesenheit eines PPAR $\gamma$ -Liganden die inaktive Konformation von PPAR $\gamma$  bestehen bleibt. Es kommt folglich zu einer Transrepression von PPAR $\gamma$  Zielgenen und einer verminderten Adipocyten-Differenzierung. Bindet T3 (2) an den nicht-ligandengebundenen THR $\beta$ 1, wird der THR $\beta$ 1/PPAR $\gamma$ -Komplex aufgelöst und die Ligand-abhängige Aktivierung von PPAR $\gamma$  kann wieder erfolgen<sup>688–690</sup>.

Jedoch könnten diese Effekte auf die Adipocyten-Differenzierung auch - zumindest teilweise - durch eine direkte Interaktion der Thyroidhormone mit PPAR $\gamma$  hervorgerufen werden. Die

hier beschriebenen *in vitro* Untersuchungen belegen, dass TETRAC (4) in der Lage ist die Adipocyten-Differenzierung zu induzieren. Vorangegangene, bereits publizierte Experimente mit T3 (2), zeigten ebenfalls, dass es in Kombination mit Insulin und Transferrin zu einer Differenzierung von Präadipocyten kommt<sup>691,692</sup>. Da die Enzyme, die die oxidative Deaminierung der Thyroidhormone katalysieren auch in Adipocyten exprimiert werden, ist es möglich, dass während der Behandlung der Präadipocyten mit T3 (2) TRIAC (3) gebildet wurde, das PPAR $\gamma$  wesentlich potenter und mit einer höheren maximalen Effizienz als T3 (2) aktiviert und die Differenzierung induziert. Des Weiteren werden durch Thyroidhormone zahlreiche PPAR $\gamma$ -regulierte Gene, die eine Rolle während der Differenzierung spielen, induziert. Zu diesen Genen zählen die PEPCK<sup>279</sup>, die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD)<sup>727</sup>, das Malat-Enzym (ME)<sup>728</sup>, die FAS<sup>257</sup>, der GLUT-4<sup>276</sup> und einige andere Gene, wie CD36, FABP4, LPL und Adiponektin<sup>729–733</sup>.

Bisher ging man davon aus, dass es zu einer indirekten Induktion dieser Zielgene durch Interaktionen von PPAR $\gamma$  und den THR $s$  kommt. Jedoch kann ebenso eine direkte PPAR $\gamma$  Bindung für die Expression verantwortlich sein.

Auch der Einfluss der Thyroidhormone auf den Glucosestoffwechsel<sup>693,694</sup> könnte durch eine direkte PPAR $\gamma$ -Interaktion hervorgerufen werden. Durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$  wird die Expression von Glucosetransportern, wie GLUT-1<sup>276</sup>, GLUT-2<sup>277</sup> und GLUT-4<sup>278</sup> induziert. Thyroidhormone sind ebenfalls in der Lage die Expression der Glucosetransporter zu stimulieren. Dabei werden vor allem GLUT-4 und GLUT-1 induziert. Während GLUT-4 ein TRE besitzt<sup>122</sup> und daher auch durch die Aktivierung der THR $s$  exprimiert werden kann, ist der Mechanismus der GLUT-1 Induktion noch ungeklärt<sup>695,696</sup>, könnte aber ebenfalls auf einer Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Interaktion beruhen. Bisher wird vermutet, dass eine Thyroidhormon-abhängige Induktion von HIF-1 $\alpha$  zu einer Aktivierung von PI3K- und ERK-Signalkaskaden führt, die letztendlich für die Expression von GLUT-1 und GLUT-4 sorgen<sup>697</sup>.

Betrachtet man metabolische Stoffwechselprozesse, dann unterscheiden sich die Wirkungen, die über die THR $s$  und PPAR $\gamma$  vermittelt werden, grundlegend. Jedoch führt die Aktivierung beider nukleärer Rezeptoren zu einer Thermogenese. Durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung von der Atmungskette und die Induktion von UCP1 und UCP3, können Thyroidhormone die Thermogenese fördern. Auch die Aktivierung von PPAR $\gamma$  führt zu einer erhöhten Expression von UCP1<sup>245</sup>. Unter anderem ist das durch PPAR $\gamma$  induzierte Adiponektin für die UCP1 Expression verantwortlich<sup>264–268</sup>.

Besonders TRIAC (3) ist in der Lage die Expression von UCP1 signifikant zu erhöhen und wirkt dabei wesentlich potenter als T3 (2). Diese etwa 10 bis 50-fach höhere Potenz<sup>698</sup> könnte für eine zusätzliche Aktivierung von PPAR $\gamma$  und eine drauf folgende Induktion von UCP1 sprechen, da TRIAC (3) ebenfalls wesentlich potenter an PPAR $\gamma$  bindet im Vergleich

zu T3 (**2**). Die THR $\beta$ -Isoform ist zwar ebenfalls in der Lage bei einer Aktivierung UCP1 zu exprimieren<sup>108</sup>, jedoch ist TRIAC (**3**) an THR $\beta$  nur geringfügig potenter als T3 (**2**)<sup>8,9</sup>. Bisher wird angenommen, dass TRIAC (**3**) die Rekrutierung des Coaktivators PGC-1 $\alpha$  verbessert<sup>698</sup> und daher die Transaktivierung von PPAR $\gamma$  erhöht wird und somit auch die Expression von UCP1<sup>699,700</sup>. Eine direkte Interaktion mit PPAR $\gamma$  könnte jedoch ebenfalls vorliegen.

Die Bindung des PPAR $\gamma$ /RXR-Heterodimers durch Thyroidhormone verdeutlicht die Komplexität der Thyroidhormon-Signalwege. Die tatsächliche Funktion der Aktivierung dieses nahezu gegensätzlichen nukleären Rezeptors muss zukünftig noch weiter untersucht werden. Es ist möglich, dass Thyroidhormone gewebespezifisch entweder die THR $\alpha$ s oder PPAR $\gamma$  aktivieren. Um diese Hypothesen zu belegen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, insbesondere zu den tatsächlichen Gewebespiegeln in relevanten Geweben wie dem Fettgewebe. Außerdem sollte der Einfluss der Thyroidhormone auf die Adipocyten-Differenzierung, den Glucose-Stoffwechsel und die Thermogenese im Hinblick auf eine direkte Interaktion mit PPAR $\gamma$  genauer untersucht werden.

### 3.4.2 Pharmakologische Bedeutung der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Interaktion

Neben der physiologischen Bedeutung einer direkten Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung, können die hier beschriebenen Beobachtungen auch für die zukünftige Arzneistoff-Entwicklung von Interesse sein. PPAR $\gamma$  wurde vor allem als molekulare Zielstruktur der Glitazone bekannt<sup>210,211</sup>. Glitazone wurden als orale Antidiabetika eingesetzt. Der Vertrieb von Rosiglitazon (**23**) wurde mittlerweile jedoch eingestellt und Pioglitazon (**7**) ist in Deutschland nur noch in begründeten Ausnahmefällen verordnungsfähig<sup>354,355</sup>. Vor allem der Verdacht, dass Glitazone kardiovaskuläre Nebenwirkungen<sup>350</sup> auslösen können und Pioglitazon (**7**) mit Blasen Tumoren assoziiert wird<sup>353</sup>, schränken die Anwendung der Glitazone enorm ein. Dennoch ist PPAR $\gamma$  eine attraktive molekulare Zielstruktur, über die eine signifikante Verbesserung der Insulinsensitivität erzielt werden kann. Außerdem besitzt PPAR $\gamma$  antiatherogene Effekte<sup>364</sup> und hat eine antiinflammatorische Wirkung<sup>282–285</sup>. Glitazone, darunter vor allem Rosiglitazon (**23**) und Troglitazon (**37**), weisen meist eine sehr hohe maximale Aktivierung an PPAR $\gamma$  auf<sup>326,328</sup>. Vermutlich ist jedoch eine partialagonistische Aktivierung des Rezeptors von Vorteil, um das Nebenwirkungsprofil zu minimieren. Dabei sollen vor allem die PPAR $\gamma$ -induzierten adipogenen Effekte vermieden werden, unter Beibehaltung der antiatherogenen, antiinflammatorischen und insulinsensibilisierenden Wirkung<sup>53</sup>. Da TETRAC (**4**) ein solches partialagonistisches Profil aufweist und der Bindungsmodus von TETRAC (**4**), als potenzieller endogener PPAR $\gamma$ -Ligand sich zudem vom Bindungsmodus der synthetischen Liganden unterscheidet, könnte TETRAC (**4**) zukünftig als molekulare Leitstruktur zur Entwicklung neuer PPAR $\gamma$ -Modulatoren dienen. Die starke direkte Interaktion der Thiazolidindion-Struktur der Glitazone

mit der PPAR $\gamma$ -Aktivierungsfunktion in Helix 12 führt vermutlich zu einer unphysiologisch hohen Aktivierung des Rezeptors und könnte daher ein erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen bedingen. TETRAC (**4**) hingegen interagiert nicht mit der Helix 12 und erzielt deshalb einen schwächeren, aber möglicherweise physiologischeren Effekt auf PPAR $\gamma$ . TETRAC (**4**) könnte demzufolge als Leitstruktur für neue Arzneistoffe dienen, die durch den von Glitazonen abweichenden Bindungsmodus ebenfalls eine partialagonistische Aktivität an PPAR $\gamma$  aufweisen und somit ein verbessertes Nebenwirkungsprofil besitzen könnten.

Neben der Entwicklung selektiver PPAR $\gamma$ -Agonisten, könnten auch Arzneimittel mit einem dualen Wirkmechanismus von Vorteil sein. Wie erläutert wurden Glitazone zunächst als Arzneimittel zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 verwendet<sup>354,355</sup>, fanden aber auch Anwendung in zahlreichen Studien zur Behandlung von anderen Erkrankungen, die mit einer Insulinresistenz einhergehen<sup>53,734</sup>. Auch die antientzündlichen<sup>282–285</sup> und antiatherogenen<sup>364</sup> Eigenschaften von PPAR $\gamma$ -Agonisten sorgen dafür, dass PPAR $\gamma$  immer noch als potenzielle Zielstruktur für neue Arzneimittel gilt. Trotz vielversprechender Ergebnisse erwies sich aber vor allem die signifikante PPAR $\gamma$ -induzierte Gewichtszunahme als problematisch<sup>735</sup>. Einerseits gehen mit einer Insulinresistenz häufig auch andere Symptome des metabolischen Syndroms, darunter auch Adipositas, einher, die durch PPAR $\gamma$ -Agonisten noch verstärkt wird<sup>736</sup>. Andererseits schadet die Gewichtszunahme der *Compliance* der Patienten. Daher wäre ein dualer Wirkmechanismus denkbar, bei dem es neben der Aktivierung von PPAR $\gamma$  zusätzlich zu einer Aktivierung einer molekularen Zielstruktur kommt, die lipolytische, gewichtsreduzierende Eigenschaften hat. Eine solche molekulare Zielstruktur stellt der THR $\beta$  dar.

Ein therapeutischer Einsatz eines PPAR $\gamma$ -Liganden, der zudem eine Aktivität an der THR $\beta$ -Isoform besitzt, könnte zukünftig Verwendung bei mit einer Insulinresistenz assoziierten Erkrankungen spielen. Durch die THR $\beta$ -Aktivierung könnten vor allem lipolytische Effekte und die Steigerung des Grundumsatzes induziert werden. Kardiale Nebenwirkungen hingegen würden verhindert werden, da die Thyroidhormone ihre Wirkung im Herz vor allem über die Isoform THR $\alpha$ 1 vermitteln<sup>182,183</sup>.

TRIAC (**3**) zeichnet sich durch diese erforderliche Isoform-Selektivität ( $EC_{50}(\text{THR}\alpha) = 1,5 \text{ nM}$ ,  $EC_{50}(\text{THR}\beta) = 0,5 \text{ nM}$ <sup>150</sup>) aus und ist zudem auch ein potenter PPAR $\gamma$ -Agonist ( $EC_{50}(\text{PPAR}\gamma) = 0,37 \pm 0,05 \text{ }\mu\text{M}$ ). Einige auf der Struktur von TRIAC (**3**) basierende synthetische Verbindungen wurden bereits als THR $\beta$ -selektive Substanzen in klinischen Studien für verschiedene Indikationen getestet. Das erste TRIAC-Derivat, das in klinischen Studien untersucht wurde, war Eprotirome (KB-2115, **15**). Eine Phase 3 Studie zur Behandlung der heterozygoten familiären Hypercholesterinämie wurde jedoch abgebrochen, da bei einer zeitgleich gestarteten Tierstudie mit Hunden schwere Nebenwirkungen in Form von



Chondrodysplasien auftraten<sup>191</sup>. Am vielversprechendsten ist das von Madrigal Pharmaceuticals entwickelte MGL-3196 (**19**). MGL-3196 (**19**) ist ein THR $\beta$ -selektives Thyromimetikum, das bereits eine Phase 2 Studie zur Behandlung der heterozygoten familiären Hypercholesterinämie erfolgreich abgeschlossen hat. Zudem wurde mittlerweile eine Phase 2 Studie zur Behandlung der NASH gestartet<sup>187</sup>. Ob diese THR $\beta$ -selektiven TRIAC-Analoga ebenfalls potente PPAR $\gamma$ -Agonisten sind, ist nicht bekannt, jedoch könnten sich dadurch positive Effekte auf das Wirkungs-Profil ergeben.

Die NAFLD und die daraus resultierende NASH werden vermutlich durch eine Insulinresistenz verursacht und sind mit dem metabolischen Syndrom assoziiert. Eine *two hit* Hypothese geht davon aus, dass eine Insulinresistenz Ursache für eine Steatose, das Hauptsymptom der NAFLD, ist. Der sog. *second hit* wird durch verschiedene Stoffwechsel-Störungen verursacht und führt zu einer Entzündung der Leber und damit zu einem Fortschreiten der Erkrankung und einer Entwicklung der Steatohepatitis<sup>367</sup>. Zurzeit gibt es noch keine zugelassenen Arzneimittel für die NAFLD bzw. NASH auf den Markt. Es befinden sich jedoch einige Arzneistoffe in klinischen Studien. Unter anderem wird der duale PPAR $\alpha/\delta$ -Agonist Elafibranor in klinischen Studien getestet. Bis Dezember 2021 soll die erste Phase 3 Studie abgeschlossen werden. Über PPAR $\alpha$  sollen vor allem lipolytische Effekte vermittelt werden<sup>386,737</sup> und durch die zusätzliche PPAR $\delta$ -Aktivierung soll durch antiinflammatorische Effekte die Prognose der Steatohepatitis verbessert werden<sup>738,739</sup>.

Auch ein dualer PPAR $\gamma$ /THR $\beta$ -Ligand könnte eine vielversprechende Behandlungsoption für die NAFLD bzw. die NASH darstellen. PPAR $\gamma$  wurde bereits als potenzielle molekulare Zielstruktur zur Behandlung der NAFLD und NASH untersucht. In den USA wird *off label* sowohl die Monotherapie als auch die Kombinationstherapie aus Vitamin E und Pioglitazon (**7**) eingesetzt<sup>740,741</sup>, um die Steatose und auch die Steatohepatitis zu behandeln<sup>738,742</sup>. Eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  erhöht die Insulinsensitivität, führt zu antiinflammatorischen Effekten und sorgt für eine Umverteilung des viszeralen Fettgewebes zu peripherem Fettgewebe<sup>53</sup>. Über den THR $\beta$  werden lipolytische Effekte vermittelt, die zur Behandlung einer Steatose notwendig sind.

Aus der in dieser Arbeit demonstrierten Bindungs-Affinität von Thyroidhormonen zu PPAR $\gamma$  könnten sich folglich neue Therapieoptionen ergeben. Dabei stehen vor allem Erkrankungen, bei denen eine Insulinresistenz zu Grunde liegt, im Vordergrund. Hierzu zählen neben der NAFLD und NASH sämtliche Erkrankungen, die mit dem metabolischen Syndrom assoziiert werden, allen voran Diabetes mellitus Typ 2<sup>736</sup>.

### 3.5 Zusammenfassung, Bewertung und Ausblick

Bis vor etwa 20 Jahren ging man davon aus, dass die Physiologie der Thyroidhormone weitestgehend bekannt und erforscht ist. Die Thyroidhormon-Wirkungen wurden auf eine alleinige Interaktion von Thyroidhormonen mit den nukleären THRs zurückgeführt. Dabei ist vor allem das deiodierte T4-Derivat T3 (**2**) für die Rezeptor-Aktivierung verantwortlich.

Die THRs vermitteln genomische Signalwege, die während der Wachstums- und Entwicklungsphase essentiell sind<sup>1,2</sup>, aber auch beim Erwachsenen eine große Bedeutung haben. Die Aktivierung der THRs führt zu einer katabolen Stoffwechsel-Lage, bei der unter anderem der Lipoprotein-Stoffwechsel, der Gallensäure-Stoffwechsel, der Fettsäure-Metabolismus und der Glucose-Stoffwechsel beeinflusst werden. Insgesamt kommt es zu einem erhöhten Grundumsatz und zudem zur Thermogenese<sup>3,4</sup>.

In den letzten 20 Jahren fand man jedoch heraus, dass die Signalwege der Thyroidhormone weitaus komplexer sind als bisher angenommen. Vor allem die Metabolite des in der Schilddrüse gebildeten T4 (**1**), zeigen ein breites Interaktions-Profil mit anderen molekularen Zielstrukturen<sup>5,6</sup>. Thyronamine, die decarboxylierten Thyroidhormon-Metabolite, binden beispielsweise den G-Protein-gekoppelten *Trace Amine Associated Receptor 1* (TAAR1). Wird dieser Rezeptor aktiviert, kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einem rapiden Abfall der Körpertemperatur, sowie zu einer akuten Bradykardie<sup>7</sup>. Die durch oxidative Deaminierung gebildeten Iodthyroacetate interagieren mit einem Membran-Rezeptor, dem Integrin  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  Rezeptor<sup>10</sup>. Sowohl TETRAC (**4**) als auch TRIAC (**3**) sind Antagonisten dieses Rezeptors, der häufig von Tumorzellen exprimiert wird und besitzen antiproliferative und pro-apoptotische Eigenschaften<sup>10-12</sup>.

Die Fragestellung, die dieser Arbeit zugrunde liegt, ist, ob Thyroidhormone neben diesen neuen zumeist nicht-genomischen Signalwegen, auch THR-unabhängige genomische Wirkmechanismen besitzen. Um dies zu evaluieren wurde zunächst ein Gal4-Luciferase-Reportergen-Assay mit Hilfe von Gal4-Hybrid-Rezeptoren durchgeführt.

Nachdem im Gal4-Luciferase-Reportergen-Assay detektiert wurde, dass Thyroidhormone PPAR $\gamma$  aktivieren können und die Derivate TETRAC (**4**), TRIAC (**3**) und T4 (**1**) auch RXR, den Heterodimer-Partner von PPAR $\gamma$ , binden und aktivieren, wurden diese Interaktionen genauer untersucht. Zunächst wurde durch zwei Kontrollexperimente verifiziert, dass durch Blockade der PPAR $\gamma$ -Bindungstasche und durch Transfektion ohne Gal4-Hybrid-Rezeptor-Plasmid ein signifikant vermindertes Lumineszenz-Signal auftrat, was eine PPAR $\gamma$ -vermittelte Aktivität hinlänglich belegte.

Um die Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ - bzw. Thyroidhormon-RXR $\alpha$ -Bindung ohne störende zelluläre Einflüsse nachzuweisen, wurden zudem ein ITC-Messungen durchgeführt, das ein

orthogonales zellfreies Test-System darstellt. Durch die kalorimetrische Bestimmung der Bindungskonstanten konnte die direkte Interaktion mit beiden Heterodimer-Partnern bestätigt werden.

Anschließend wurden die Effekte studiert, die eine gleichzeitige Aktivierung beider Heterodimer-Partner durch TETRAC (4) zur Folge haben. Dazu wurde ein Coaktivator-Rekrutierungs-Assay durchgeführt. Es wurde deutlich, dass durch die Interaktion mit beiden Heterodimer-Partnern, die Rekrutierung von Coaktivatoren erheblich verstärkt wurde und somit vermutlich auch die Transaktivierungs-Effizienz. Diese durch Bindung beider Heterodimer-Partner verursachten additiven Effekte sind charakteristisch für permissive Heterodimere, wie PPAR $\gamma$ /RXR.

Zur Untersuchung der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Interaktion wurde abschließend durch eine Kristallstruktur-Analyse die direkte, orthosterische Bindung von TETRAC (4) an den nukleären Rezeptor nachgewiesen und zudem der exakte Bindungsmodus von TETRAC (4) in der PPAR $\gamma$ -Liganden-Bindetasche aufgeklärt. Es konnte festgestellt werden, dass der Bindungsmodus von TETRAC (4) sich von anderen Fettsäuremimetika und auch von den Glitazonen, den synthetischen PPAR $\gamma$ -Agonisten unterscheidet. TETRAC (4) wies im Gegensatz zu Glitazonen keine direkte Interaktion mit der Helix 12, der Aktivierungsfunktion nukleärer Rezeptoren, auf. Möglicherweise bietet TETRAC (4) als potenter endogener PPAR $\gamma$ -Modulator damit eine Grundlage zur Entwicklung neuer Arzneistoffe mit einem von Glitazonen abweichenden Bindemodus und potenziell verbessertem Sicherheitsprofil.

Nachdem die Bindung der Thyroidhormone an PPAR $\gamma$  und auch an dessen Heterodimer-Partner RXR intensiv untersucht wurde, wurden die biologischen Effekte dieser Rezeptor-Interaktion in zellulären Experimenten evaluiert. Da PPAR $\gamma$  einen der Hauptregulatoren der Adipocyten-Differenzierung darstellt, wurde zunächst untersucht ob TETRAC (4), als potentester PPAR $\gamma$ -Agonist unter den Thyroidhormon-Metaboliten, ebenfalls in der Lage ist diesen Effekt zu induzieren. Im Vergleich zu Rosiglitazon (23) zeigten sich dabei schwächere aber signifikante adipogene Effekte sowohl in der Akkumulation von Lipiden als auch in der Expression beteiligter, PPAR $\gamma$ -regulierter Gene.

Auch in Leberzellen (HepG2) wurde die Expression PPAR $\gamma$ -regulierter Gene durch TETRAC (4) und andere Thyroidhormone induziert. Um die Transaktivierung von PPAR $\gamma$ -Zielgenen außerdem unabhängig von der Aktivierung der THR $\alpha$ s zu belegen, wurden beide Isoformen des THR $\alpha$ s zunächst mittels RNA-Interferenz *g silenced*. Anschließend wurden die Zellen mit TETRAC (4), T4 (1) oder Pioglitazon (7) behandelt und die Expression der PPAR $\gamma$ -Zielgene Adiponektin, ANGPTL4, CK20 und CD36 auf mRNA- und CD36 auf Protein-Ebene quantifiziert. Für alle Zielgene konnte eine dosis-abhängige Induktion der Expression nachgewiesen werden.

Nachdem die biologische/zelluläre Relevanz der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ /RXR-Interaktion *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollte die potenzielle physiologische Bedeutung dieser Beobachtungen evaluiert werden. Dazu wurde die Bildung von TETRAC (4) nach Inkubation von Hepatozyten (HepG2-Zellen) mit T4 (1) mittels LC-MS/MS quantifiziert. Es konnte festgestellt werden, dass in den Hepatozyten innerhalb von 24 Stunden ausreichend TETRAC (4) gebildet werden kann, um Konzentrationen für eine relevante PPAR $\gamma$ -Aktivierung zu erzielen.

Um dies auch *in vivo* zu verifizieren, wurde zusätzlich ein Pilot-Tierversuch mit Mäusen durchgeführt. Dabei erhielten C57BL6/JRj Mäuse eine orale Dosis (3 mg/kg) des T4-Derivates Br-T4 (92). Dieses synthetische T4-Analogon wurde eingesetzt um Interferenzen mit der endogenen Thyroidhormon-Synthese zu vermeiden. Darüber hinaus zeigte Br-T4 (92) im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay praktisch keine Aktivität mehr an PPAR $\gamma$ , während der Metabolit von Br-T4 (92), Br-TETRAC (93), aber nahezu die gleiche Aktivität wie sein endogenes Analogon TETRAC (4) zeigte. Eine, acht und 24 Stunden nach der Applikation von Br-T4 (92) wurde anschließend die Expression PPAR $\gamma$ -regulierter Gene in den Lebern der Mäuse untersucht. Da Br-T4 (92) nur eine sehr niedrige Aktivität an PPAR $\gamma$  aufweist, musste eine Metabolisierung zu Br-TETRAC (93) stattfinden, um die Expression PPAR $\gamma$ -regulierter Gene zu induzieren. Die Quantifizierung der Zielgene ergab, dass es nach 24 Stunden zu einer starken Erhöhung der relativen mRNA Expression kam. Da im *in vitro*-Experiment ebenfalls festgestellt werden konnte, dass nach 24 Stunden wahrscheinlich ausreichend TETRAC (4) gebildet wird, um PPAR $\gamma$  zu aktivieren, kann angenommen werden, dass das Br-T4 (92) zu Br-TETRAC (93) metabolisiert wurde und anschließend die PPAR $\gamma$ -Zielgen-Expression induzierte. Eine exakte Quantifizierung der *in vivo* entstandenen Br-TETRAC-Spiegel war durch Matrix-Effekte der Hepatozyten, die die Quantifizierung beeinträchtigten, nicht möglich und bedarf weiterer Experimente.

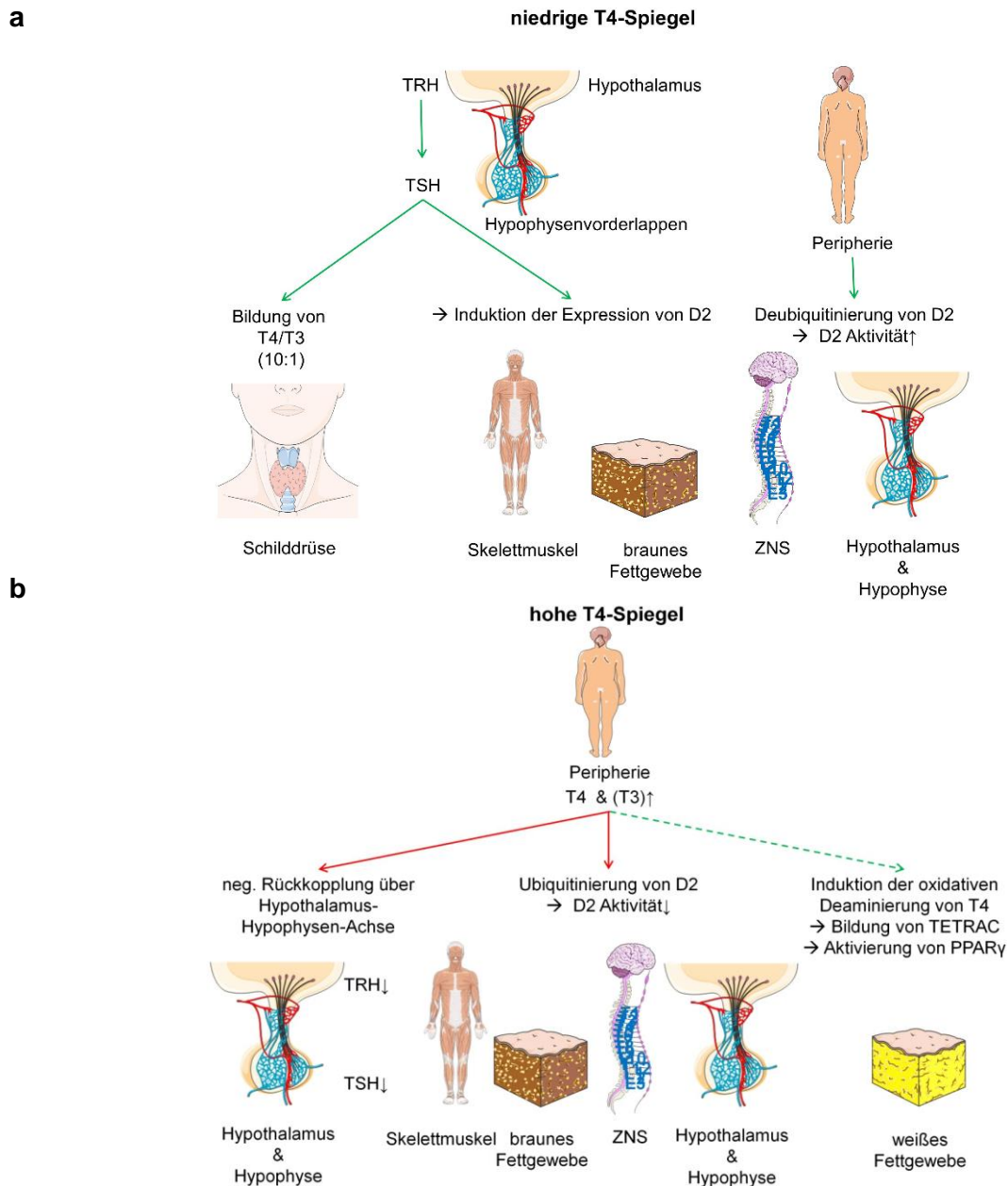
Trotz der in dieser Arbeit erbrachten Indizien für eine physiologische Rolle der Interaktion von TETRAC (4) mit PPAR $\gamma$  und RXR, muss eine weitergehende Untersuchung der tatsächlichen endogenen TETRAC-Spiegel im Menschen erfolgen um die Relevanz der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Interaktion eindeutiger zu beleuchten. Dabei sollte vor allem die Untersuchung von Kompartimenten, wie dem weißen Fettgewebe, in denen PPAR $\gamma$  vorwiegend exprimiert wird<sup>236–238</sup>, im Vordergrund stehen. Außerdem wird TETRAC (4) vermutlich intrazellulär in Mitochondrien, Lysosomen<sup>616,657</sup> und in Endothelzellen<sup>653,654</sup> gebildet, da dort die entsprechenden Enzyme exprimiert werden, die wahrscheinlich für eine Bildung von TETRAC (4) verantwortlich sind. Deshalb sollte auch die intrazelluläre Konzentration der TETRAC-Spiegel bestimmt werden. T3 (2) wird ebenfalls erst intrazellulär durch Deiodierung in relevanten Konzentrationen gebildet, um die THRs zu aktivieren

(Serumkonzentration ~ 1,3 – 2,1 nM<sup>579,594,595</sup>; EC<sub>50</sub>(THR $\alpha$ ) = 0,5 – 3,4 nM<sup>150–153</sup>; EC<sub>50</sub>(THR $\beta$ ) = 1,2 – 6,2 nM<sup>150–153</sup>). Die Aussagekraft von Serum- und Plasmaspiegeln von Thyroidhormonen ist daher wahrscheinlich nicht repräsentativ, um eine endogene Relevanz abzuschätzen.

Eine endogene PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Thyroidhormone könnte eine zusätzliche Rolle im komplexen endokrinen System der Thyroidhormone spielen. Während die THR $s$  beim erwachsenen Menschen katabole Stoffwechselprozesse fördern<sup>12,85</sup>, kommt es bei einer Aktivierung von PPAR $\gamma$  zu nahezu gegenteiligen Effekten<sup>241,248,251,252</sup>. Dabei werden die THR-vermittelten Signalwege vor allem durch Bindung des ersten Deiodierungs-Produktes T3 (**2**) induziert. Es kommt unter anderem zu einem erhöhten Grundumsatz, zur Generierung von Glucose, zur Lipolyse und Thermogenese<sup>12,85</sup>. TETRAC (**4**), das durch oxidative Deaminierung, ebenfalls ausgehend von T4 (**1**), entsteht, könnte durch eine endogene PPAR $\gamma$ -Aktivierung für adipogene Effekte, durch die Induktion der Adipocyten-Differenzierung und der Lipogenese, sorgen. Außerdem wird nach PPAR $\gamma$ -Aktivierung die Glucose-Aufnahme in die Zellen gefördert und die Insulinsensitivität verbessert<sup>241,248,251,252</sup>. Zudem treten in Folge einer PPAR $\gamma$ -Aktivierung antiatherogene<sup>364</sup> und antiinflammatorische Effekte<sup>282–285</sup> auf.

Welcher Signalweg letztendlich aktiviert wird, könnte von der entsprechenden Enzym-Ausstattung des jeweiligen Kompartiments in dem T4 (**1**) akkumuliert und der Expression der THR $s$  und PPAR $\gamma$  in diesem Kompartiment abhängen.

In Skelettmuskeln, im braunen Fettgewebe, sowie im ZNS, in der Hypophyse und dem Hypothalamus wird vorwiegend der THR und auch die Deiodase D2, die hauptsächlich für die Bildung von T3 (**2**) verantwortlich ist, exprimiert. PPAR $\gamma$  und Enzyme, die an der oxidativen Deaminierung von T4 (**1**) beteiligt sind, spielen im weißen Fettgewebe eine Rolle. Je nachdem in welchem Kompartiment T4 (**1**) akkumuliert, könnten daher unterschiedliche Signalwege induziert werden. Vor allem im Bezug auf die Synthese von TETRAC (**4**) und die tatsächlich beteiligten Enzyme gibt es jedoch noch viele Unklarheiten, die eine weitergehende Untersuchung erfordern.



**Abbildung 60: (a) Bei niedrigen T4-Spiegeln im Blut wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse eine Bildung von TRH, TSH und letztendlich T4 (1) eingeleitet<sup>602</sup>. Neben einigen Rückkopplungsschleifen besteht die Möglichkeit der Induktion der T3-Synthese durch die Regulation der Deiodase-Aktivität und Expression. Zum einen kann durch TSH die Expression von D2, dem Enzym das hauptsächlich für die T3-Bildung verantwortlich ist, direkt induziert werden<sup>612</sup>. Zum anderen kann es auch zu einer peripheren Aktivierung von D2 durch eine Deubiquitinierung des Enzyms kommen<sup>620,621</sup>. (b) Bei hohen T4-Spiegeln hingegen kommt es zu einer negativen Rückkopplung, bei der die TSH- und TRH-Synthese und Ausschüttung inhibiert werden kann<sup>602,603</sup>. Durch Ubiquitinierung kann die D2-Aktivität zudem gehemmt werden<sup>620,621</sup>. Zusätzlich zu diesen bekannten Regulationsmechanismen könnten Enzyme, die für die Synthese von TETRAC (4) verantwortlich sind, vermehrt exprimiert werden. So könnte der katabolen THR-Aktivität durch Aktivierung der anabolen PPAR $\gamma$ -Signalwege entgegengewirkt werden.**

Die Kompartiment-spezifische Aktivierung der THR $\alpha$ s und PPAR $\gamma$  könnte eine Rolle bei der Homöostase spielen und eine Art zusätzlichen Rückkopplungs-Mechanismus darstellen. Thyroidhormon-Spiegel werden normalerweise direkt über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse reguliert<sup>602</sup>. Jedoch kann auch die Expression und Aktivität von D2, dem Enzym, das für die T3-Synthese verantwortlich ist, reguliert werden<sup>602,603,612,620,621</sup>. Da die Beeinflussung von Enzym-Systemen offenbar bei der Rückkopplung eine Rolle spielt, könnte auch die Induktion von Enzymen, die für die Synthese von TETRAC (4) verantwortlich sind, von Bedeutung sein. Durch die Bildung von TETRAC (4) und damit einer Aktivierung von PPAR $\gamma$  könnte der katabolen THR-Aktivität entgegengewirkt werden. Zur Prüfung dieser Hypothese bedarf es jedoch noch einiger Untersuchungen. Beispielsweise könnten die TETRAC-Spiegel in Kompartimenten, in denen PPAR $\gamma$  exprimiert wird, wie z.B. dem weißen Fettgewebe, bei hyperthyreoten und euthyreoten Probanden miteinander verglichen werden. Sollte die Hypothese stimmen, müsste bei hyperthyreoten Probanden auf Grund ihrer erhöhten T4-Spiegel die Bildung von TETRAC (4) induziert werden. Neben dieser physiologischen Funktion, könnte die Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Aktivierung aber auch eine pharmakologische Bedeutung haben. Vor allem die PPAR $\gamma$ -induzierte Verbesserung der Insulin-Sensitivität, führte in der Vergangenheit zur Arzneimittel-Entwicklungen von PPAR $\gamma$ -Agonisten. Die bekanntesten PPAR $\gamma$ -Agonisten gehören zu der Substanzklasse der Glitazone, die Verwendung als orale Antidiabetika fanden<sup>210,211</sup>. Die Nutzung der Glitazone ist jedoch mittlerweile stark eingeschränkt<sup>350,353-355</sup>. Dennoch stehen die Glitazone seit 2001 wieder im Fokus der Arzneimittel-Entwicklung<sup>743</sup>. In klinischen Studien wird derzeit insbesondere die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Glitazonen bei der Behandlung der NAFLD und NASH untersucht<sup>53</sup>. Da die Aktivierung von PPAR $\gamma$  ein breites Nebenwirkungsprofil aufweist<sup>53,350,353-355</sup>, könnten partial-agonistische PPAR $\gamma$ -Modulatoren, die zu den sog. SPPARMs gehören, zukünftig eine Rolle spielen. TETRAC (4) könnte als endogener Partialagonist mit neuartigem Bindemodus zur Entwicklung von PPAR $\gamma$ -Modulatoren dienen. TRIAC (3) könnte eine Leitstruktur für eine neue Substanzklasse mit dualem Wirkmechanismus darstellen. Durch die selektive agonistische Potenz an PPAR $\gamma$  und THR $\beta$  könnten die insulinresistenten, antiatherogenen und antiinflammatorischen Effekte von PPAR $\gamma$ <sup>282-285,364</sup> mit den lipolytischen Effekten des THR $\beta$ <sup>182,183</sup> kombiniert werden und so zu einem Arzneistoff mit verbessertem Nebenwirkungsprofil führen. Bisher ist der Einsatz von Thyroidhormonen und Thyroidhormon-Analoga weitestgehend auf die Behandlung der Hypothyreose limitiert. Jedoch könnte sich dies durch die Entdeckung der Aktivität von Thyroidhormonen an PPAR $\gamma$  und dessen Heterodimer-Partner RXR zukünftig ändern.

Insgesamt könnte die Entdeckung der Aktivität von Thyroidhormonen an PPAR $\gamma$  und RXR sowohl eine physiologische als auch pharmakologische Rolle spielen und ein weiterer Baustein im komplexen System der Thyroidhormone sein.

## 4. Experimenteller Teil

Die Charakterisierung der Interaktion von Thyroidhormonen mit verschiedenen nukleären Rezeptoren erfolgte mit biochemischen, biophysikalischen und *in vitro*-, sowie *in vivo*-pharmakologischen Experimenten.

### 4.1 Allgemein

3,5-Diiodthyronin (3,5-T<sub>2</sub>, **11**), 3,3',5-Triiod-L-thyronin Natriumsalz (T<sub>3</sub>, **2**), 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin (T<sub>4</sub>, **1**), 3,3',5-Triiodthyoacetat (TRIAC, **3**) und 3,3',5,5'-Tetraiodthyoacetat (TETRAC, **4**) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) bezogen. Das 3,3',5'-Triiod-L-thyronin (reverses T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>, **10**) wurde bei Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) erworben.

### 4.2 Gal4-Luciferase-Reportergen Assay

Bei der Durchführung des Assays wurden jeweils drei Plasmide transfiziert, darunter ein Gal4-Rezeptor-Fusionsplasmid, ein *Firefly*-Luciferase-Plasmid und ein Renilla-Plasmid. Alle Gal4-Rezeptor-Fusionsplasmide besaßen einen CMV-Promotor, der konstitutiv aktiviert wurde. Folgende auf pFA-CMV (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) basierende Gal4-Fusionskonstrukte, die für die entsprechende *hinge*-Region und die LBD des jeweiligen human nukleären Rezeptors fusioniert mit der DBD von Gal4 codierten, wurden verwendet:

pFA-CMV-hPPAR $\alpha$ -LBD<sup>744</sup>, pFA-CMV-hPPAR $\gamma$ -LBD<sup>744</sup>, pFA-CMV-hPPAR $\delta$ -LBD<sup>744</sup>, pFA-CMV-hLXR $\alpha$ -LBD<sup>745</sup>, pFA-CMV-hLXR $\beta$ -LBD<sup>745</sup>, pFA-CMV-hRXR $\alpha$ -LBD<sup>746</sup>, pFA-CMV-hRXR $\beta$ -LBD<sup>746</sup>, pFA-CMV-hRXR $\gamma$ -LBD<sup>746</sup>, pFA-CMV-hRAR $\alpha$ -LBD<sup>746</sup>, pFA-CMV-hRAR $\beta$ -LBD<sup>746</sup>, pFA-CMV-hRAR $\gamma$ -LBD<sup>746</sup>, pFA-CMV-hFXR-LBD<sup>747</sup>, pFA-CMV-hVDR-LBD<sup>746</sup> und pFA-CMV-hCAR-LBD<sup>746</sup>

Als Reportergen wurde pFR-Luc (Stratagene) verwendet und zur Normalisierung der Transfektions-Effizienz, sowie der Zellzahl, wurde pRL-SV40 (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) hinzugegeben. In der Promotor-Region des *Firefly*-Luciferase-Plasmids (pFR-Luc) befand sich ein nicht-humanes Gal4-Response Element, das nach Ligandenbindung des Gal4-Rezeptor-Fusionsproteins durch die Gal4-DBD gebunden werden konnte. Das Renilla-Plasmid (pRL-SV40) besaß einen Simian-Virus (SV)-40 Promotor, der konstitutiv exprimiert wurde.

Durchführung des Assays:

HEK293T Zellen wurden in einem Medium bestehend aus DMEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit hohem Glucose-Anteil, 10% fetalem Kälberserum (*fetal calf*



serum, FCS, Capricorn, Ebsdorfergrund, Deutschland), Natriumpyruvat (1mM, Gibco, Life Technologies), Penicillin (100 U/mL, Gibco, Life Technologies) und Streptomycin (100 µg/mL, Gibco, Life Technologies) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Vor der transienten Transfektion wurden die Zellen in 96-well-Platten (3·10<sup>4</sup> Zellen/well) ausgesät. 24 Stunden später wurde das Medium gewechselt und ein Medium mit reduzierter Menge an Zusätzen verwendet (Minimal-Medium, Opti-MEM ohne weitere Zusätze, Gibco, Life Technologies). Danach wurden die Zellen mit den drei Plasmiden, darunter das Gal4-Fusionsplasmid des entsprechenden Rezeptors, das Reporter-gen-Plasmid der *Firefly*-Luciferase (pFR-Luc) und das Renilla-Plasmid (pRL-SV40), durch Lipofektion transfiziert. Dabei wurde das Lipofectamine LTX Reagenz (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit der entsprechenden Testsubstanz inkubiert. Die Testsubstanz wurde dabei in Opti-MEM, das zusätzlich Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL), sowie 0,1% DMSO enthielt, gelöst. Als Negativ-Kontrolle wurde das gleiche Medium mit 0,1% DMSO ohne Zusatz einer Testsubstanz verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde jeweils ein bekannter Agonist (siehe unten) des entsprechenden Rezeptors eingesetzt. Jeder Messpunkt wurde in Duplikaten bestimmt und alle Messungen wurden mindestens dreimal unabhängig durchgeführt. 14-16 Stunden nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und zunächst ein *Firefly*-Luciferase-Substrat (Luciferin) hinzugesetzt. Die Luciferase setzte Luciferin zu Oxyluciferin um und es kam zu einem Lumineszenz-Signal, das gemessen werden konnte. Für die Normalisierung der Daten wurde nach Lyse und Messung der Lumineszenz nach Luciferin-Zugabe ein *Firefly*-Luciferase-Inhibitor und ein Renilla-Luciferase-Substrat (Coelenterazin) hinzugefügt und ebenfalls ein Lumineszenz-Signal gemessen. Beide Substrate, der *Firefly*-Luciferase-Inhibitor und ein Lyse-Puffer waren im Dual-Glo™ Luciferase Assay System Kit (Promega) enthalten. Die Messung der jeweiligen Lumineszenz wurde an einem Spark® *multimode microplate reader* (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 25°C, jeweils 10-60 Minuten nach Zugabe des jeweiligen Substrats durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte, indem der entsprechende Lumineszenz-Wert nach Zugabe des *Firefly*-Luciferase-Substrats durch den Wert nach Zugabe des Renilla-Luciferase-Substrats dividiert wurde und dieser Wert mit 1000 multipliziert wurde. Das entsprechende Ergebnis wurde als RLU angegeben. Die verschiedenen Datensätze ließen sich entweder als *fold*-Aktivierung vergleichen oder als relative Aktivierungen. Bei der Auswertung als *fold* Aktivierung setzte man die RLU-Werte der Testsubstanz mit der Negativ-Kontrolle ins Verhältnis. Eine relative Aktivierung erhielt man, indem die *fold*-Aktivierung der Testsubstanz mit der *fold*-Aktivierung der entsprechenden Referenzsubstanz (Positiv-Kontrolle) ins

Verhältnis gesetzt wurde. Die Auswertungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2016 durchgeführt.

Folgende Referenzsubstanzen wurden verwendet (jeweils in der Konzentration 1  $\mu\text{M}$ ):

PPAR $\alpha$ : GW7647; PPAR $\gamma$ : Pioglitazon (**7**); PPAR $\delta$ : L165,041; LXR $\alpha/\beta$ : T0901317; RXR $\alpha/\beta/\gamma$ : Bexaroten (**8**); RAR $\alpha/\beta/\gamma$ : Tretinoin; FXR: GW4064; VDR: Calcitriol; CAR: CITCO

Die Messwerte verschiedener Konzentrationen einer Testsubstanz ergaben eine sigmoidale Aktivitätskurve, die mit Hilfe einer nicht-linearen Regression die Berechnung des EC<sub>50</sub>-Wertes ermöglicht. Die Kurven wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot 12.5 erstellt. Dabei wurde ein *four parameter logistic curve fit* verwendet. Bei der Darstellung mehrerer Kurven in einem Graph wurde die Software OriginPro 2017G genutzt und ein *DoseResp*-fit durchgeführt.

Kontrollexperiment: Um auszuschließen, dass Störsignale, die unabhängig vom entsprechenden Rezeptor-Plasmid auftraten, für die gemessene Lumineszenz verantwortlich waren, wurde eine Transfektion ohne Gal4-Fusionsplasmid durchgeführt. Der restliche Versuchsaufbau entsprach der erläuterten Methode.

Kontrollexperiment PPAR $\gamma$ : Zusätzlich wurde die PPAR $\gamma$ -Aktivierung verifiziert, indem der irreversible PPAR $\gamma$  Antagonist GW9662 (**24**, Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA) in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , bei der Inkubation hinzugefügt wurde.

### 4.3 ITC

Die isothermale Titrationskalorimetrie wurde an einem *TA Instruments Affinity ITC* (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA) durchgeführt. Dabei wurde das rekombinante PPAR $\gamma$ -LBD-Protein (75-240  $\mu\text{M}$ ) bzw. RXR $\alpha$ -LBD-Protein (45-100  $\mu\text{M}$ ) zum entsprechenden Thyroidhormon invers titriert. Die ITC-Messungen wurden jeweils zweimal durchgeführt

Folgende Konzentration und Injektionsanzahl wurden jeweils pro Titration für das entsprechende Rezeptor-Protein und das Thyroidhormon gewählt:

T4 (**1**): 30  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 240  $\mu\text{M}$ , 20 Injektionen) & 45  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 220  $\mu\text{M}$ , 20 Injektionen) & 8  $\mu\text{M}$  (RXR $\alpha$ : 45  $\mu\text{M}$ , 22 Injektionen) & 8  $\mu\text{M}$  (RXR $\alpha$ : 45  $\mu\text{M}$ , 22 Injektionen)

T3 (**2**): 70  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 230  $\mu\text{M}$ , 29 Injektionen) & 72  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 230  $\mu\text{M}$ , 29 Injektionen)

rT3 (**10**): 44  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 180  $\mu\text{M}$ , 22 Injektionen) & 50  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 220  $\mu\text{M}$ , 22 Injektionen)

TETRAC (**4**): 13  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 80  $\mu\text{M}$ , 22 Injektionen) & 13  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 80  $\mu\text{M}$ , 22 Injektionen) & 10  $\mu\text{M}$  (RXR $\alpha$ : 100  $\mu\text{M}$ , 19 Injektionen) & 10  $\mu\text{M}$  (RXR $\alpha$ : 100  $\mu\text{M}$ , 19 Injektionen)

TRIAC (3): 13  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 75  $\mu\text{M}$ , 31 Injektionen) & 13  $\mu\text{M}$  (PPAR $\gamma$ : 75  $\mu\text{M}$ , 31 Injektionen) & 10  $\mu\text{M}$  (RXR $\alpha$ : 90  $\mu\text{M}$ , 19 Injektionen) & 10  $\mu\text{M}$  (RXR $\alpha$ : 90  $\mu\text{M}$ , 19 Injektionen)

Sowohl Protein als auch das Thyroidhormon wurden in einem HEPES-Puffer (250 mM; pH 7,5 eingestellt mit KOH; zudem enthalten: 150 mM KF, 10% Glycerol (m/V), 1% DMSO (V/V) und 5 mM DTT) gelöst. Die Titration fand bei einer konstanten Temperatur von 25°C und einer Rührgeschwindigkeit von 75 rpm statt. 172  $\mu\text{L}$  der Thyroidhormon-Lösung wurden in die Zelle des Kalorimeters gefüllt und die PPAR $\gamma$ -LBD- bzw. RXR $\alpha$ -LBD-Protein-Lösung wurde invers hinzutitriert. Die erste Injektion hatte ein verringertes Volumen von 1  $\mu\text{L}$ . Alle nachfolgenden Injektionen hatten ein Volumen von 2,5  $\mu\text{L}$ . Zwischen den Injektionen lag ein Intervall von 300 Sekunden. Eine Blindtitration, bei der das Rezeptor-Protein zur Puffer-Lösung titriert wurde, wurde durchgeführt. Die entsprechende Wärmeenergie, die bei der Blindtitration entstanden ist, wurde von der Wärmeenergie, die bei Titration von Rezeptor-Protein und Testsubstanz-Lösung entstand, subtrahiert.

Die ITC Daten wurden mit Hilfe des *NanoAnalyze software package* (Version 3.7.5) analysiert. Die Reaktionsenthalpie ( $\Delta H$ ), die Bindungs-Affinitäts-Konstante ( $K_d$ ) und das stöchiometrische Verhältnis der Bindung ( $n$ ) konnten durch die Integration der Wärmesignale ermittelt werden. Die freie Enthalpie (Gibbs-Energie,  $\Delta G$ ) wurde durch die Gleichung  $\Delta G = -RT \ln K$  berechnet und die Entropie ( $\Delta S$ ) wurde mittels der Gleichung  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  bestimmt.

#### 4.4 Coaktivator-Rekrutierungs-Assay

➤ Alle HT-FRET-Assays wurden von Dr. Jan Heering und Whitney Kilu durchgeführt.

##### 4.4.1 PPAR $\gamma$ Coaktivator-Rekrutierungs-Assay

Der PPAR $\gamma$  Coaktivator-Rekrutierungs-Assay ist ein zellfreier Bindungs-Assay. Sowohl das PPAR $\gamma$ -LBD-Protein als auch der Coaktivator waren *gelabelt*. Das PPAR $\gamma$ -LBD-Protein war am N-terminalen Ende an ein *green fluorescent protein* (GFP) gebunden, das als FRET-Akzeptor diente. Als FRET-Donor wurde ein Terbium-Kryptat *gelabeltes* Streptavidin Konjugat verwendet (Cisbio, Codolet, Frankreich). Die Coaktivatoren SRC-1 [biotin-CPSSHSSLTERHKILHRLQLQEGSPS] und CBP [biotin-NLVPDAASKHKQLSELLRGGSGS] enthielten die für Coaktivatoren charakteristische LxxLL Sequenz und waren am N-terminalen Ende an Biotin (Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland) gebunden. Das Biotin vermittelte die Bindung mit dem Terbium-*gelabelten* Streptavidin und ermöglichte, dass die Coaktivatoren mit dem FRET-Donor markiert werden konnten.

Durchführung:

Eine 12 nM Lösung des rekombinanten PPAR $\gamma$ -LBD-Proteins und eine 12 nM Lösung des *gelabelten* Coaktivators, die zusätzlich die Testsubstanz in einer entsprechenden Konzentration enthielt, wurden in einem HEPES-Puffer (25 mM; pH 7,5 eingestellt mit KOH; zudem enthalten: 150 mM KF, 5% Glycerol (m/V), 1% DMSO (V/V), 0,1% (m/V) CHAPS und 5 mM DTT) hergestellt. Beide Lösungen wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur gemischt. Danach wurde die Fluoreszenz-Intensität (FI) nach Anregung mit einer Wellenlänge von 340 nm bei den für Akzeptor und Donor charakteristischen Wellenlängen gemessen (Akzeptor: 520 nm und Donor: 620 nm). Der Assay wurde im 384 well Format durchgeführt. Die Messung erfolgte an einem Tecan Infinite F200 (Tecan Deutschland GmbH). Als Negativ-Kontrolle wurde ein Experiment ohne Zugabe der Testsubstanz durchgeführt und als Positiv-Kontrolle wurde Rosiglitazon (**23**) in einer Konzentration von 1  $\mu$ M ( $>EC_{80}$ (PPAR $\gamma$ )) eingesetzt.

Da FRET-Akzeptor (PPAR $\gamma$ -LBD-Protein) und –Donor (Coaktivator) sich in enger Nachbarschaft befanden, kam es zum Energie-Transfer von Donor zu Akzeptor. Diese Energieübertragung konnte gemessen werden, da die FI des Akzeptors erhöht wurde und die FI des Donors verringert. Zur Auswertung des Experiments wurde die Intensität der Fluoreszenz-Emission des Akzeptors mit der des Donors ins Verhältnis gesetzt und der Wert mit 10.000 multipliziert ((FI<sub>520</sub>/FI<sub>620</sub>)·10000). Je größer der Wert, desto stärker ausgeprägt war die Liganden-induzierte Rekrutierung eines Coaktivators.

Validiert wurde der HT-FRET-Assay mit verschiedenen Rosiglitazon (**23**) Konzentrationen. Die Messungen erfolgten zum einen im agonistischen Modus, bei der ein ungebundenes PPAR $\gamma$ -LBD-Protein als FRET-Akzeptor verwendet wurde und zusätzlich der Coaktivator SRC-1 oder CBP als FRET-Donor, sowie die entsprechende Testsubstanz hinzugefügt wurde. Das FRET-Signal wurde durch die Messung der FI des Akzeptors und Donors evaluiert. Zum anderen wurde eine Messung im antagonistischen Modus durchgeführt, bei der Rosiglitazon bereits gebunden an das PPAR $\gamma$ -LBD-Protein vorlag und es bereits zu einer Coaktivator-Rekrutierung von SRC-1 oder CBP kam. Anschließend wurde die Testsubstanz hinzugegeben und die Verdrängung von Rosiglitazon (**23**) aus der Bindungstasche bestimmt. Insgesamt wurden 4 Experimente mit den Testsubstanzen TETRAC (**4**) und TRIAC (**3**) durchgeführt. Zwei Messungen erfolgten im agonistischen Modus, jeweils mit den Coaktivatoren SRC-1 und CBP. Analog dazu wurden auch zwei Messungen im antagonistischen Modus durchgeführt, bei denen Rosiglitazon (**23**) aus der Bindungstasche verdrängt wurde.

Die Daten wurden zunächst mit Microsoft Excel 2016 ausgewertet. Dabei wurde jeweils pro Konzentration ein Mittelwert und eine Standardabweichung für das entsprechende FRET-

Signal berechnet. Die Konzentrationen der Testsubstanz wurden gegen das FRET-Signal aufgetragen und daraus ein  $EC_{50}$ -Wert bestimmt. Die Kurven wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot 12.5 erstellt. Dabei wurde ein *four parameter logistic curve fit* verwendet. Bei der Darstellung mehrerer Kurven in einem Graph wurde die Software OriginPro 2017G genutzt und ein *DoseResp*-fit durchgeführt.

#### 4.4.2 RXR $\alpha$ Coaktivator-Rekrutierungs-Assay

Der gleiche Assay wurde analog auch mit einem RXR $\alpha$ -LBD-Protein durchgeführt. Dabei wurde eine 100 nM Lösung des GFP-markierten RXR $\alpha$ -LBD-Proteins verwendet. Als Coaktivator wurde Terbium-markiertes SRC-1 verwendet und als Positiv-Kontrolle (Konzentration 1  $\mu$ M) und zur Validierung des Assays diente der RXR $\alpha$  Agonist SR11237.

#### 4.4.3 PPAR $\gamma$ /tRXR $\alpha$ Coaktivator-Rekrutierungs-Assay

Außerdem wurde die Liganden-abhängige Rekrutierung des Coaktivators CBP zur PPAR $\gamma$  LBD im PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimer evaluiert. Dabei wurde eine 100 nM Lösung des PPAR $\gamma$ -LBD-Proteins ohne GFP-Marker mit einer 2  $\mu$ M Lösung des GFP-markierten RXR $\alpha$ -LBD-Proteins gemischt. Beide Rezeptor-Monomere dimerisierten (Dimerisierung  $\geq 95\%$ ). Da das PPAR $\gamma$ -Monomer nicht *gelabelt* war und ein mutiertes RXR-Monomer eingesetzt wurde (tRXR), das durch eine mutierte Coaktivator Bindungsstelle nicht in der Lage war Coaktivatoren zu rekrutieren, war ein FRET-Signal nur messbar, wenn durch die Liganden-Bindung an das Heterodimer CBP rekrutiert wurde. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass sich das FRET-Signal der Monomer- und Dimer-abhängigen Rekrutierung von CBP überlagerten.

#### 4.5 Kristallstrukturanalyse

- Die Kristallstruktur von TETRAC (**4**) in der PPAR $\gamma$ -LBD wurde von Dr. Apirat Chaikuad analysiert.

Proteinaufreinigung: Die PPAR $\gamma$  LBD (Aminosäure-Sequenz 203-477) wurde in den Vektor pNIC28-Bsa4 subkloniert und das entsprechende rekombinante Protein, das am N-terminalen Ende durch ein Polyhistidin-Tag (His<sub>6</sub> tag) markiert war, wurde in *Escherichia coli* exprimiert und mit Hilfe eines *Terrific Broth* (TB)-Mediums kultiviert. Die Expression wurde durch eine 0,5 mmolare Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)-Lösung bei 18°C über Nacht induziert. Das Protein wurde anschließend mittels Nickel-Affinitätschromatographie, das zur Aufreinigung von Proteinen mit Polyhistidin-Tag geeignet ist, isoliert. Mit Hilfe der *tobacco etch virus* (TEV) Protease wurde der N-terminale His<sub>6</sub> tag entfernt. Durch reverse

Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschluss-Chromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) wurde das Protein zusätzlich aufgereinigt.

Kristallisation: Das Protein (12 mg/mL) wurde anschließend in einem 20 mM Tris-Puffer (pH 8), der 200 mM NaCl und 0,5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) enthielt, gelöst und mit 2 mM TETRAC (**4**) versetzt. Die Kristallisation wurde mittels Dampfdiffusions-Methode (*Vapour Diffusion*) bei 20°C durchgeführt. Dabei wurde ein „sitzender Tropfen“ (*sitting drop*) des Protein-TETRAC-Gemisches auf eine Erhöhung eines *well*s gegeben, welches gefüllt war mit einer TETRAC-Reagenzienlösung (enthielt zudem 33% PEG 3350 und 0,15 M Natriumcitrat). Das *well* wurde anschließend abgedichtet. Durch Dampfdiffusion wurde der Konzentrationsgradient zwischen Proben-Tropfen und Reagenzienlösung ausgeglichen, wodurch der Kristallisations-Prozess induziert wurde.

Der Bindungsmodus wurde anschließend durch Röntgen-Diffraktion, am *Synchrotron Swiss Light Source*, mit der Röntgen-Strahllinie X06SA, analysiert. Die Daten wurden mit dem Programmen XDS<sup>748</sup> und aimless<sup>749</sup> bearbeitet und skaliert. Mit Hilfe von vorhandenen publizierten Datensätzen<sup>305</sup>, sowie der Software Phaser<sup>750</sup>, die mittels „*Molecular Replacement*“ die Daten analysiert, wurde die Struktur des Proteins aufgelöst. Zudem wurden mit den Software-Programmen COOT<sup>751</sup> und REFMAC<sup>752</sup> iterative Zyklen eines sog. *manual model rebuilding* alternierend mit *refinement*-Prozessen durchgeführt.

#### 4.6 Adipocyten-Differenzierung

- Die Experimente zur Adipocyten-Differenzierung wurden in Zusammenarbeit mit Tamara Goebel und Dr. Astrid Kahnt durchgeführt. Die Oil Red O Färbung wurde von Tamara Goebel und Dr. Astrid Kahnt ausgeführt und die qPCR-Quantifizierung wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz von Dr. Pascal Heitel und PD Dr. Daniel Merk durchgeführt.

Murine 3T3-L1 Zellen wurden in einem Medium bestehend aus DMEM mit hohem Glucose-Anteil, 10% FCS, Natriumpyruvat (1mM), Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Adipocyten-Differenzierung erfolgte innerhalb von 14 Tagen nach Anweisungen der Methode nach Zebisch<sup>714</sup>. Die Zellen wurden in 6-*well*-Platten ausgesät ( $2,5 \cdot 10^6$ /*well*) und die Differenzierung wurde an Tag drei durch die Zugabe von 1 µg/mL Insulin, 0,25 µM Dexamethason und 0,5 mM Isobutylmethylxanthin, sowie der entsprechenden Testsubstanz (Rosiglitazon (**23**), TETRAC (**4**)) induziert. Alle Bestandteile wurden dabei im gleichen Medium, das zur Kultivierung der Zellen genutzt wurde, gelöst. An Tag fünf wurde das Medium gewechselt und eine Lösung, die nur Insulin und Medium enthielt zugesetzt. An Tag sieben wurde das Medium erneut ausgetauscht. Es wurde nur das Kultivierungs-Medium

ohne Zusätze hinzugegeben. Bis Tag 15 konnten die Lipidtropfen akkumulieren, danach wurde die Differenzierung mit Hilfe einer sog. *Oil Red O* Färbung evaluiert. Dabei wurden die Zellen zunächst zweimal mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS, Gibco, Life Technologies) gewaschen und dann für 60 Minuten mit einer 4%igen Formaldehyd-Lösung, gelöst in PBS, fixiert. Die Zellen wurden anschließend erneut mit PBS und danach mit 60%igem Isopropanol gewaschen. Anschließend wurden die Platten getrocknet und mit einer 0,3%igen Farbstoff-Lösung mit *Oil Red O* (1,5 mL/Platte) für 120 Minuten inkubiert. Die Farbstoff-Lösung wurde entfernt und die Platte mit Milli-Q-Wasser gespült und getrocknet. Dann erfolgte eine visuelle Evaluierung der *Oil Red O* Färbung. Da der Farbstoff in den Adipocyten akkumulieren kann, gab die Intensität der Färbung an, wie stark die Adipocyten-Differenzierung ausgeprägt war.

Das Experiment wurde in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt. Als Positiv-Kontrolle wurde Rosiglitazon (**23**) in einer Konzentration von 2  $\mu$ M verwendet.

Neben der visuellen Evaluierung des Experiments durch die *Oil Red O* Färbung wurde zusätzlich eine Zielgen-Quantifizierung mittels qPCR durchgeführt. Dabei wurden die murinen Adipocyten (3T3-L1 Zellen) analog kultiviert und differenziert. Jedoch wurde statt der Färbung eine Lyse mit TRIzol (Ambion, Life Technologies) und eine mRNA-Isolation, sowie cDNA-Synthese durchgeführt, um anschließend die Expression bestimmter PPAR $\gamma$ -Zielgene, die zur Adipocyten-Differenzierung beitragen, zu quantifizieren. Zur mRNA-Isolation wurde, um Kontamination durch andere DNA zu verhindern, eine DNase (DNase I, RNase-free kit, Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben. Anschließend wurde die mRNA-Konzentration an einem NanoDrop2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die cDNA-Synthese wurde ebenfalls mit einem Kit durchgeführt (*high capacity RNA-to-cDNA kit*, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Die qPCR erfolgte an einem *StepOnePlus real-time* PCR System (Applied Biosystems). Die qPCR wurde mit Hilfe des Farbstoffs *SYBR Green* (*SYBR Green* PCR Master Mix, Life Technologies) durchgeführt. Der Farbstoff interkalierte zwischen doppelstängiger DNA und es kam zu einem Fluoreszenz-Signal. Damit diente der Farbstoff zur Erkennung des PCR-Produktes. Als Referenz-Gen wurde das non-POU *domain containing octamer binding protein* (NonO) verwendet. Alle Proben wurden mindestens dreimal in Duplikaten vermessen. Die Auswertung erfolgte zunächst mit Hilfe der StepOnePlus™ Software v2.3. Die Berechnung der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte wurde mit Microsoft Excel 2016 durchgeführt und anschließend wurden mit Hilfe der Software Graphpad Prism 5.01 Balken-Diagramme erstellt.

Bei der qPCR wurden folgende Primer verwendet:

mAdiponektin: 5'-TGA CGA CAC CAA AAG GGC TC-3' (fwd) und 5'-CAC AAG TTC CCT TGG GTG GA-3' (rev);

mCD36: 5'-TGC TGG AGC TGT TAT TGG TG-3' (fwd) und 5'-CAT GAG AAT GCC TCC AAA CA-3' (rev);

mFABP4: 5'-AGA AGT GGG AGT GGG CTT TG-3' (fwd) und 5'-ACT CTC TGA CCG GAT GGT GA-3' (rev);

mGLUT4: 5'-TGA AGA ACG GAT AGG GAG CAG-3' (fwd) und 5'-GAA GTG CAA AGG GTG AGT GAG-3' (rev);

mLPL: 5'-CCC AGC TTC GTC ATC GAG AG-3' (fwd) und 5'-GTC CAG TGT CAG CCA GAC TT-3' (rev);

mNonO: 5'-TGC TCC TGT GCC ACC TGG TAC TC-3' (fwd) und 5'-CCG GAG CTG GAC GGT TGA ATG C-3' (rev).

#### 4.7 **Knockdown Experimente**

- Die *knockdown* Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Robert Fürst und Dr. Iris Bischoff durchgeführt.

siRNA Transfektion (*knockdown*)<sup>753</sup>: HepG2 Zellen wurden in einem Medium bestehend aus DMEM mit hohem Glucose-Anteil, 10% FCS, Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Um beide THR-Isoformen zu *silencen*, wurden die HepG2 Zellen, sowohl mit THR $\alpha$ -siRNA (ON-TARGETplus Human THRA (7067) siRNA – SMARTpool) als auch mit THR $\beta$ -siRNA (ON-TARGETplus Human THRB (7068) siRNA – SMARTpool) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporese mit einem *Ingenio® electroporation kit* für Lonza-Amaxa® (Mirus Bio Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Als Referenz-Wert wurde jeweils eine Kontrolle mit einer *non-targeting*-siRNA (siGENOME control pool (Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA) transfiziert.

Bei der Transfektion wurden  $1 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen mit 100 µL Nucleofector™-Lösung resuspendiert und jeweils 300 nmol THR $\alpha$ -siRNA und THR $\beta$ -siRNA, bzw. 600 nmol *non-targeting*-siRNA hinzugegeben. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Elektroporators Nucleofector® II/2b (Lonza, Köln, Deutschland). Nach der Transfektion wurden die Zellen in 12-well-Platten verteilt und 24 Stunden später mit der Testsubstanz inkubiert. Die entsprechende Testsubstanz wurde in Opti-MEM, das zusätzlich Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL), sowie 0,1% DMSO enthielt, gelöst. Als Negativ-Kontrolle wurde das gleiche Medium mit 0,1% DMSO ohne Zusatz der Testsubstanz verwendet und als Positiv-Kontrolle wurde Pioglitazon (**7**, Konzentrationen: 0,3 µM; 1 µM; 3 µM und 3 µM mit zusätzlich 10 µM GW9662 (**24**)) zugesetzt.



Folgende Testsubstanzen wurden verwendet:

T4 (**1**, Konzentrationen: 10 µM, 30 µM, 60 µM und 30 µM mit zusätzlich 10µM GW9662 (**24**))

TETRAC (**4**, Konzentrationen: 0,03 µM; 0,1 µM; 0,3 µM; 1 µM und 1 µM mit zusätzlich 10 µM GW9662 (**24**))

#### 4.7.1 Auswertung mittels qPCR

Nach acht Stunden wurden die Zellen mit Hilfe eines β-Mercaptoethanol-RLT-Puffers lysiert. Die mRNA wurde mit einem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Dabei wurde zum Verdau von DNA DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen) hinzugegeben. 1 µg der mRNA wurde mit Hilfe der *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Life Technologies) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine qPCR mit dem Farbstoff *SYBR Green* (*SYBR Green* PCR Master Mix (Life Technologies)) durchgeführt. Die qPCR wurde auf dem StepOnePlus System (Applied Biosystems) durchgeführt. Als Referenz-Gen diente die humane Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH).

Kontrollexperiment: Nicht-transfizierte Zellen wurden analog in 12-*well*-Platten (1·10<sup>6</sup> Zells/*well*) ausgesät und nach 24 Stunden mit jeweils einer Konzentration der Testsubstanz und Positiv-Kontrolle, sowie einer Negativ-Kontrolle inkubiert (Pioglitazon (**7**): 3 µM, T4 (**1**): 30 µM, TETRAC (**4**): 1 µM). Nach acht Stunden wurde mittels qPCR die Zielgen-Expression quantifiziert.

Alle Proben wurden mindestens dreimal in Triplikaten vermessen. Die Auswertung erfolgte zunächst mit Hilfe der StepOnePlus™ Software v2.3. Die Berechnung der 2<sup>-ΔΔCt</sup>-Werte wurde mit Microsoft Excel 2016 durchgeführt und anschließend wurden mit Hilfe der Software Graphpad Prism 5.01 Balken-Diagramme erstellt<sup>754</sup>.

Folgende Primer wurden verwendet:

hAdiponektin: 5'-TGG CTA TGC TCA CAG TCT CAC ATC-3' (fwd) und 5'-CTC TGT GCC TCT GGT TCC ACA A-3' (rev);

hANGPTL4: 5'-ATT CTT TCC AGC GGC TTC TG-3' (fwd) und 5'-GAG GAC TGG AGA CGC GGA G-3' (rev);

hCD36: 5'-GGC TGT GAC CGG AAC TGT G-3' (fwd) und 5'-AGG TCT CCA ACT GGC ATT AGA A-3' (rev);

hCK 20: 5'-ACT GCA AAA TGC TCG GTG TGT CCT-3' (fwd) und 5'-GGC CAT CGA CTT CCT CCT GAT GCT-3' (rev);

hTHRα 5'-TCC CTG AAA ACC AGC ATG TCA-3' (fwd) und 5'-CAC ACA CGA CAC ACT GCT CG-3' (rev);

hTHR $\beta$  5'-GCT GTA TCA CGT GTG AAG GCT-3' (fwd) und 5'-TTC TTA AAG CGA CAT TCC TGG C-3' (rev);

hGAPDH: 5'-ATA TGA TTC CAC CCA TGG CA-3' (fwd) und 5'-GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC-3' (rev).

#### 4.7.2 Auswertung mittels Western Blot Analyse

HepG2 Zellen wurden in 12-*well*-Platten ausgesät ( $1,5 \cdot 10^6$  Zellen /*well*). Die Transfektion mit der entsprechenden siRNA erfolgte wie oben beschrieben. Nach 24 und 48 Stunden wurden die transfizierten Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Testsubstanzen wurden analog in Opti-MEM, das zusätzlich Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100  $\mu$ g/mL), sowie 0,1% DMSO enthielt, gelöst. Als Positiv-Kontrolle wurde Pioglitazon (7, 3  $\mu$ M) verwendet.

Folgende Testsubstanzen wurden verwendet:

T4 (1, 30  $\mu$ M) und TETRAC (4, 1  $\mu$ M).

Nach 8 h wurden die Zellen mit Hilfe eines RIPA Puffers, der *Complete Mini* (Roche, Mannheim, Germany), Natriumfluorid, Phenylmethylsulfonylfluorid und Natriumvanadat enthielt, lysiert. Die Protein-Konzentrationen wurden mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert. Danach wurden die Proteine durch eine Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran mittels *Tank Elektroblothing* (Bio-Rad Laboratories) übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden entweder mit 5%igem fettfreiem Milchpulver oder 5%igem bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS abgesättigt.

Danach folgte die Inkubation mit einem primären Antikörper über Nacht, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper, der an die HRP gekoppelt war. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ECL-Methode, bei der die HRP in einer chemolumineszenten Reaktion Luminol umsetzte und dabei ein Lumineszenz-Signal auftrat. Dabei wurde ein Gemisch aus einem 98,5 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,5), einer 1%igen Luminol-Lösung, einer 0,4%igen p-Coumarinsäure-Lösung, 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und destilliertem Wasser auf die PVDF-Membran gegeben und das resultierende Lumineszenz-Signal anschließend mit einem Röntgen-Entwickler detektiert (Röntgen-Film: Super RX-N, FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland; Entwickler: Agfa CP 1000 *X-ray film processor*, AGFA, Köln, Deutschland). Die densitometrische Analyse der einzelnen Protein-Banden wurde anschließend mit dem Programm ImageJ (Software Version 1.52j.)

durchgeführt. Anschließend wurden mit Hilfe der Software Graphpad Prism 5.01 Balken-Diagramme erstellt<sup>754</sup>.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Primäre Antikörper:

*rabbit monoclonal anti-Thyroid Hormone Receptor alpha antibody* [EPR7862] (Katalog-Nummer: ab179438, Verdünnung: 1:1000) von abcam (Cambridge, UK),

*goat polyclonal anti-Thyroid Hormone Receptor beta antibody* (Katalog-Nummer: ab106813, Verdünnung: 1:500) von abcam,

*rabbit monoclonal anti-CD36 antibody* [EPR6573] (Katalog-Nummer: ab133625, Verdünnung: 1:1000) von abcam

Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierte Sekundär-Antikörper:

*goat anti-rabbit* (Katalog-Nummer: sc-2004, Verdünnung: 1:10'000) von Santa Cruz Biotechnology,

*mouse anti-goat* (Katalog-Nummer: sc-2354, Verdünnung: 1:8000) von Santa Cruz Biotechnology,

*mouse monoclonal anti-β-actin antibody* (Katalog-Nummer: A3854, Verdünnung: 1:100'000) von Sigma-Aldrich

#### **4.8 Quantifizierung von Thyroidhormonen in HepG2 Zellen durch LC-MS/MS**

- Die Quantifizierung von Thyroidhormonen nach Inkubation mit HepG2 Zellen mit LC-MS/MS wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut der Forensische Toxikologie der Goethe Universität Frankfurt, insbesondere Dr. Alexander Paulke und Werner Pogoda durchgeführt. Die Probenaufarbeitung wurde eigenständig ausgeführt. Die Methodenentwicklung wurde von Dr. Alexander Paulke und Werner Pogoda übernommen und die Auswertung in Zusammenarbeit durchgeführt.

HepG2 Zellen wurden in einem Medium bestehend aus DMEM mit hohem Glucose-Anteil, 10% FCS, Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. 1,5·10<sup>6</sup> Zellen wurden jeweils pro *well* in eine 6-*well*-Platte ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit 2 mL einer Lösung, bestehend aus T4 (1, 10 µM) gelöst in Opti-MEM, mit den Zusätzen Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL), sowie 0,1% DMSO, inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde das gleiche Medium mit 0,1% DMSO ohne Testsubstanz verwendet. Diese Negativ-Kontrolle war als Matrix notwendig, um eine Kalibrierung zu ermöglichen, indem verschiedene Konzentrationen T4(1), TETRAC (4) und T3 (2) zu den unbehandelten Zellen *gespikt* wurden. Nach 24

Stunden wurde das Inkubationsmedium entnommen und in ein Falcon überführt. Dabei wurde jeweils das Inkubationsmedium einer Platte (6 *wells*) in einem Falcon gesammelt. Danach wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA Lösung (125 µL/*well*) abgelöst. Nach 5 Minuten wurde die gleiche Menge DMEM hinzugegeben. Die Mischung aus Trypsin/EDTA und DMEM, die nun die suspendierten Zellen enthielt, wurde ebenfalls gesammelt. Die Lösungen aus allen 6 *wells* einer Platte wurden in ein Falcon gegeben und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet dreimal mit 700 µL 0,9%iger NaCl-Lösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand entnommen und in einem Falcon gesammelt.

#### Probenaufarbeitung:

Zu den jeweiligen entnommenen Proben (~100 mg Zellpellet, 100 µL Inkubationsmedium, 100 µL Trypsin/EDTA/DMEM-Lösung, 100µL 0,9%ige NaCl-Lösung) wurden 1 mL HPLC-reines Wasser und 150 µL 2 molare Essigsäure (hergestellt aus 11,5 mL Eisessig (J.T.Baker, Thermo Fisher Scientific) und Wasser für HPLC-Zwecke *ad* 100 mL) gegeben. Für die Kalibrierung wurden 10 µL einer Kalibrier-Lösungen entnommen und zu dem Wasser-Essigsäure-Gemisch gegeben. Für jede Matrix (100 mg Zellpellet, 100 µL Inkubationsmedium, 100 µL Trypsin/EDTA/DMEM-Lösung) bis auf die Waschlösung (0,9%ige NaCl-Lösung) wurde eine eigene Kalibrierung durchgeführt. Zusätzlich wurde zu allen Lösungen 25 ng 3-Brom-3',5,5'-triiodothyroacetat (Br-TETRAC, **93**) gegeben. Br-TETRAC (**93**) wurde als interner Standard zur Quantifizierung der Thyroidhormone verwendet.

#### Kalibrier-Lösungen:

Konzentrationsreihen mit T3 (**2**), T4 (**1**) und TETRAC (**4**), gelöst in Methanol (HPLC rein, Thermo Fisher Scientific), wurden angesetzt. Bei T3 (**2**) und T4 (**1**) wurde zudem 15% des errechneten Lösungsmittel-Volumens (Methanol) mit 25%igem Ammoniak (PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland) ersetzt, um die Löslichkeit zu verbessern. Es wurde keine Kalibrierung mit TRIAC (**3**) durchgeführt, da sich in einigen Vorversuchen zeigte, dass in den inkubierten Proben kein TRIAC (**3**) detektierbar war.

#### Kalibrierung der Zellpellet-Matrix:

In den zur Matrix *gespikten* 10 µL befanden sich folgende Bestandteile:

Mischung 1: nur Methanol; Mischung 2: 0,5 ng TETRAC (**4**), 1000 ng T4 (**1**) und 25 ng T3 (**2**); Mischung 3: 0,75 ng TETRAC (**4**), 2000 ng T4 (**1**) und 50 ng T3 (**2**); Mischung 4: 1 ng TETRAC (**4**), 3000 ng T4 (**1**) und 75 ng T3 (**2**); Mischung 5: 1,5 ng TETRAC (**4**), 5000 ng T4 (**1**) und 100 ng T3 (**2**); Mischung 6: 2 ng TETRAC (**4**), 6000 ng T4 (**1**) und 150 ng T3 (**2**); Mischung 7: 2,5 ng TETRAC (**4**), 8000 ng T4 (**1**) und 150 ng T3 (**2**); Mischung 8: 3 ng

TETRAC (4), 10000 ng T4 (1) und 250 ng T3 (2); Mischung 9: 5 ng TETRAC (4), 15000 ng T4 (1) und 300 ng T3 (2); Mischung 10: 10 ng TETRAC (4), 20000 ng T4 (1) und 500 ng T3 (2).

Kalibrierung der Inkubationsmediums-Matrix:

In den zur Matrix *gespikten* 10 µL befanden sich folgende Bestandteile:

Mischung 1: nur Methanol; Mischung 2: 0,2 ng TETRAC (4); 50 ng T4 (1) und 1 ng T3 (2); Mischung 3: 0,3 ng TETRAC (4); 100 ng T4 (1) und 2 ng T3 (2); Mischung 4: 0,5 ng TETRAC (4); 200 ng T4 (1) und 3 ng T3 (2); Mischung 5: 0,75 ng TETRAC (4); 400 ng T4 (1) und 4 ng T3 (2); Mischung 6: 1 ng TETRAC (4); 500 ng T4 (1) und 5 ng T3 (2); Mischung 7: 1,25 ng TETRAC (4); 800 ng T4 (1) und 8 ng T3 (2); Mischung 8: 2,5 ng TETRAC (4); 1000 ng T4 (1) und 10 ng T3 (2); Mischung 9: 5 ng TETRAC (4); 2000 ng T4 (1) und 20 ng T3 (2); Mischung 10: 10 ng TETRAC (4); 3000 ng T4 (1) und 30 ng T3 (2).

Kalibrierung der Trypsin/EDTA/DMEM-Matrix:

In den zur Matrix *gespikten* 10 µL befanden sich folgende Bestandteile:

Mischung 1: nur Methanol; Mischung 2: 0,25 ng TETRAC (4); 100 ng T4 (1) und 0,5 ng T3 (2); Mischung 3: 0,5 ng TETRAC (4); 500 ng T4 (1) und 1 ng T3 (2); Mischung 4: 1 ng TETRAC (4); 750 ng T4 (1) und 1,5 ng T3 (2); Mischung 5: 1,5 ng TETRAC (4); 900 ng T4 (1) und 2 ng T3 (2); Mischung 6: 2 ng TETRAC (4); 1000 ng T4 (1) und 2,5 ng T3 (2); Mischung 7: 2,5 ng TETRAC (4); 1500 ng T4 (1) und 5 ng T3 (2); Mischung 8: 5 ng TETRAC (4); 1800 ng T4 (1) und 7,5 ng T3 (2); Mischung 9: 7,5 ng TETRAC (4), 3000 ng T4 (1) und 10 ng T3 (2); Mischung 10: 10 ng TETRAC (4); 4000 ng T4 (1) und 15 ng T3 (2).

Die Zellpellets wurden zudem mit einem Bandelin Sonoplus HD 3100 Homogenisator und einem Ultraschallwandler UW 3100 (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) für 30 sec homogenisiert (Ultraschall-Frequenz: 20 kHz ± 500 Hz, Temperatur: 25°C). Danach wurde das Homogenisat bei 3000 rpm 10 Minuten mit einer Heraeus Labofuge 400 (Thermo Scientific, Kendro laboratory products, Asheville, North Carolina, USA) zentrifugiert.

Anschließend wurde mit allen Proben wie folgt vorgegangen:

Es wurde eine Säulen-Festphasenextraktion (Bond Elut Plexa, Agilent Technologies, 3 mL, Sorbensbettmasse 60 mg) durchgeführt. Die Säulen wurden mit 1 mL Wasser und 1 mL Methanol vorkonditioniert. Danach wurde der Überstand der zentrifugierten Zellen, bzw. das Inkubationsmedium, das Trypsin/EDTA/DMEM-Gemisch und die NaCl-Lösungen auf die Säule gegeben und extrahiert. Die Säulen wurden unter Vakuum-Einfluss getrocknet und bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde durch die dreimalige Zugabe von 500

$\mu\text{L}$  Methanol eluiert. Die Fraktionen wurden aufgefangen und mit einem Zymark Turbovap LV Evaporator (SOTAX AG, Aesch, Schweiz) für 30 Minuten bei 25°C bis zur Trockne eingedampft. Die eingetrocknete Mischung wurde mit 100  $\mu\text{L}$  der mobilen Phase (80% Ameisensäure, HPLC rein (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 20% Acetonitril, HPLC rein (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) wieder gelöst.

Danach wurden die Proben per LC-MS/MS vermessen.

LC-MS/MS:

Es wurde ein Agilent 1290 Infinity HPLC System (Agilent Technologies), bestehend aus einer Vorsäule (Poroshell 120 EC-C18, 3.0x5.4 $\mu$ ) und einer Trennsäule (Poroshell EC-C18, 3.0x100, 2.7  $\mu$ ) benutzt. Die Temperatur der HPLC wurde auf 50°C eingestellt und ein linearer Gradient wurde gewählt. Die mobile Phase bestand zunächst aus 95% Laufmittel A (5 mM Ameisensäure gelöst in Wasser) und 5% Laufmittel B (0,1% Ameisensäure gelöst in Acetonitril). Nach 4 Minuten stellte sich durch einen linearen Gradienten ein Verhältnis von 5% Laufmittel A und 95% Laufmittel B ein. Die Flussrate betrug 0,5 mL/Min und die Laufzeit 5,4 Minuten mit anschließenden 1,4 Minuten Nachlaufzeit. Das Injektionsvolumen betrug 5  $\mu\text{L}$ .

Die MS-Messung wurde mit einem Agilent 6460 Triple Quad (Agilent Technologies) mit einer Elektrospray Ionisations-Quelle (Agilent *Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology*) durchgeführt. Gemessen wurde im positiven Modus mit folgenden Einstellungen:

Kapillarspannung 4 kV pos.; 3,5 kV neg., Düsenanspannung 1 kV pos.; 1 kV neg., dynamisches *multiple reaction monitoring* (MRM), Zyklus: 500 msec, Gas-Temperatur: 250°C, Gas-Flussrate: 13 L/Min, Zerstäuber 20 psi, Sheath-Gas 400 °C, Aheath-Gas 12 L/Min.

Folgende T4-Massen-Übergänge wurden zur Quantifizierung verwendet:

m/z 776,8 zu m/z 632 (Kollisions-Energie = 36 V) und 605 (Kollisions-Energie = 18 V) und 127 (Kollisions-Energie = 54 V)

Folgende T3-Massen-Übergänge wurden zur Quantifizierung verwendet:

m/z 650,9 und 649,9 zu m/z 633 (Kollisions-Energie = 18 V) und 127 (Kollisions-Energie = 36 V)

Folgende TETRAC-Massen-Übergänge wurden zur Quantifizierung verwendet:

m/z 746,8 und 702,8 zu m/z 703 (Kollisions-Energie = 4 V) und 575 (Kollisions-Energie = 10 V (ausgehend von m/z 746,8), 24 V (ausgehend von m/z 702,8)) und 448 (Kollisions-Energie = 20 V)

Folgende TRIAC-Massen-Übergänge wurden zur Quantifizierung verwendet:

m/z 620,8 und 575,8 zu m/z 577 (Kollisions-Energie = 1 V) und 127 (Kollisions-Energie = 16-20 V)

Folgende Br-TETRAC-Massen-Übergänge wurden zur Quantifizierung verwendet:

m/z 698,8 zu m/z 655 (Kollisions-Energie = 4 V) und 527 (Kollisions-Energie = 10 V)

#### 4.9 *In vivo* pharmakologische Charakterisierung

- Die *in vivo*-Phase des Tierversuchs mit Br-T4 (**92**) wurde durch den Dienstleister Pharmacelsus (Saarbrücken, Deutschland) durchgeführt. Die pharmakologischen Studien an den Organen der Tiere wurden eigenständig durchgeführt.

Neun männliche C57BL6/JRj Mäuse (38-41 g Körpergewicht, erworben bei Janvier Labs, Frankreich) wurden in einem Temperatur-kontrollierten Raum (20–24 °C) mit einem 12 Stunden hell-dunkel-Rhythmus und ausreichend Wasser und Nahrung gehalten. Alle Applikationen und Experimente am lebenden Tier wurden bei Pharmacelsus in Saarbrücken (Deutschland) nach Genehmigung der örtlichen Tierschutzbehörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen, Saarbrücken) durchgeführt.

Die neun Mäuse erhielten eine einzelne orale Dosis von 3 mg/kg des T4-Derivats 3-Brom-3',5,5'-triiodothyronin (Br-T4, **92**) gelöst in Wasser mit Zusatz von 1% Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)/Tween 80 (99:1). Während der Studie zeigten die Mäuse ein normales Verhalten und es traten keine Nebenwirkungen auf.

Um die Lebern der Mäuse zu entnehmen, wurden jeweils drei Mäuse nach 60, 480 und 1440 Minuten unter Isofluran-Narkose gesetzt. Dann wurden etwa 500 µL Blut entnommen und die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet.

Danach konnten die Lebern entnommen und bei -80°C eingefroren werden.

Zielgen-Quantifizierung der Leber:

Um die Zielgen-Quantifizierung mittels qPCR durchzuführen, wurden zunächst die Hepatocyten aus den Lebern isoliert.

Ein Drittel der Leber wurde durch ein Zell-Sieb gepresst (*Falcon Cell Strainer*, Porengröße 40 µm (BD Bioscience, Erembodegem, Belgien) und in einem Falcon aufgefangen. Das Gewebe wurde zudem mit PBS gewaschen, das zusätzlich 10% FCS, Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) enthielt. Etwa 5 mL Zellsuspension wurden gesammelt und bei 1200 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden mit 5 mL kaltem PBS gewaschen und erneut bei 1200 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Danach erfolgte die mRNA-

Aufreinigung mit Hilfe des EZA Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, Georgia, USA). Die cDNA-Synthese wurde ebenfalls mit einem Kit durchgeführt (*high capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)). Die qPCR erfolgt an einem *StepOnePlus real-time* PCR System (Applied Biosystems).

Alle Proben wurden mindestens dreimal in Triplikaten vermessen. Die Auswertung erfolgte zunächst mit Hilfe der StepOnePlus™ Software v2.3. Die Berechnung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte wurde mit Microsoft Excel 2016 durchgeführt und anschließend wurde mit Hilfe der Software Graphpad Prism 5.01 Balken-Diagramme erstellt.

Folgende Primer für die murinen Gene wurden verwendet:

mCD36: 5'-TGC TGG AGC TGT TAT TGG TG-3' (fwd) und 5'-CAT GAG AAT GCC TCC AAA CA-3' (rev);

mGLUT4: 5'-TGA AGA ACG GAT AGG GAG CAG-3' (fwd) und 5'-GAA GTG CAA AGG GTG AGT GAG-3' (rev);

mAdiponectin: 5'-TGA CGA CAC CAA AAG GGC TC-3' (fwd) and 5'-CAC AAG TTC CCT TGG GTG GA-3' (rev);

mGAPDH: 5'-CGA CTT CAA CAG CAA CTC CCA CTC TTC C-3' (fw) und 5'-TGG GTG GTC CAG GGT TTC TTA CTC CTT-3' (rev).

#### 4.10 Synthese und Charakterisierung von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93)

- Die Synthese und Charakterisierung von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93) wurde von Dr. Pascal Heitel durchgeführt.

Allgemeine Angaben zur Synthese:

Lösungsmittel und Chemikalien: Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden kommerziell in ausreichender Reagenzien-Qualität erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Dünnschichtchromatographie: DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Firma Merck KGaA), Schichtdicke 0,2 mm. Die Chromatogramme wurden über Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder durch Fluoreszenz bei 366nm visualisiert.

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Firma Machery-Nagel), Korngröße 0,04-0,063 mm.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden an den Spektrometern Bruker AM 250 XP, AV 300, AV 400 und AV 500 (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden in *parts per million* (ppm) angegeben bezogen auf Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard. Kopplungskonstanten werden in der Einheit Hertz (Hz) angegeben. Der Multiplizitäts- oder Entartungsgrad wird für Singulets als s, für Dubletts als d, für Triplets als t, für Quartetts als q und für Multipletts als m angegeben.



Massenspektrometrie (MS): Die Massenspektrometrie wurde an einem Fisons Instruments VG Platform II (Thermo Fischer Scientific) durchgeführt. Zur Ionisierung wurde die ESI im negativem (ESI-) oder positiven (ESI+) Modus verwendet. Hochauflösende Massen wurden an einem MALDI LTQ ORBITRAP XL *instrument* (Thermo Fisher Scientific) aufgenommen.

HPLC: Die Reinheit wurde mittels HPLC bestimmt. Dazu wurde die Varian ProStar HPLC (SpectraLab Scientific Inc., Markham, Ontario, Canada) verwendet, die ausgestattet ist mit einer MultoHigh100 Phenyl 5  $\mu$  240+4 mm Säule (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland). Es wurde folgender Gradient für die Chromatographie ausgewählt: 5 Minuten isokratischer Gradient: Wasser für HPLC Zwecke/Methanol 80:20 und 0.1% Ameisensäure; bis Minute 45: linearer Gradient zu Methanol und 0.1% Ameisensäure, anschließend 10 Minuten: isokratischer Gradient Methanol und 0.1% Ameisensäure.

Die Flussrate betrug 1 mL/min und die Substanzen wurden mit Hilfe eines UV-Detektors bei 245 nm und 280 nm identifiziert. Alle Substanzen, ausgenommen von Zwischenprodukten, hatten eine Reinheit von > 95%.

#### 4.10.1 Analytik von Br-TETRAC (93) und Br-T4 (92)

##### 3-Brom-3',5,5'-triiodothyroacetat (Br-TETRAC, 93):

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 3,66 (s; 2H); 7,10 (s; 2H); 7,70 (d;  $^4J$  = 1,8 Hz; 1H); 7,86 (d;  $^4J$  = 1,8 Hz; 1H); 9,35 (br s; 1H); 12,56 (br s; 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 38,5; 87,8; 93,0; 115,7; 124,9; 135,2; 136,8; 140,4; 148,9; 150,2; 151,2; 172,1 ppm.

ESI-MS:  $m/z$  654,77 [ $\text{M-CO}_2\text{-H}^-$ ] (100%); 656,79 [ $\text{M-CO}_2\text{-H}^-$ ] (87%); 698,78 [ $\text{M-H}^-$ ] (53%); 700,81 [ $\text{M-H}^-$ ] (64%).

HRMS (MALDI):  $m/z$  kalkuliert 699,67345 (100%); 701,67141 (97%) für  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{BrI}_3\text{O}_4$ ; gefunden 699,67333 (100%); 701,67125 (100%).

##### 3-Brom-3',5,5'-triiodthyronin (Br-T4, 92):

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 3,08 (dd;  $^2J$  = 14,1 Hz;  $^3J$  = 7,9 Hz; 1H); 3,25 (dd;  $^2J$  = 14,1 Hz;  $^3J$  = 4,8 Hz; 1H); 4,18 – 4,38 (m; 1H); 7,14 (s; 2H); 7,74 (s; 1H); 7,89 (s; 1H); 8,48 (br s; 3H); 9,30 (br s; 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz; DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 33,9; 52,8; 87,9; 93,7; 116,1; 124,8; 135,2; 136,7; 140,4; 149,3; 150,2; 151,1; 170,1 ppm.

ESI-MS:  $m/z$  729,75 [ $\text{M+H}^+$ ] (100%); 731,76 [ $\text{M+H}^+$ ] (96%).

HRMS (MALDI):  $m/z$  kalkuliert 729,70783 (100%); 731,70726 (95%) für  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrI}_3\text{NO}_4$ ; gefunden 729,70936 (100%); 731,70578 (97%).

## 5. Anhang

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

13-HODE	13-Hydroxyoctadecadiensäure
15-HETE	15-Hydroxyeicosatetraensäure
3,3'-T2	3,3'-Diiodthyronin
3,5-T2	3,5-Diiodthyronin
3-T1AM	3-Iodthyronamin
9-HODE	9-Hydroxyoctadecadiensäure
AADAT	Kynurenin/Alpha-Aminoadipat Aminotransferase
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
ABC	<i>ATP-binding cassette</i> Transporter
ACC1	Acetyl CoA Carboxylase 1
ADP	Adenosindiphosphat
ADRP, Perilipin 2	<i>adipose differentiation-related protein</i>
AF	Transaktivierungs-Funktion
AGP	1-O-octadecenyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphat
AgRP	<i>agouti-related protein</i>
AKAP1	<i>A kinase anchor protein 1</i>
ALDH	Alkoholdehydrogenase
AMPK	AMP-aktivierte Protein-Kinase
ANGPTL4	<i>Angiopoietin-like protein 4</i>
Apo	Apolipoprotein
AQP7	Glycerol Transporter Aquaporin 7
ATGL	Adipocyten Triglycerid Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
azPC	Hexadecyl-azelaoyl-phosphatidylcholin
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
CamK IV	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase Typ IV</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR	Konstitutiver Androstan Rezeptor
CART	Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript

CBP	CREB-Bindeprotein
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdk5	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>
CGI-58	<i>comparative gene identification-58</i>
ChREBP	<i>carbohydrate response element binding protein</i>
CK20	Cytokeratin 20
CMV	Cytomegalievirus
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxygenase
CPT-1 $\alpha$	Carnitin-Palmitoyltransferase 1 $\alpha$
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CYP7A1	Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase
CYP7A1	Cholesterol 7-Hydroxylase
CYP7B1	Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase
d	Dubletts
D	Deiodnase
DAX1	<i>Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
DIT	3,5-Diiodyrosin
DITPA	Diiodthyropropionsäure
DR	<i>direct repeat</i>
E6AP	Ubiquitin-Protein Ligase
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESI	Elektrospray Ionisations-Quelle
FABP4/aP2	Fettsäure Bindungs-Protein 4/ Adipocyten Protein 2
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fettsäure-Synthase
FAT/CD36	Fettsäure Translokase
FATP	Fettsäure Transport-Protein

FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF21	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 21
FI	Fluoreszenz-Intensität
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FSP27	<i>fat-specific protein 27</i>
FXR	Farnesoid X Rezeptoren
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GC1	Sobetirome
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLUT	Glucosetransporter
GPD	Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase
GPD	Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HDAC3	Histon Deacetylase 3
HDL	<i>high density</i> Lipoprotein
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HMG-CoA Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HRP	horseradish-peroxidase
HSL	<i>hormone sensitive lipase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
<i>HT-FRET</i>	<i>homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer</i>
Hz	Hertz
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor</i> Bindungsprotein
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
IR	<i>inverted repeat</i>
IRD	<i>inner ring deiodination</i>

ITC	Isothermen Titrationskalorimetrie
KB-2115	Eprotirome
LAAO	L-Aminosäure Oxidase
LAT	L- $\alpha$ -Aminosäure Transaminase
LAT	L-Typ Aminosäure Transporter
LBD	Ligand-Bindedomäne
LC-MS/MS	<i>Liquid</i> -Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
LPA	Lysophosphatidsäure
L-PK	L-Typ Pyruvat Kinase
LPL	Lipoproteinlipase
LXR	Leber X Rezeptor
m	Multiplets
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MBP	Myelin-Basisches Proteins
MCT	Monocarboxylat Transporter
ME	Malat-Enzym
MED1/DRIP205/TRAP220	<i>mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1</i>
MIT	3-Moniodotyrosin
MLC2a	Myosin-Leichtkette 2
MOGAT1	Monoacylglycerol O-Acyltransferase 1
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
n	stöchiometrisches Verhältnis der Bindung
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NcoR	nukleärer Rezeptor Corepressor
NcoR1, TRAC-1	nukleärer Rezeptor Corepressor 1, <i>thyroid-hormone- and retinoic-acid-receptor-associated co-repressor 1</i>
NcoR2, SMRT	nukleärer Rezeptor Corepressor 2, <i>silencing mediator for</i>

	<i>retinoid or thyroid-hormone receptors</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NonO	<i>non-POU domain containing octamer binding protein</i>
Nox	NADPH Oxidase
NPY	Neuropeptid Y
NRNC	Nuclear Receptors Nomenclature Committee
NSAR/NSAID	nichtsteroidale Antirheumatika
NTIS	<i>Non-Thyroidal-Illness-Syndroms</i>
nTRE	negatives Thyroidhormon <i>Response Element</i>
OAT	organischer Anionen Transporter
OLR1	oxidiertes LDL Rezeptor 1
ORD	<i>outer ring deiodination</i>
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 1
p300	Histon Acetyltransferase
PAF	Plättchenaktivierende Faktor
PAM	<i>peptidylglycine α-amidating monooxygenase</i>
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfate
PBC	biliären Cholangitis
PBP	PPAR <i>binding protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Prohormon-Convertase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
pFR-Luc	<i>Firefly-Luciferase</i>
PGC-1α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ Coaktivator 1-α
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PK	Protein Kinase
PKAcat	Protein Kinase A <i>catalytic subunit</i>
PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ppm	<i>parts per million</i>

PPRE	PPAR-Response Element
pRL-SV40	Renilla-Plasmid
PRMT1	Protein-Arginin-N-methyltransferase 1
PRMT4	Proteinargininmethyltransferase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
q	Quartetts
qPCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrat 1</i>
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RARE	Retinsäure Response Elementen
reverses T3, rT3	3,3',5'-Triiodthyronin
RIP140, NRIP1	<i>Rezeptor interagierendes Protein 140, nukleärer Rezeptor-interagierendes Protein 1</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTH	Schilddrüsenhormon-Resistenz
RXR	Retinoid X Rezeptor
s	Singulets
SCD-1	Stearoyl-Coenzym A Desaturase 1
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschluss-Chromatographie ( <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
SERCA	<i>sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium-transporting ATPase</i>
SERM	Selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator
SHP	<i>small heterodimer partner</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPPARM	selektiver PPAR $\gamma$ Modulator
SPPARM	selektiver PPAR $\gamma$ Modulator
SRC	Steroid Rezeptor Coaktivator
SRC-2, TRAM-1 oder	Steroid Rezeptor Coaktivator 2, Thyroidhormon-Rezeptor-

AIB1	Aktivator-Molekül 1, <i>amplified in breast 1</i>
SRC-3, TIF2 oder GRIP1	Steroid Rezeptor Coaktivator 2, <i>transcriptional mediators/intermediary factor 2, Glucocorticoid receptor-interacting protein-1</i>
SREBP	<i>sterol response element binding protein</i>
SSAO	Semicarbazid-sensitive Amin-Oxidase
Stat3	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STEAR	<i>selective tissue estrogenic activity regulator</i>
SULT1 Familie	Phenol-Sulfotransferasen
SULT1E1	humane Estrogen Sulfotransferase
SULT2 Familie	Hydroxysteroid-Sulfotransferasen
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
SV-40	Simian-Virus 40
t	Tripletts
T0	unsubstituiertes Thyronin
T0AM	vollständig deiodiertes Thyronamin
T3	3,3',5-Triiodthyronin
T3AM	Triiodthyronamine
T4	3,3',5,5'-Tetraiodthyronin
T4AM	Tetraiodthyronamine
TAAR1	<i>Trace Amine Associated Receptor 1</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBG	thyroxinbindendes Präalbumin/Transthyretin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TETRAC	Tetraiodthyoacetat
TEV	tobacco etch virus
TGB	Thyreoglobulin
THF	Tetrahydrofuran
THR	Thyroidhormon-Rezeptoren
TMS	Tetramethylsilan
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPO	Thyreoperoxidase
TRE	Thyroidhormon <i>Response Element</i>



TRF	<i>time-resolved fluorometry</i>
TRH	Thyreotropin- <i>Releasing</i> -Hormon, Thyroliberin
TRIAC	Triiodthyroacetat
tRXR	verkürzter/ <i>truncated</i> RXR
TSH	Thyreotropin, Thyreoidea-stimulierendes Hormon
tTG	<i>tissue transglutaminase</i>
UCP	<i>uncoupling protein</i>
UGT	Uridin-5'-diphospho-glucuronosyltransferase
VDR	Vitamin D Rezeptor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLCFA	<i>very long chain fatty acid</i>
VLDL	<i>very low density</i> Lipoprotein
ZNS	zentrales Nervensystem
βGK	β-Glucokinase
ΔG	freie Enthalpie/Gibbs-Energie
ΔH	Reaktionsenthalpie
ΔS	Entropie

## 5.2. Datensätze

### 5.2.1 Gal4-Luciferase-Reportergen Assay Daten

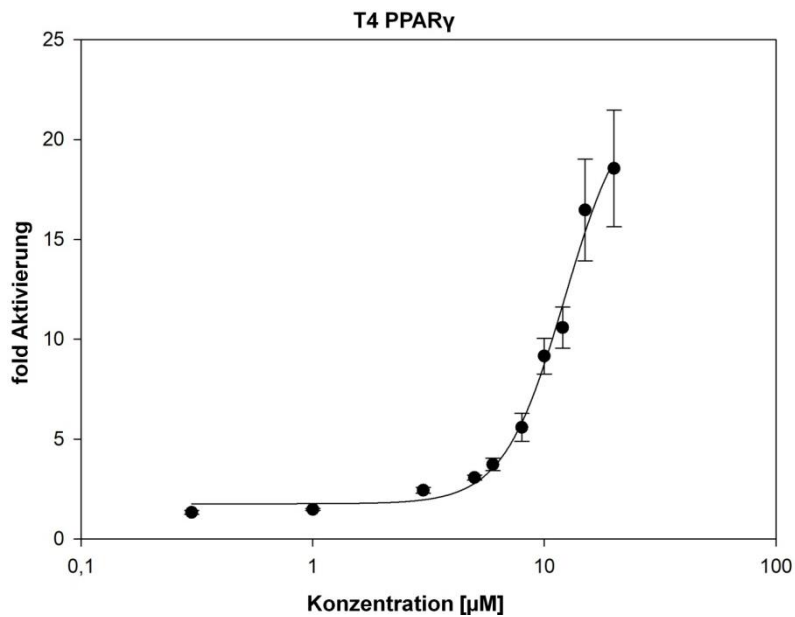


Abbildung 61: T4-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.

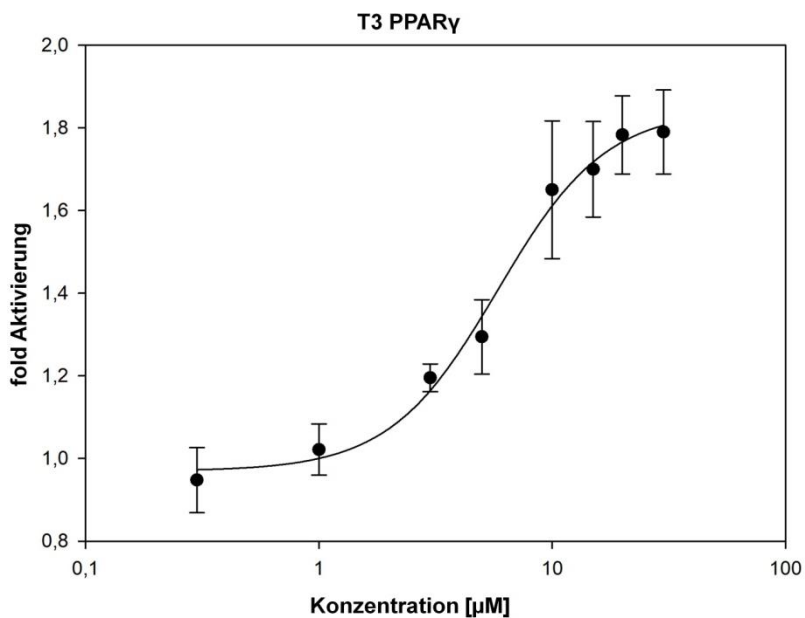
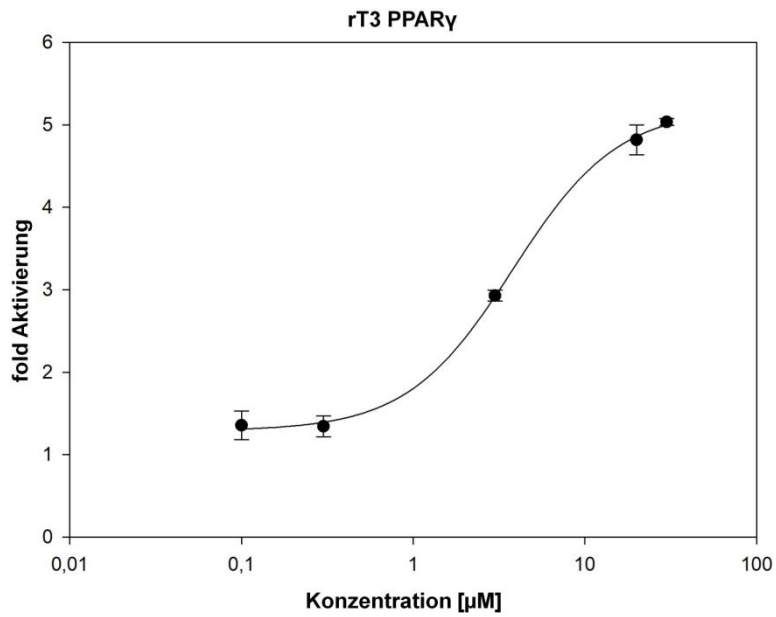
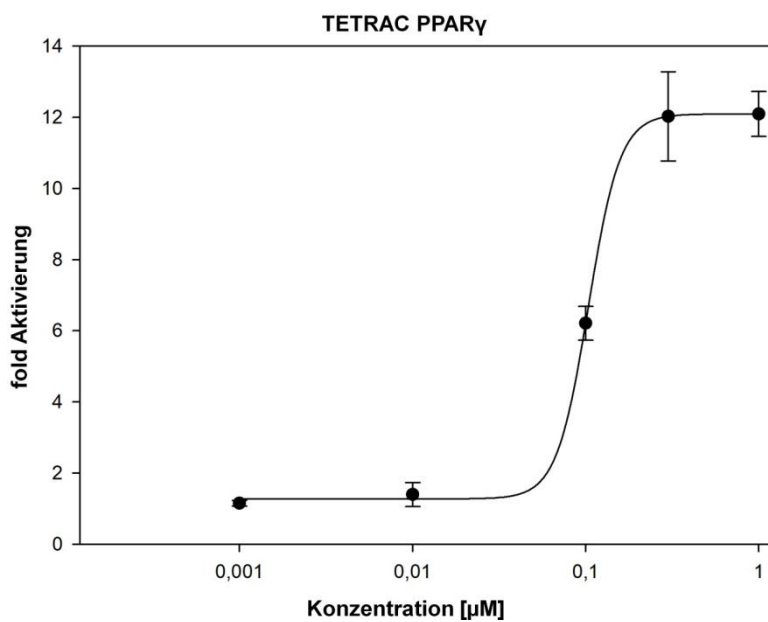


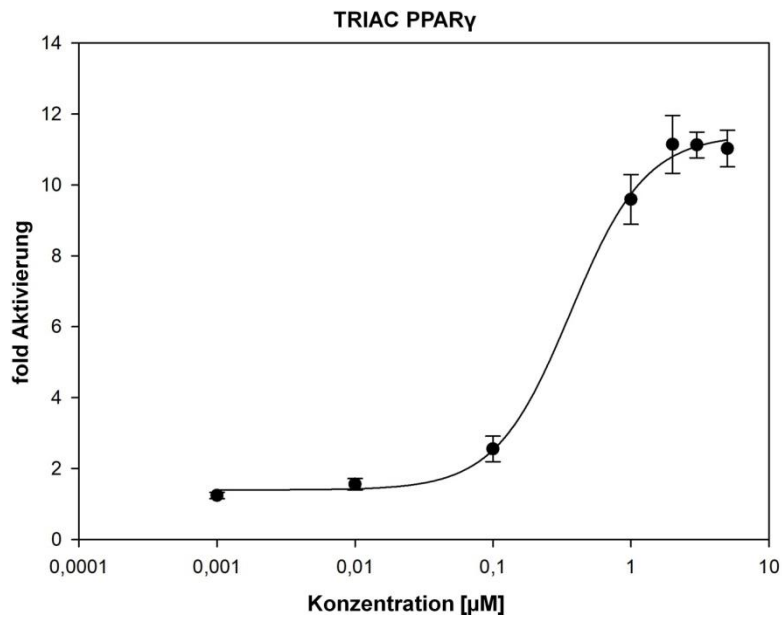
Abbildung 62: T3-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.



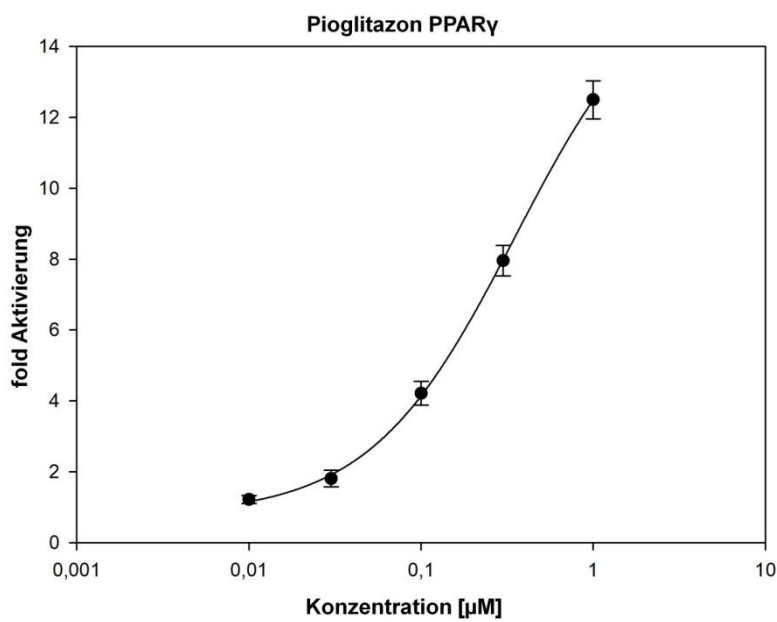
**Abbildung 63: rT3-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.



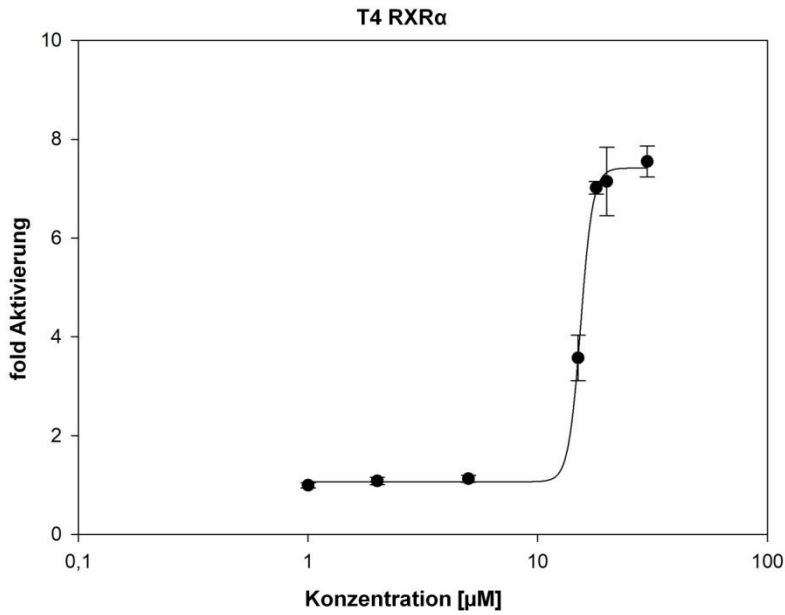
**Abbildung 64: TETRAC-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.



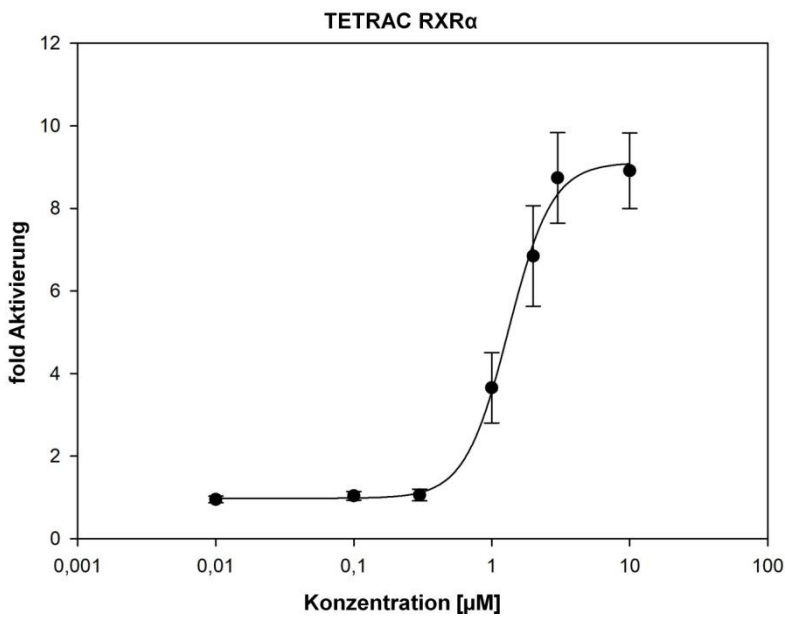
**Abbildung 65: TRIAC-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.



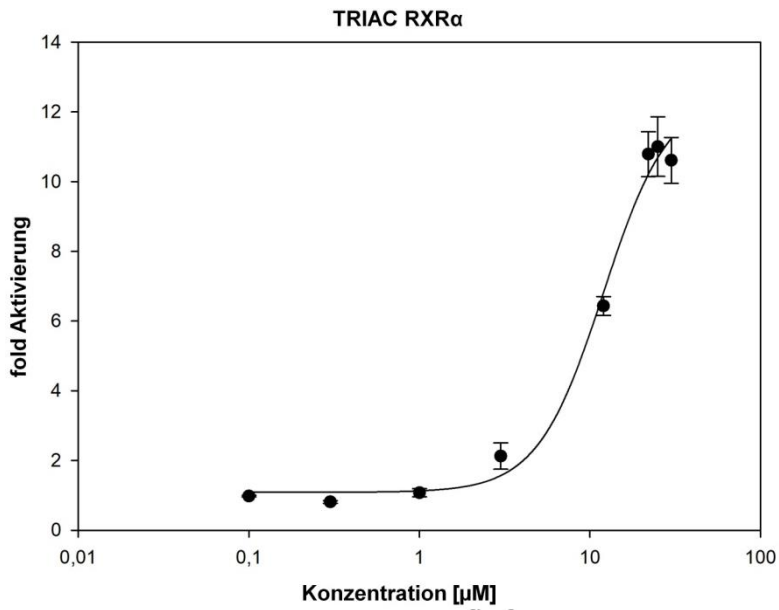
**Abbildung 66: Pioglitazon-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.



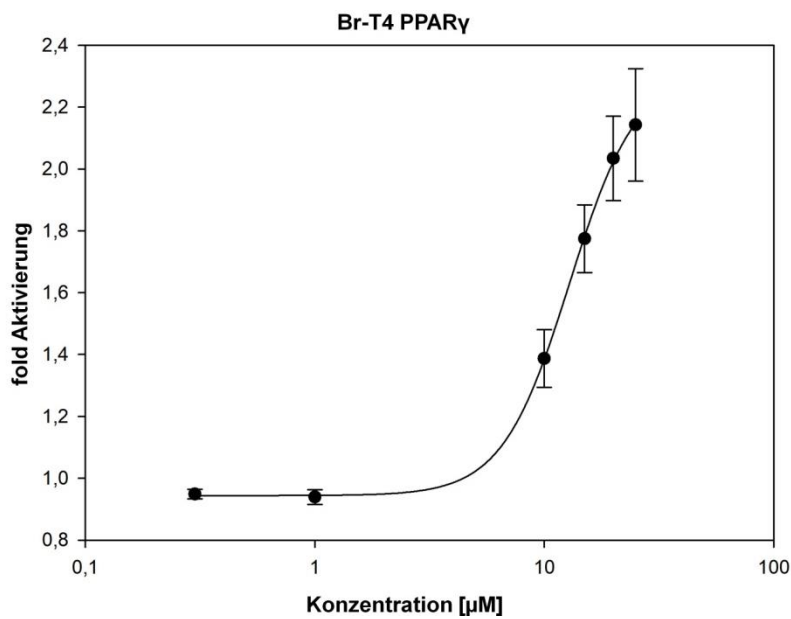
**Abbildung 67: T4-RXRα-Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reporter-gen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO ± S.E.M. bestimmt, n ≥ 3, Duplikate, HEK293T-Zellen.



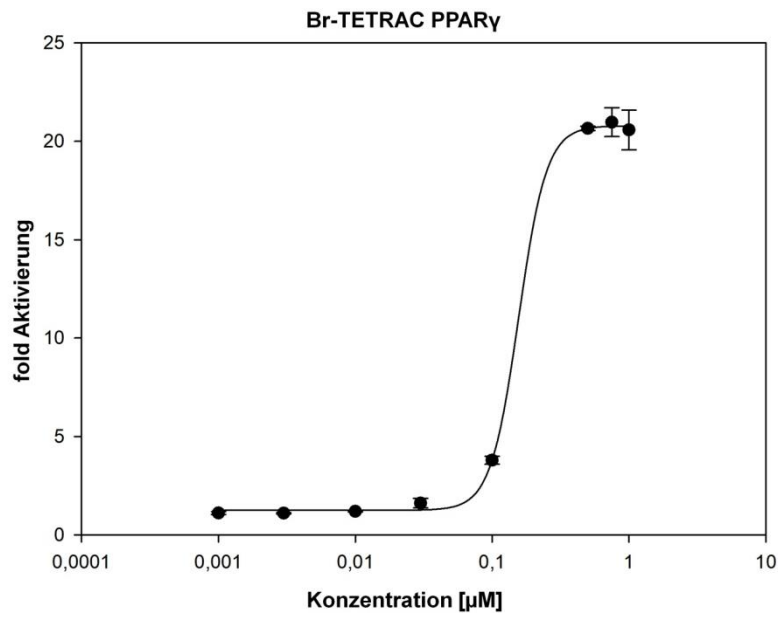
**Abbildung 68: TETRAC-RXRα-Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reporter-gen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO ± S.E.M. bestimmt, n ≥ 3, Duplikate, HEK293T-Zellen.



**Abbildung 69: TRIAC-RXR $\alpha$ -Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.



**Abbildung 70: Br-T4-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven.** Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt,  $n \geq 3$ , Duplikate, HEK293T-Zellen.



**Abbildung 71: Br-TETRAC-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. Die Ergebnisse wurden im Gal4-Luciferase-Reportergen Assay als fold Aktivierung gegen 0,1% DMSO  $\pm$  S.E.M. bestimmt, n $\geq$ 3, Duplikate, HEK293T-Zellen.**

## 5.2.2 ITC-Daten der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Bindung

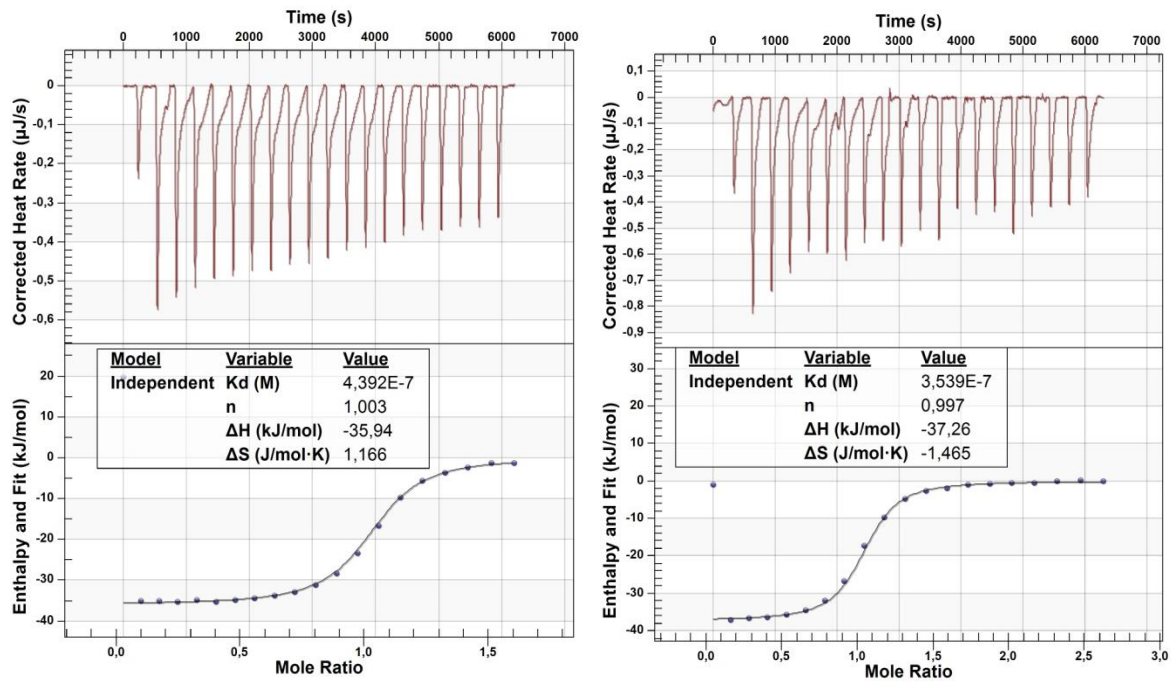


Abbildung 72: ITC-Daten der T4-PPAR $\gamma$ -Interaktion.

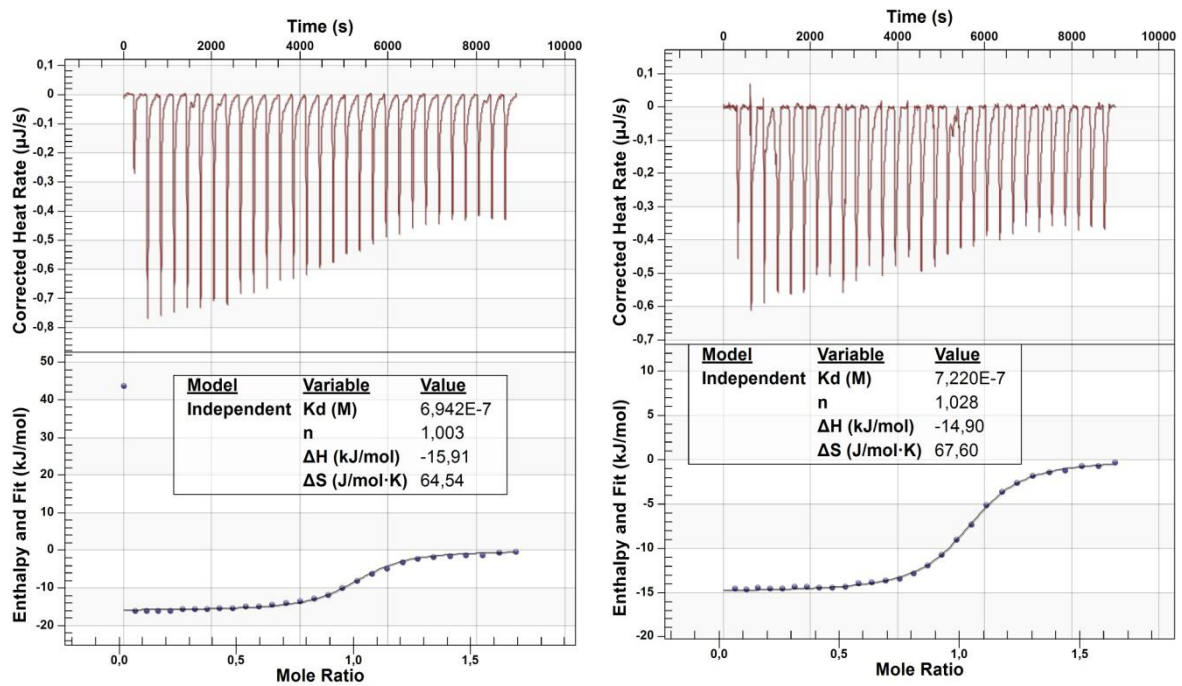


Abbildung 73: ITC-Daten der T3-PPAR $\gamma$ -Interaktion.



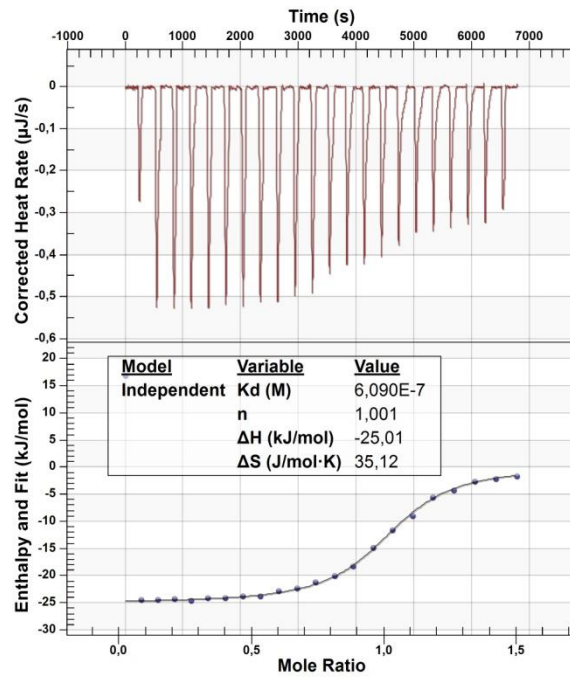
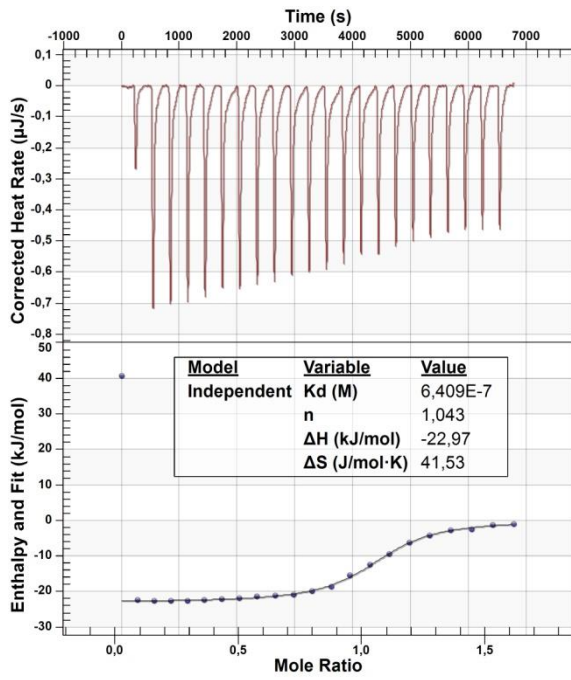


Abbildung 74: ITC-Daten der rT3-PPAR $\gamma$ -Interaktion.

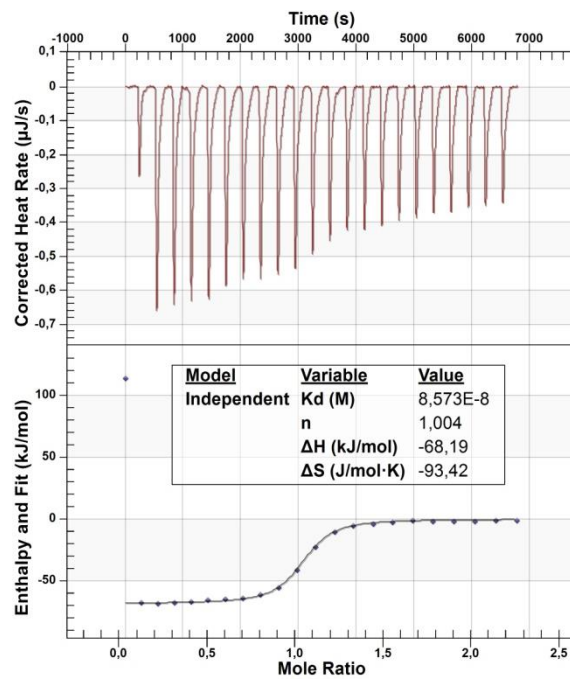
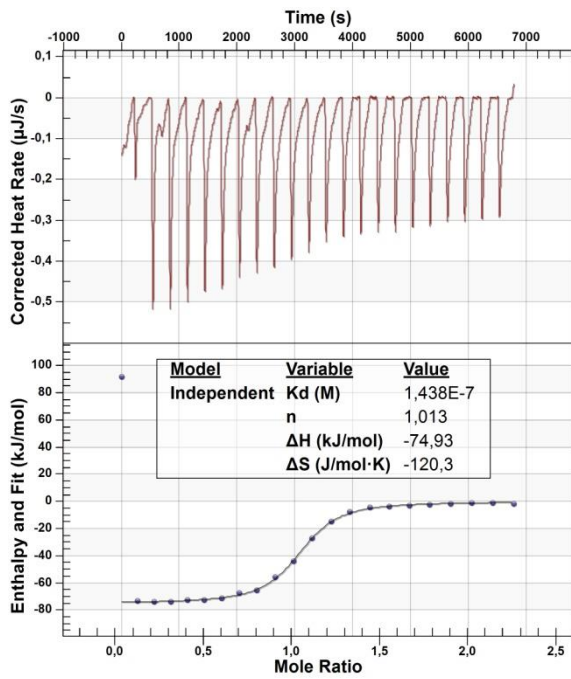


Abbildung 75: ITC-Daten der TETRAC-PPAR $\gamma$ -Interaktion.

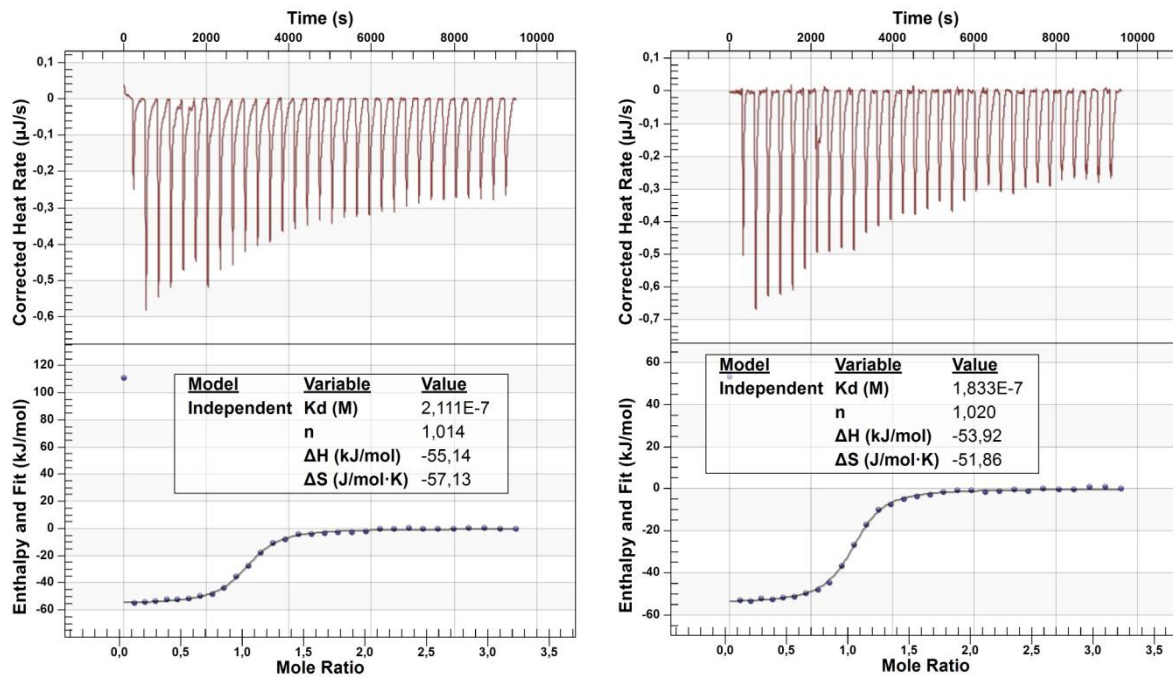


Abbildung 76: ITC-Daten der TRIAC-PPAR $\gamma$ -Interaktion.

### 5.2.3 ITC-Daten der Thyroidhormon-RXR $\alpha$ -Bindung

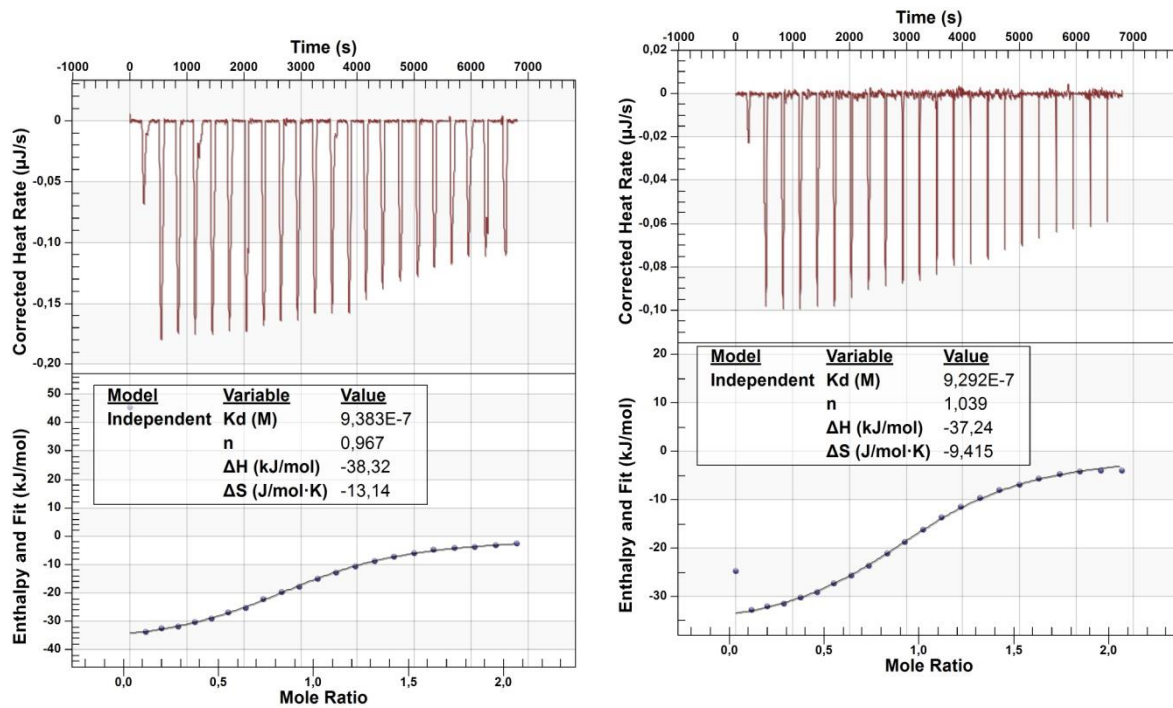


Abbildung 77: ITC-Daten der T4-RXR $\alpha$ -Interaktion.

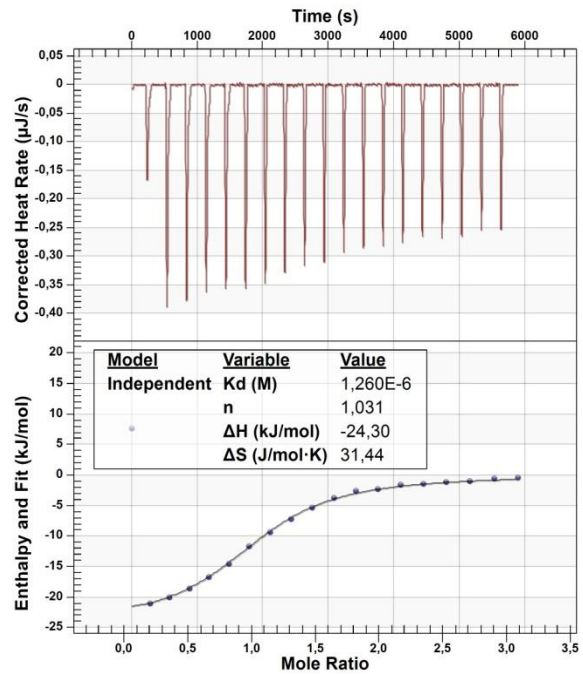
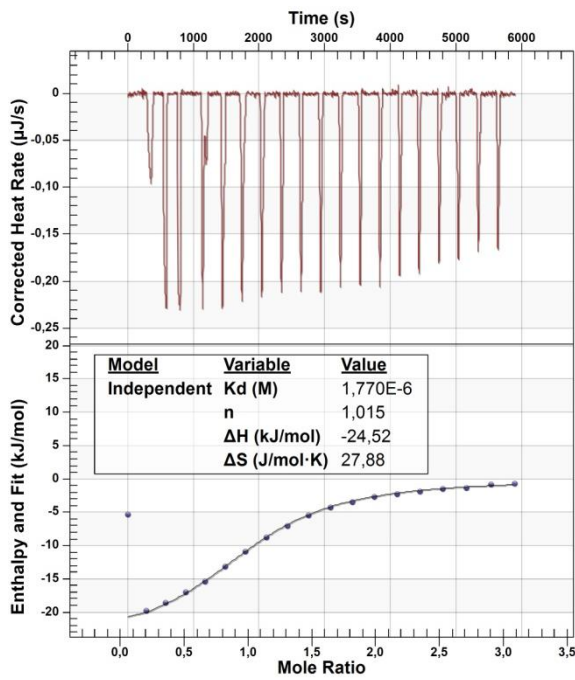


Abbildung 78: ITC-Daten der TETRAC-RXR $\alpha$ -Interaktion.

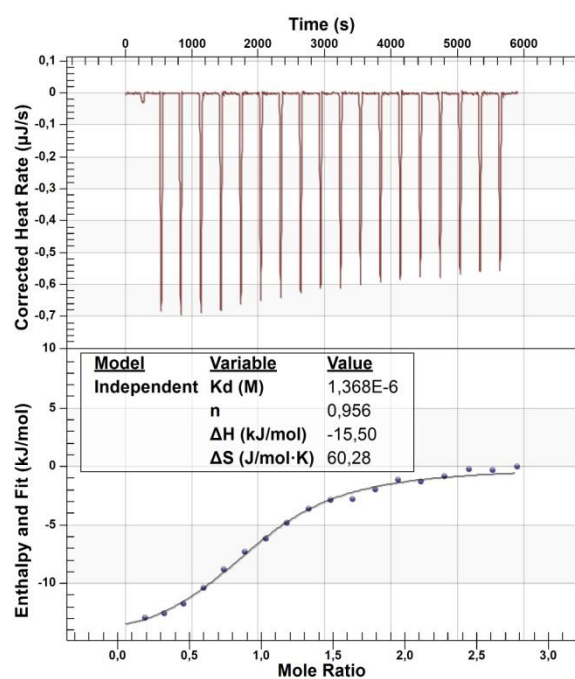
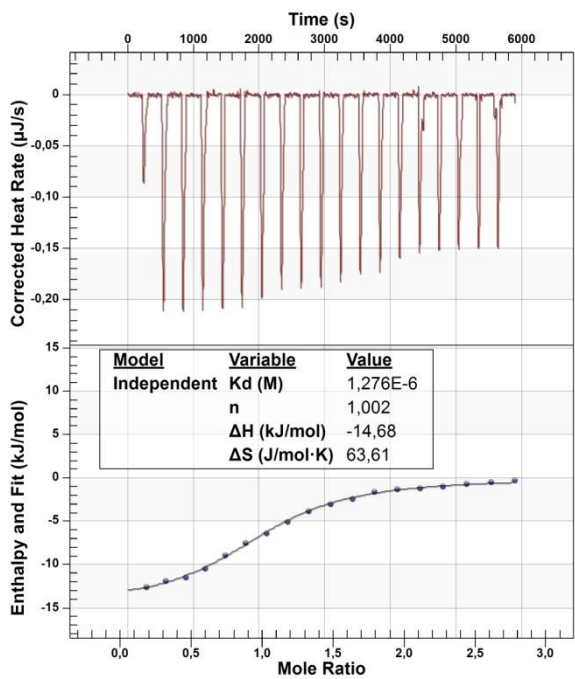


Abbildung 79: ITC-Daten der TRIAC-RXR $\alpha$ -Interaktion.

## 5.2.4 Kristallstrukturanalyse: Daten-Sammlung und *refinement*

Tabelle 30: Daten-Sammlung und *refinement* der Kristallstruktur.

Komplex	PPAR $\gamma$ -TETRAC
<b>PDB accession code</b>	<b>noch nicht bekannt</b>
<b>Daten-Sammlung</b>	
<i>Resolution</i> <sup>a</sup> (Å)	41,62 - 2,98 (3,14 – 2,98)
<i>Spacegroup</i>	<i>P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2</i>
<i>Cell dimensions</i>	<i>a = b = 61,7, c = 166,5 Å</i> <i><math>\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ</math></i>
<i>No. unique reflections</i> <sup>a</sup>	7,082 (1,014)
<i>Completeness</i> <sup>a</sup> (%)	99,3 (99,9)
<i>I/<math>\sigma</math>I</i> <sup>a</sup>	13,7 (1,8)
<i>R<sub>merge</sub></i> <sup>a</sup> (%)	0,084 (0,972)
<i>CC (1/2)</i>	0,999 (0,608)
<i>Redundancy</i> <sup>a</sup>	6,3 (6,7)
<b>Refinement</b>	
<i>No. atoms in refinement</i> (PPAR $\gamma$ /TETRAC/andere) <sup>b</sup>	2,057/22/4
<i>B Faktor</i> (PPAR $\gamma$ /TETRAC/andere) <sup>b</sup> (Å <sup>2</sup> )	103/118/63
<i>R<sub>fact</sub></i> (%)	23,7
<i>R<sub>free</sub></i> (%)	29,2
<i>rms deviation bond</i> <sup>c</sup> (Å)	0,011
<i>rms deviation angle</i> <sup>c</sup> (°)	1,1
<b>Molprobit Ramachandran</b>	
<i>Favour</i> (%)	90,16
<i>Disallowed</i> (%)	0
<b>Molprobit score</b>	6,22 (100 <sup>th</sup> percentile)

<sup>a</sup> Werte in Klammern zeigen die Statistik der *highest resolution shells*.

<sup>b</sup> andere bedeutet Wasser-Moleküle.

<sup>c</sup> rms bedeutet *root-mean-square*.

## 5.2.5 Western Blot Daten

### 5.2.5.1 Knockdown-Effizienz (Protein-Ebene)

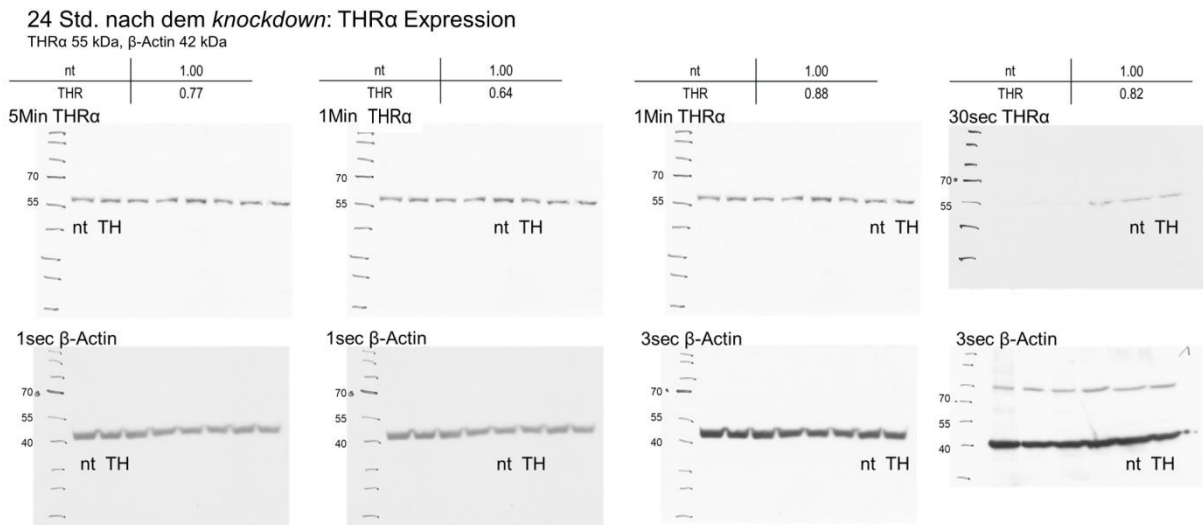


Abbildung 80: *knockdown*-Effizienz von THRA nach 24 Stunden.

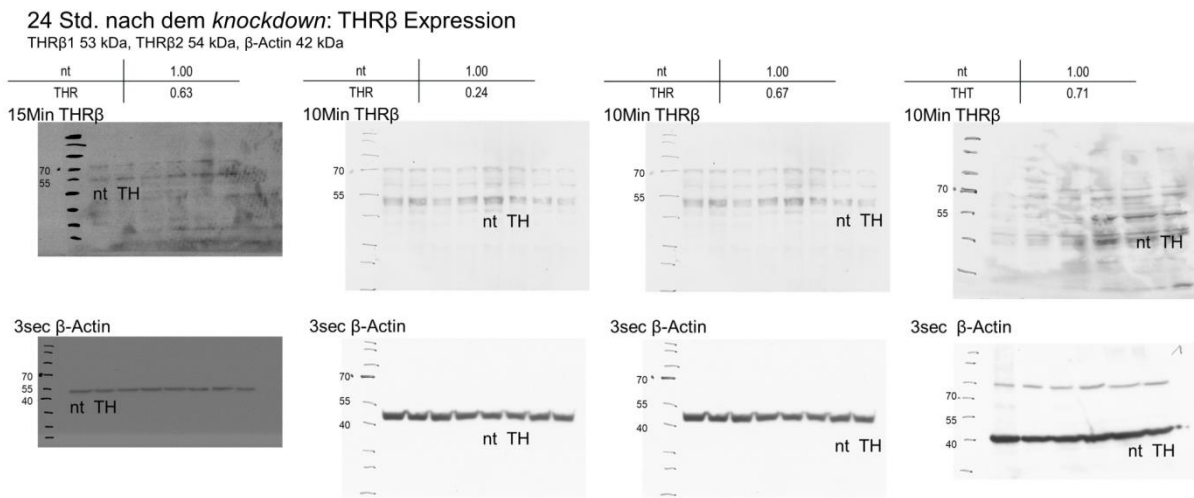


Abbildung 81: *knockdown*-Effizienz von THRB nach 24 Stunden.

48 Std. nach dem *knockdown*: THRa Expression

THRa 55 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

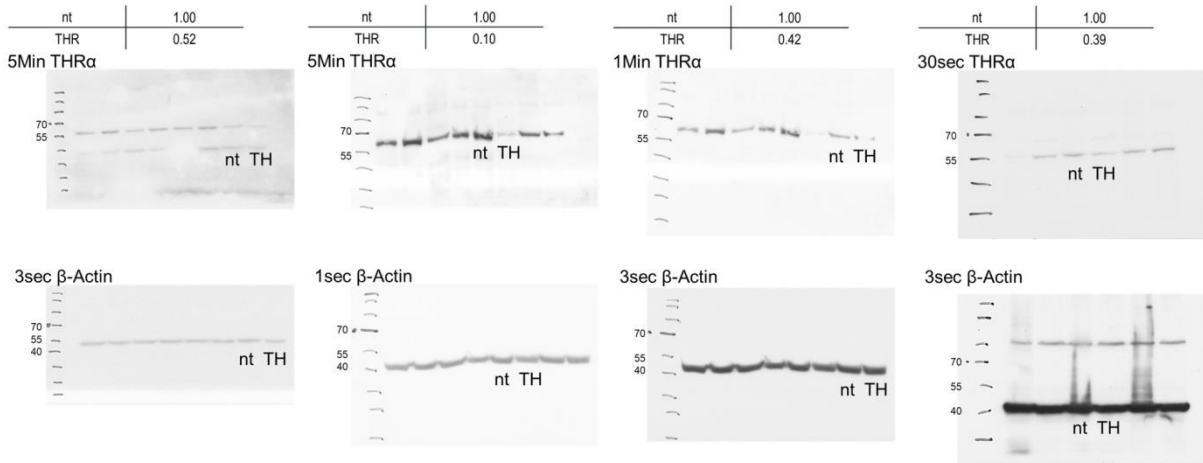


Abbildung 82: *knockdown*-Effizienz von THRa nach 48 Stunden.

48 Std. nach dem *knockdown*: THR $\beta$  Expression

THR $\beta$ 1 53 kDa, THR $\beta$ 2 54 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

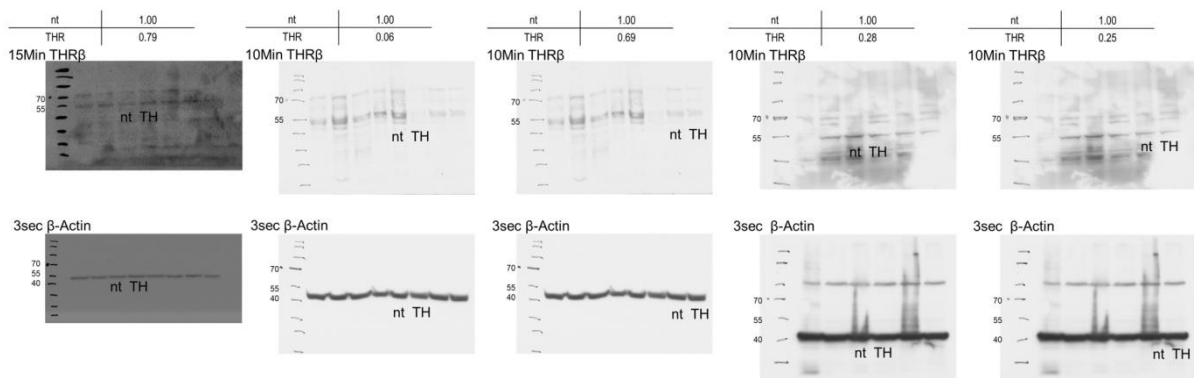


Abbildung 83: *knockdown*-Effizienz von THR $\beta$  nach 48 Stunden.



### 5.2.5.2 CD36-Expression (Protein-Ebene)

24 Std. nach Transfektion mit *non-targeting* siRNA: T4 induzierte CD36 Expression  
 CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

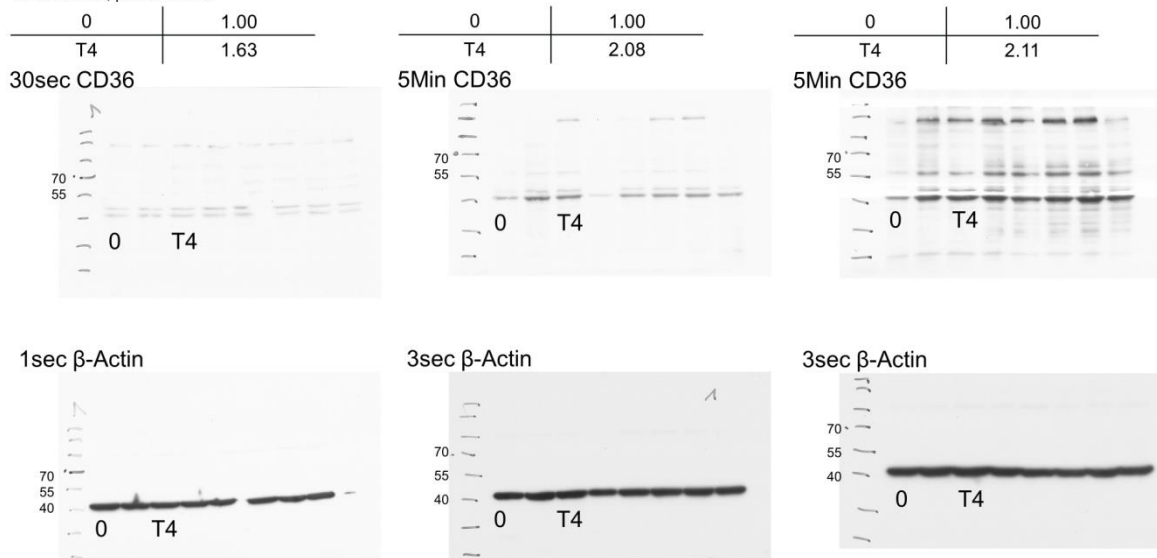


Abbildung 84: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und Transfektion mit *non-targeting* siRNA für 24 Stunden.

24 Std. nach Transfektion mit THR $\alpha$ / $\beta$  siRNA: T4 induzierte CD36 Expression  
 CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

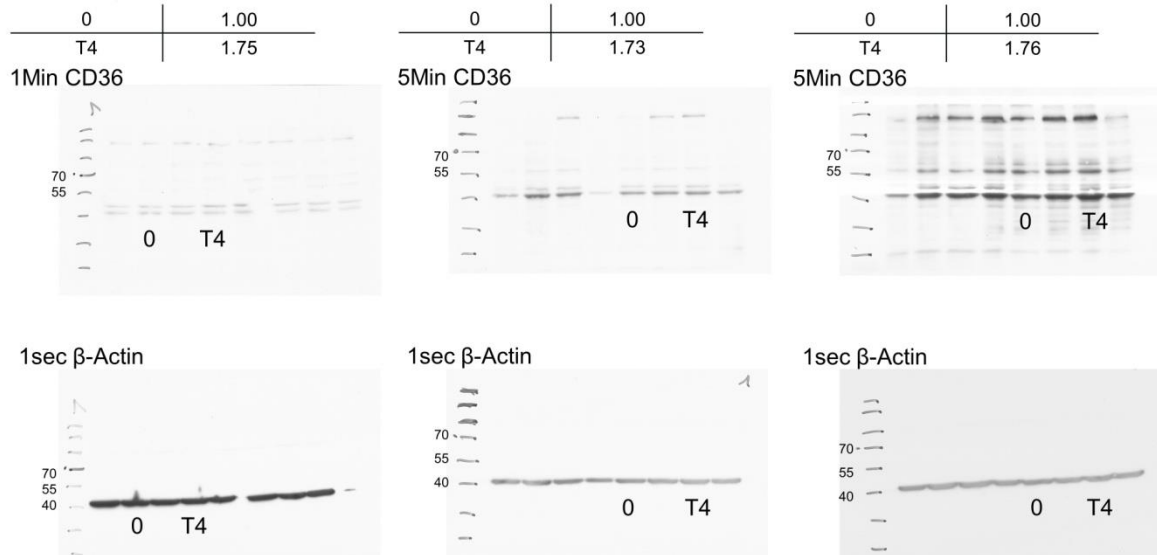


Abbildung 85: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und *knockdown* von THR $\alpha$  und THR $\beta$  für 24 Stunden.

24 Std. nach Transfektion mit *non-targeting* siRNA: TETRAC induzierte CD36 Expression

CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

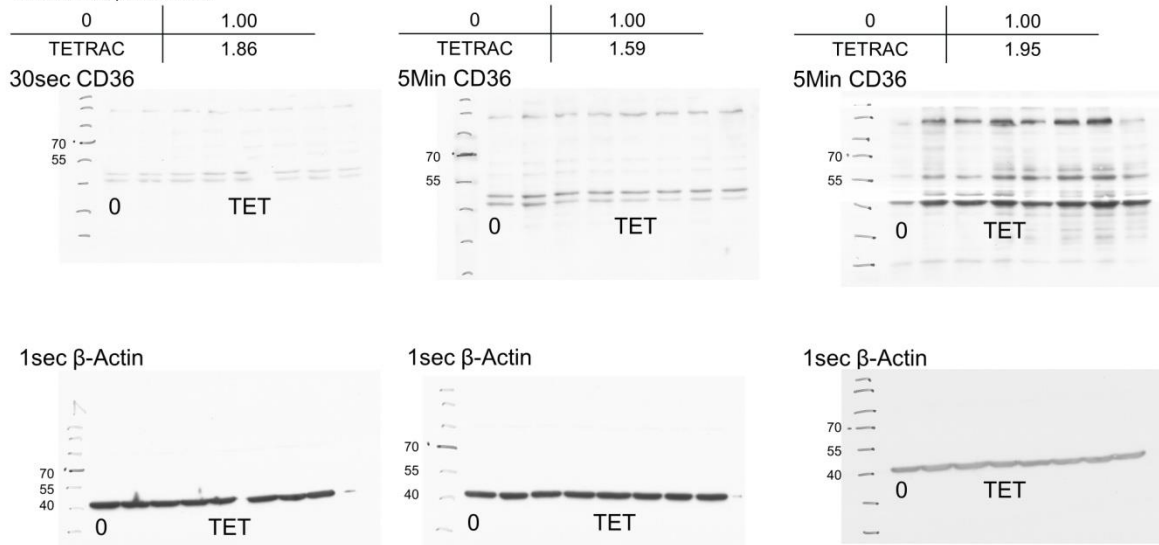


Abbildung 86: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und Transfektion mit *non-targeting* siRNA für 24 Stunden.

24 Std. nach Transfektion mit *THR $\alpha$ / $\beta$*  siRNA: TETRAC induzierte CD36 Expression

CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

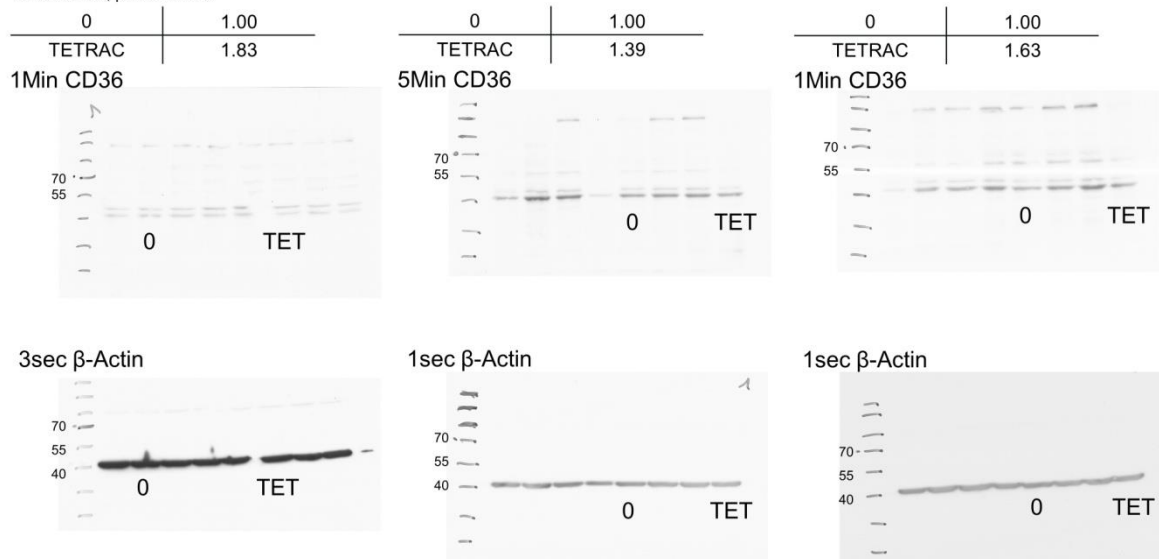


Abbildung 87: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und *knockdown* von *THR $\alpha$*  und *THR $\beta$*  für 24 Stunden.



24 Std. nach Transfektion mit *non-targeting* siRNA: Pioglitazon induzierte CD36 Expression  
 CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

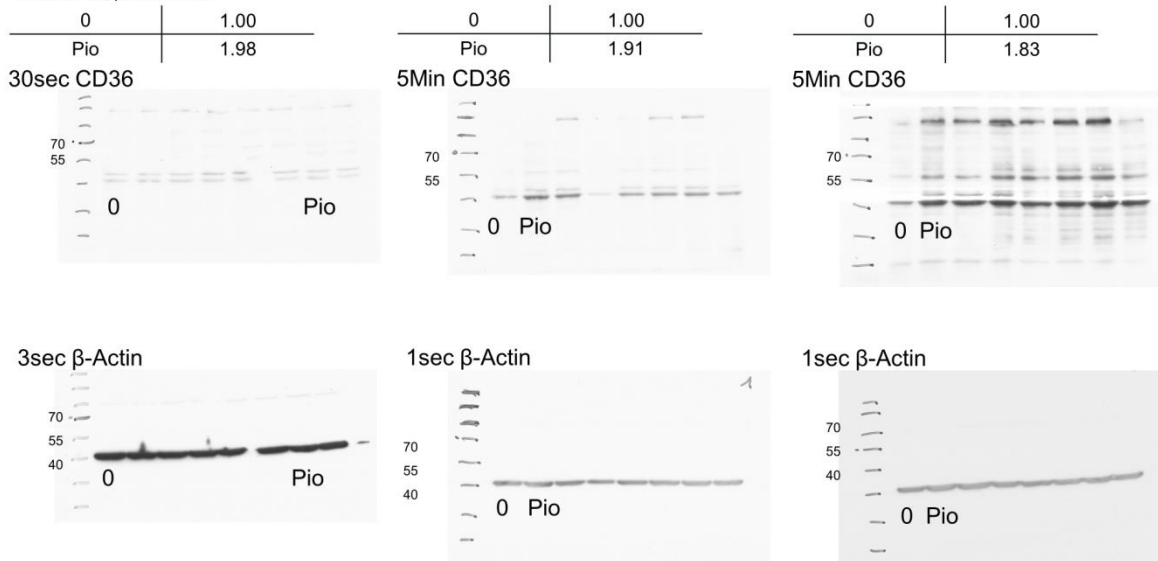


Abbildung 88: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und Transfektion mit *non-targeting* siRNA für 24 Stunden.

24 Std. nach Transfektion mit THR $\alpha$ / $\beta$  siRNA: Pioglitazon induzierte CD36 Expression  
 CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

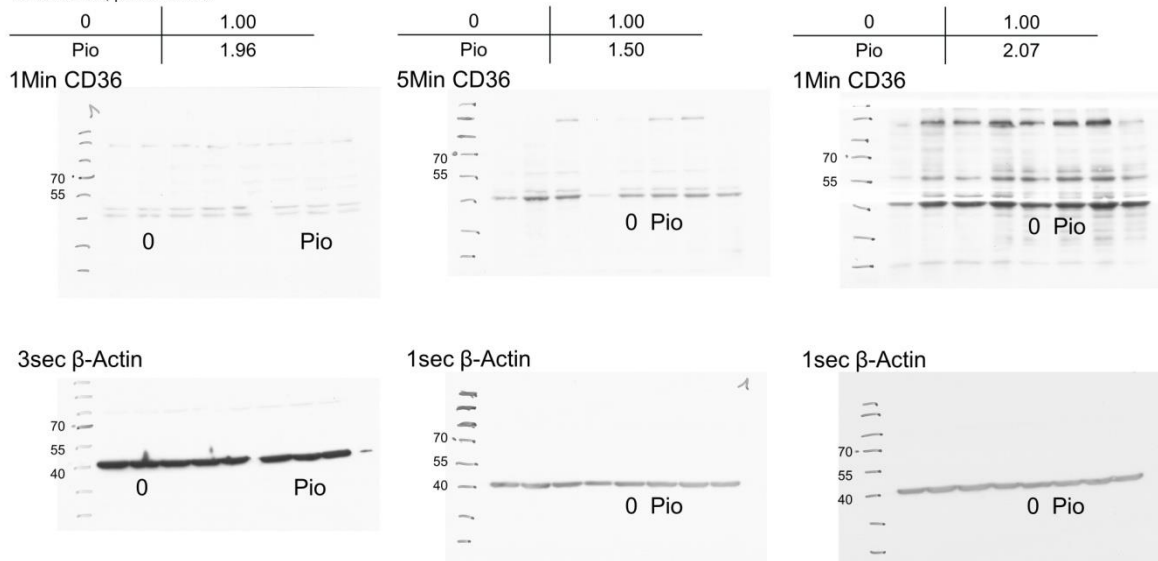


Abbildung 89: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und *knockdown* von THR $\alpha$  und THR $\beta$  für 24 Stunden.

48 Std. nach Transfektion mit *non-targeting* siRNA: T4 induzierte CD36 Expression

CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

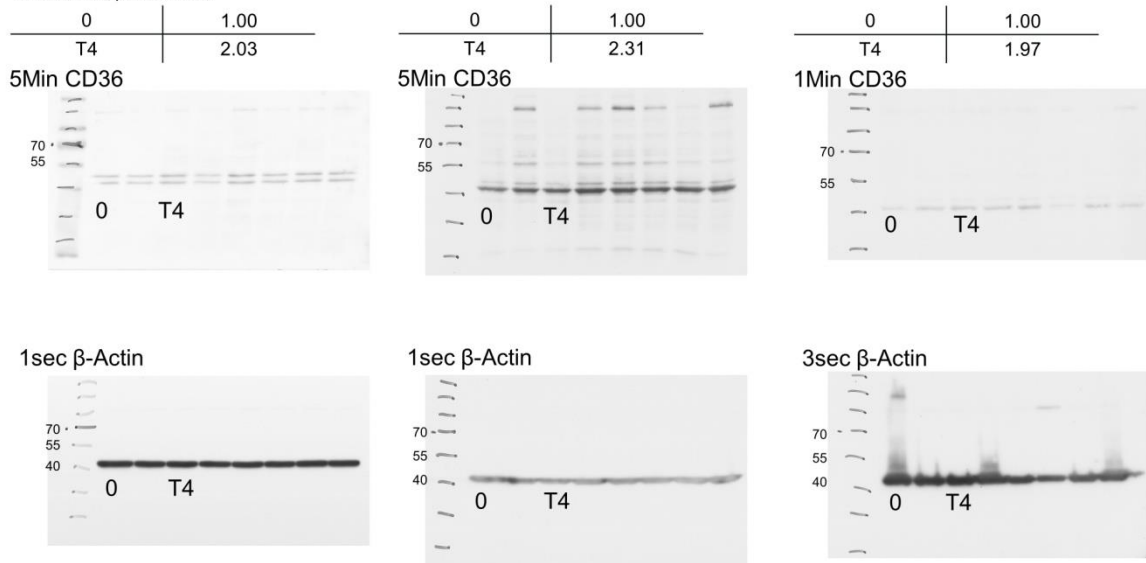


Abbildung 90: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und Transfektion mit *non-targeting* siRNA für 48 Stunden.

48 Std. nach Transfektion mit THR $\alpha$ / $\beta$  siRNA: T4 induzierte CD36 Expression

CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

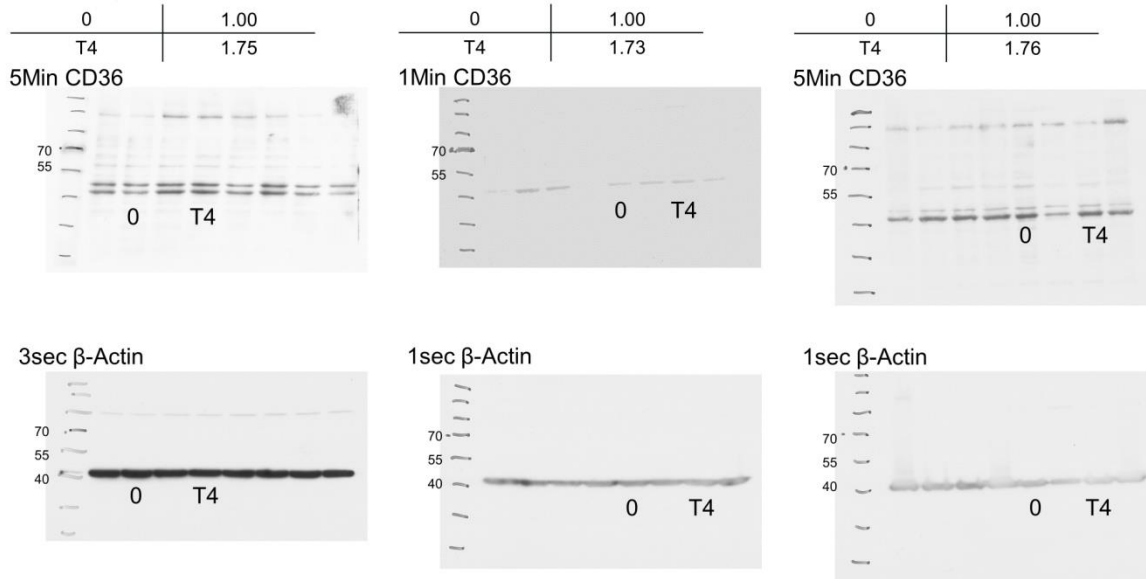


Abbildung 91: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und *knockdown* von THR $\alpha$  und THR $\beta$  für 48 Stunden.

48 Std. nach Transfektion mit *non-targeting* siRNA: TETRAC induzierte CD36 Expression

CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

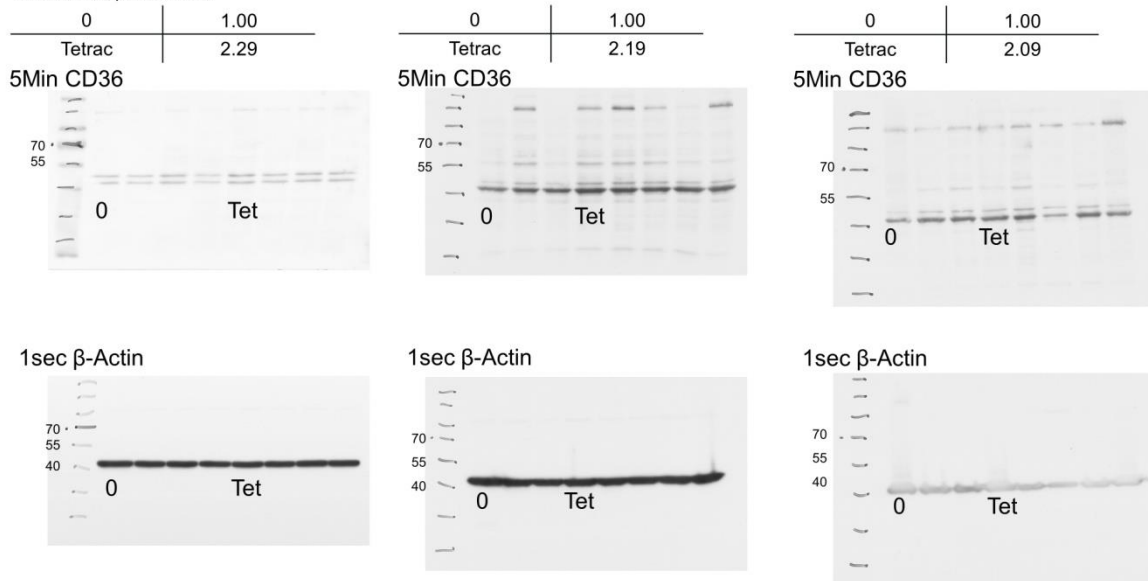


Abbildung 92: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und Transfektion mit *non-targeting* siRNA für 48 Stunden.

48 Std. nach Transfektion mit THR $\alpha$ / $\beta$  siRNA: TETRAC induzierte CD36 Expression

CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa

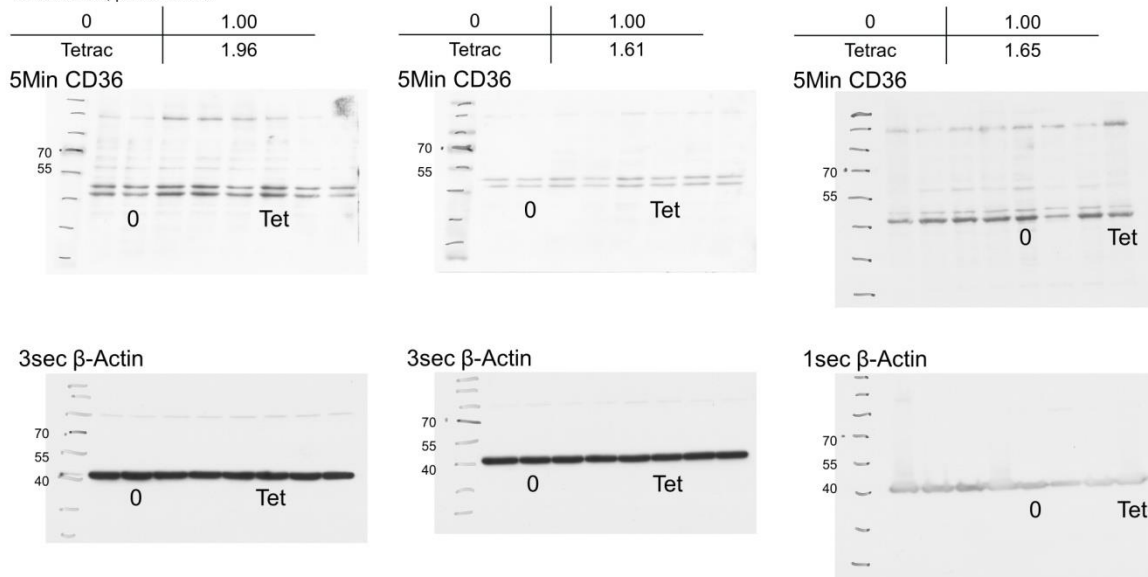
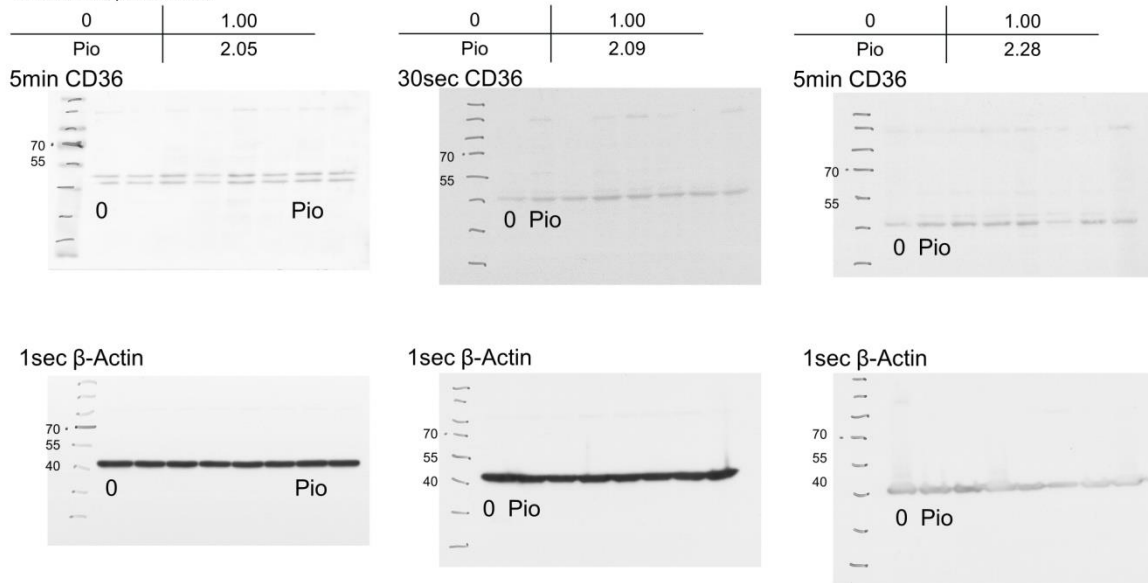


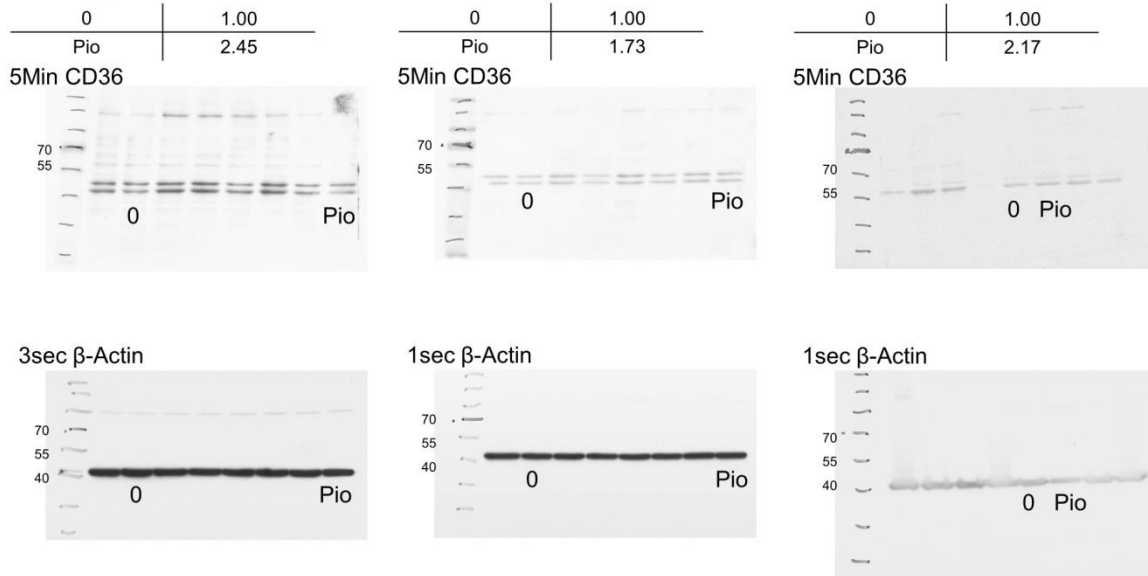
Abbildung 93: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und *knockdown* von THR $\alpha$  und THR $\beta$  für 48 Stunden.

48 Std. nach Transfektion mit *non-targeting* siRNA: Pioglitazon induzierte CD36 Expression  
 CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa



**Abbildung 94: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und Transfektion mit *non-targeting* siRNA für 48 Stunden.**

48 Std. nach Transfektion mit *THR $\alpha$ / $\beta$*  siRNA: Pioglitazon induzierte CD36 Expression  
 CD36 53 kDa,  $\beta$ -Actin 42 kDa



**Abbildung 95: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und knockdown von *THR $\alpha$*  und *THR $\beta$*  für 48 Stunden.**

## 5.2.6 LC-MS/MS Daten

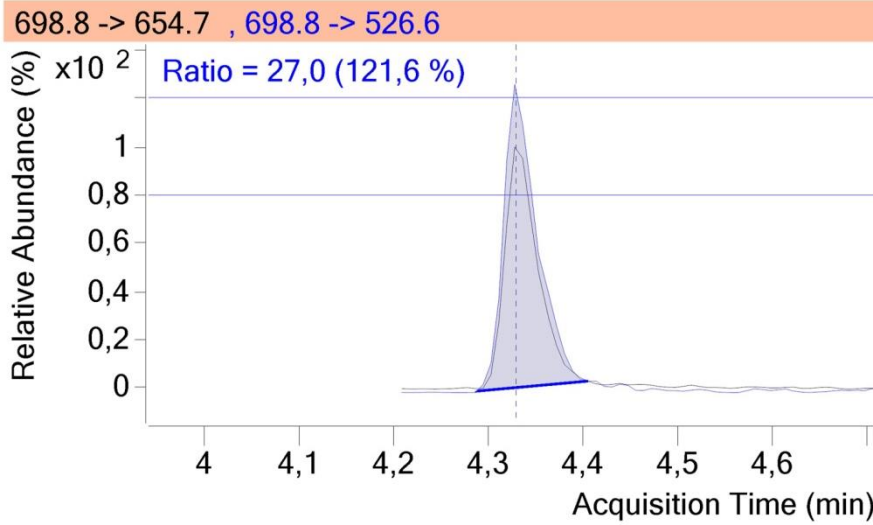


Abbildung 96: HPLC-Analyse und Bestimmung der Retentionszeit von Br-TETRAC (93).

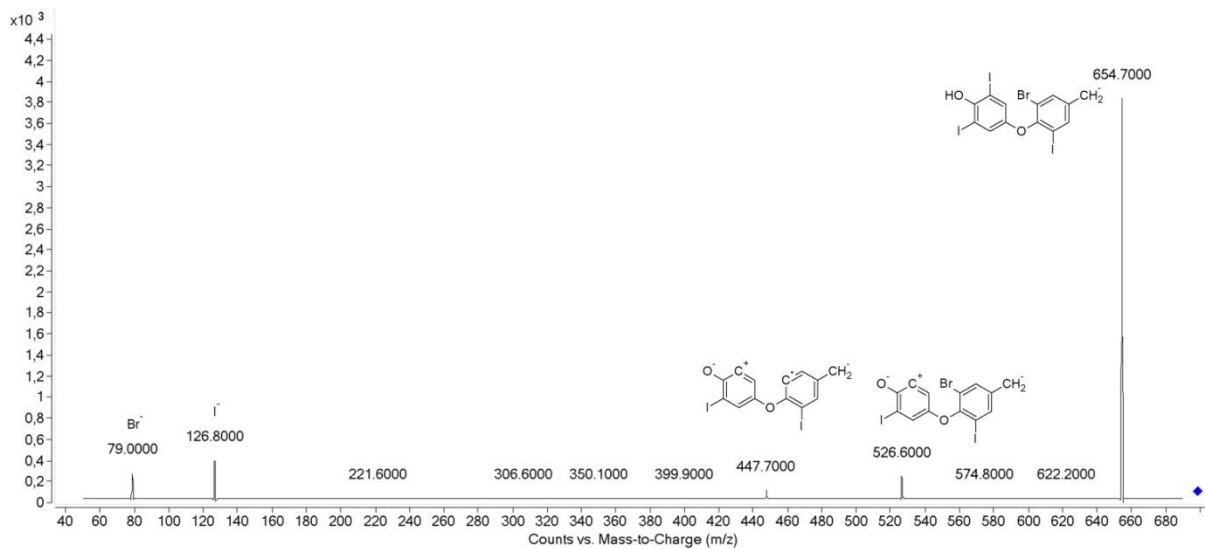


Abbildung 97: Bestimmung der Fragmente von Br-TETRAC (93).

## 6      **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau der nukleären Rezeptoren in Abwesenheit eines Liganden. ....	10
Abbildung 2: Die DBD der nukleären Rezeptoren weist 2 Zinkfinger-Motive und zwei $\alpha$ -Helices auf. .	11
Abbildung 3: Konformationsänderung der Helix 12 nach Ligandenbindung. ....	12
Abbildung 4: Interaktion von Coaktivatoren mit der LBD. ....	12
Abbildung 5: Transkriptionsapparat der THR $\alpha$ s. ....	21
Abbildung 6: Vergleich der Isoformen und deren Splicevarianten. ....	22
Abbildung 7: Vergleich der beiden LBD von THR $\alpha$ und THR $\beta$ . ....	30
Abbildung 8: T3 (2) Interaktion mit der Bindungstasche der THR $\alpha$ s. ....	31
Abbildung 9: Vergleich der Bindung von T3 (2) in der THR $\alpha$ und THR $\beta$ Bindungstasche. ....	32
Abbildung 10: Vergleich der THR $\beta$ -Bindungstasche mit den Liganden T3 (2) und T4 (1). ....	33
Abbildung 11: PPAR $\gamma$ /RXR Heterodimer. ....	41
Abbildung 12: Isoformen und Splicevarianten von PPAR $\gamma$ auf mRNA- und Protein-Ebene. ....	43
Abbildung 13: Struktur der PPAR $\gamma$ LBD. ....	50
Abbildung 14: Pioglitazon (7) Interaktion mit der Ligandenbindungstasche. ....	51
Abbildung 15: Alternative Bindungsseite von PPAR $\gamma$ . Bindung von GW9662 (24) und Pelargonsäure (Nonansäure, 25). ....	53
Abbildung 16: Heterodimere mit RXR. ....	65
Abbildung 17: Vergleich der RXR Subtypen. ....	67
Abbildung 18: LBD von RXR $\alpha$ . ....	74
Abbildung 19: Die Interaktion der 9-cis-Retinsäure (9) mit der Bindungstasche von RXR $\alpha$ . ....	75
Abbildung 20: Interaktion von Partialagonisten mit der RXR $\alpha$ Bindungstasche. ....	76
Abbildung 21: Interaktion von Antagonisten mit der RXR $\alpha$ Bindungstasche. ....	76
Abbildung 22: Vergleich der Isoformen RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ und RXR $\gamma$ . ....	77
Abbildung 23: Biosynthese von Thyroidhormonen. ....	89
Abbildung 24: Negativer Rückkopplungsmechanismus des Thyroidhormon-Systems. ....	91
Abbildung 25: Metabolismus der Thyroidhormone. ....	94
Abbildung 26: LAAO katalysierte oxidative Deaminierung. ....	98
Abbildung 27: Transaminasen katalysierte Bildung einer $\alpha$ -Ketocarbonsäure. ....	98
Abbildung 28: Oxidation von 3-T1AM (89) zu 3-Iodthyroacetat. ....	99
Abbildung 29: Nicht-genomischer Wirkmechanismus der Thyroidhormone. ....	103
Abbildung 30: Sind Thyroidhormone in der Lage auch andere nukleäre Rezeptoren zu modulieren? .....	108
Abbildung 31: <i>heatmap</i> der agonistischen Aktivität verschiedener Thyroidhormone. ....	111
Abbildung 32: PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven der verschiedenen Thyroidhormone und Pioglitazon (7) im Vergleich. ....	112
Abbildung 33: Kontrollversuche zur Verifizierung der PPAR $\gamma$ -Aktivierung im Gal4-Luciferase- Reporter-Gen-Assay. ....	114
Abbildung 34: Schematischer Aufbau eines ITC-Gerätes. ....	115
Abbildung 35: Coaktivator-Rekrutierungs-Assay (agonistischer Modus). ....	120
Abbildung 36: Coaktivator-Rekrutierungs-Assay (antagonistischer Modus). ....	121
Abbildung 37: TETRAC (4) induzierte Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 zur RXR $\alpha$ -LBD. ....	122
Abbildung 38: TETRAC (4) induzierte Coaktivator Rekrutierung von CBP nach Bindung an das PPAR $\gamma$ /tRXR $\alpha$ -Heterodimer. ....	123
Abbildung 39: Vergleich der Rekrutierung der Coaktivatoren CBP und SRC-1 nach der Bindung von TETRAC (4) an die PPAR $\gamma$ und RXR $\alpha$ Monomere und an das PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -Heterodimer. ....	124
Abbildung 40: Das permissive Heterodimer. ....	124
Abbildung 41: Kristallstruktur von TETRAC (4) und PPAR $\gamma$ . ....	126
Abbildung 42: Unpolare Wechselwirkungen von TETRAC (4). ....	127
Abbildung 43: Vergleich der Bindungsmodi von Farglitazar (90), Troglitazon (91) und TETRAC (4). ....	128
Abbildung 44: (a) Interaktion der Carboxyl-Gruppe von TETRAC (4) mit der PPAR $\gamma$ -LBD. ....	129
Abbildung 45: Evaluierung der Adipocyten-Differenzierung. ....	132
Abbildung 46: Quantifizierung von Adiponektin, ANGPTL4, CK20 und CD36 nach siRNA-Interferenz der THR $\alpha$ s. ....	133
Abbildung 47: <i>knockdown</i> -Effizienz auf mRNA-Ebene. ....	135
Abbildung 48: qPCR-Evaluierung der Expression von Adiponektin auf mRNA-Ebene induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1). ....	136
Abbildung 49: qPCR-Evaluierung der Expression von ANGPTL4 auf mRNA-Ebene induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1). ....	137

Abbildung 50: qPCR-Evaluierung der Expression von CK20 auf mRNA-Ebene induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1). .....	138
Abbildung 51: qPCR-Evaluierung der Expression von CD36 auf mRNA-Ebene induziert durch Inkubation mit Pioglitazon (7), TETRAC (4) oder T4 (1). .....	139
Abbildung 52: <i>knockdown</i> -Effizienz auf Protein-Ebene ( <i>Western blot</i> -Analyse) nach 24 und 48 Stunden. ....	140
Abbildung 53: Evaluierung der Expression von CD36 auf Protein-Ebene. ....	141
Abbildung 54: Quantifizierung von Thyroidhormonen in HepG2 Zellen durch LC-MS/MS. ....	143
Abbildung 55: Fragmentierung des internen Standard Br-TETRAC (93). ....	144
Abbildung 56: Aktivität von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93) im Gal4-Luciferase Reportergen Assay. ....	146
Abbildung 57: <i>In vivo</i> Evaluierung der PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Thyroidhormone. ....	147
Abbildung 58: qPCR-Auswertung der Expression von (a) CD36, (b) GLUT-4 und (c) Adiponektin. ..	148
Abbildung 59: Potenzielle physiologische Bedeutung der PPAR $\gamma$ -Aktivierung. ....	150
Abbildung 60: Hypothese zur physiologischen Bedeutung der Thyroidhormon-PPAR $\gamma$ -Interaktion. .	162
Abbildung 61: T4-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	190
Abbildung 62: T3-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	190
Abbildung 63: rT3-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	191
Abbildung 64: TETRAC-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	191
Abbildung 65: TRIAC-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	192
Abbildung 66: Pioglitazon-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	192
Abbildung 67: T4-RXR $\alpha$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	193
Abbildung 68: TETRAC-RXR $\alpha$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	193
Abbildung 69: TRIAC-RXR $\alpha$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	194
Abbildung 70: Br-T4-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	194
Abbildung 71: Br-TETRAC-PPAR $\gamma$ -Dosis-Wirkungskurven. ....	195
Abbildung 72: ITC-Daten der T4-PPAR $\gamma$ -Interaktion. ....	196
Abbildung 73: ITC-Daten der T3-PPAR $\gamma$ -Interaktion. ....	196
Abbildung 74: ITC-Daten der rT3-PPAR $\gamma$ -Interaktion. ....	197
Abbildung 75: ITC-Daten der TETRAC-PPAR $\gamma$ -Interaktion. ....	197
Abbildung 76: ITC-Daten der TRIAC-PPAR $\gamma$ -Interaktion. ....	198
Abbildung 77: ITC-Daten der T4-RXR $\alpha$ -Interaktion. ....	198
Abbildung 78: ITC-Daten der TETRAC-RXR $\alpha$ -Interaktion. ....	199
Abbildung 79: ITC-Daten der TRIAC-RXR $\alpha$ -Interaktion. ....	199
Abbildung 80: <i>knockdown</i> -Effizienz von THR $\alpha$ nach 24 Stunden. ....	201
Abbildung 81: <i>knockdown</i> -Effizienz von THR $\beta$ nach 24 Stunden. ....	201
Abbildung 82: <i>knockdown</i> -Effizienz von THR $\alpha$ nach 48 Stunden. ....	202
Abbildung 83: <i>knockdown</i> -Effizienz von THR $\beta$ nach 48 Stunden. ....	202
Abbildung 84: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und Transfektion mit <i>non-targeting</i> siRNA für 24 Stunden. ....	203
Abbildung 85: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und <i>knockdown</i> von THR $\alpha$ und THR $\beta$ für 24 Stunden. ....	203
Abbildung 86: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und Transfektion mit <i>non-targeting</i> siRNA für 24 Stunden. ....	204
Abbildung 87: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und <i>knockdown</i> von THR $\alpha$ und THR $\beta$ für 24 Stunden. ....	204
Abbildung 88: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und Transfektion mit <i>non-targeting</i> siRNA für 24 Stunden. ....	205
Abbildung 89: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und <i>knockdown</i> von THR $\alpha$ und THR $\beta$ für 24 Stunden. ....	205
Abbildung 90: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und Transfektion mit <i>non-targeting</i> siRNA für 48 Stunden. ....	206
Abbildung 91: CD36-Expression nach T4 (1) Inkubation und <i>knockdown</i> von THR $\alpha$ und THR $\beta$ für 48 Stunden. ....	206
Abbildung 92: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und Transfektion mit <i>non-targeting</i> siRNA für 48 Stunden. ....	207
Abbildung 93: CD36-Expression nach TETRAC (4) Inkubation und <i>knockdown</i> von THR $\alpha$ und THR $\beta$ für 48 Stunden. ....	207
Abbildung 94: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und Transfektion mit <i>non-targeting</i> siRNA für 48 Stunden. ....	208

Abbildung 95: CD36-Expression nach Pioglitazon (7) Inkubation und knockdown von THR $\alpha$ und THR $\beta$ für 48 Stunden. ....	208
Abbildung 96: HPLC-Analyse und Bestimmung der Retentionszeit von Br-TETRAC (93). ....	209
Abbildung 97: Bestimmung der Fragmente von Br-TETRAC (93). ....	209

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der 48 humanen nukleäre Rezeptoren nach Sequenz-Homologie. ....	7
Tabelle 2: Nukleäre Rezeptoren und ihre Response Elemente ....	14
Tabelle 3: Endogene und synthetische Liganden ....	18
Tabelle 4: Physiologische Funktionen der THR $\alpha$ und molekularer Wirkmechanismus. ....	24
Tabelle 5: endogene Liganden der THR $\alpha$ . ....	34
Tabelle 6: synthetische Liganden des THR $\alpha$ . ....	37
Tabelle 7: physiologische Funktionen von PPAR $\gamma$ und molekularer Wirkmechanismus. ....	45
Tabelle 8: endogene Liganden von PPAR $\gamma$ . ....	54
Tabelle 9: synthetische Liganden von PPAR $\gamma$ . ....	56
Tabelle 10: physiologische Funktionen der RXR $\alpha$ und molekularer Wirkmechanismus. ....	68
Tabelle 11: endogene Liganden der RXR $\alpha$ . ....	78
Tabelle 12: natürliche Liganden der RXR $\alpha$ . ....	80
Tabelle 13: synthetische Liganden der RXR $\alpha$ . ....	83
Tabelle 14: Serumkonzentrationen der Thyroidhormone. ....	88
Tabelle 15: Enzyme des Thyroidhormon-Metabolismus ....	101
Tabelle 16: Bestimmung der Bindungs-Aktivität von Thyroidhormonen an einer Auswahl an nukleären Rezeptoren. ....	112
Tabelle 17: Messung der $K_D$ -Werte mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC). ....	116
Tabelle 18: Bindungskonstanten der Interaktion verschiedener Thyroidhormone mit PPAR $\gamma$ . ....	117
Tabelle 19: Bindungskonstanten der Interaktion verschiedener Thyroidhormone mit RXR $\alpha$ . ....	118
Tabelle 20: $EC_{50}$ -Werte der Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 und CBP durch TETRAC (4) und TRIAC (3). ....	120
Tabelle 21: $IC_{50}$ -Werte der Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 und CBP durch TETRAC (4) und TRIAC (3) nach Verdrängung von Rosiglitazon (23). ....	121
Tabelle 22: $EC_{50}$ -Werte der Coaktivator Rekrutierung von SRC-1 durch TETRAC-Bindung an RXR $\alpha$ . ....	122
Tabelle 23: $EC_{50}$ -Werte der Coaktivator Rekrutierung von CBP durch TETRAC- Bindung an das PPAR $\gamma$ /tRXR $\alpha$ -Heterodimer. ....	123
Tabelle 24: <i>knockdown</i> -Effizienz auf mRNA-Ebene nach 24, 48, 72 und 96 Stunden. ....	136
Tabelle 25: zeitabhängige <i>knockdown</i> -Effizienz auf Protein-Ebene. ....	141
Tabelle 26: Quantifizierung von T3 (2), TETRAC (4) und TRIAC (3) nach T4-Inkubation mittels LC-MS/MS und Vergleich mit den $EC_{50}$ -Werten an PPAR $\gamma$ . ....	144
Tabelle 27: Bestimmung der $EC_{50}$ -Werte von Br-T4 (92) und Br-TETRAC (93) mittels Gal4-Luciferase-Reportergeräten Assay. ....	147
Tabelle 28: Expressionsmuster der an der T3- und TETRAC-Bildung beteiligten Enzyme. ....	151
Tabelle 29: Expressionsmuster der THR $\alpha$ und PPAR $\gamma$ ....	151
Tabelle 30: Daten-Sammlung und <i>refinement</i> der Kristallstruktur. ....	200



## 8 Bibliographie

1. Kester, M. H. A. *et al.* Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3117–3128 (2004).
2. Bernal, J. Action of thyroid hormone in brain. *J. Endocrinol. Invest.* **25**, 268–288 (2002).
3. Hulbert, A. J. Thyroid hormones and their effects: A new perspective. *Biol. Rev.* **75**, 519–631 (2000).
4. Mullur, R., Liu, Y.-Y. & Brent, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **94**, 355–382 (2014).
5. Senese, R., Cioffi, F., De Lange, P., Goglia, F. & Lanni, A. Thyroid: Biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. *J. Endocrinol.* **221**, R1–R12 (2014).
6. Chiellinil, G. *et al.* A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem. Biol.* **5**, 299–306 (1998).
7. Scanlan, T. S. *et al.* 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat. Med.* **10**, 638–642 (2004).
8. Schueler, P. A., Schwartz, H. L., Strait, K. A., Mariash, C. N. & Oppenheimer, J. H. Binding of 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and its analogs to the in vitro translational products of c-erbA protooncogenes: Differences in the affinity of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -forms for the acetic acid analog and failure of the human testis and kidney  $\alpha$ -2 products t. *Mol. Endocrinol.* **4**, 227–234 (1990).
9. Moreno, M. *et al.* Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *THYROID* **18**, 239–253 (2008).
10. Bergh, J. J. *et al.* Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* **146**, 2864–2871 (2005).
11. Davis, P. J., Goglia, F. & Leonard, J. L. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 111–121 (2016).
12. Cheng, S. Y., Leonard, J. L. & Davis, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* **31**, 139–170 (2010).
13. Lin, H. *et al.* Actions of L-Thyroxine and Nano-Diamino-Tetrac ( Nanotetrac ) on PD-L1 in cancer cells. *Steroids* **114**, 59–67 (2016).
14. Green, S. *et al.* Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134–139 (1986).
15. Hollenberg, Stanly. M Weinberger, C. *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635–641 (1985).
16. Lazar, M. A. Maturing of the nuclear receptor family. *J. Clin. Invest.* **127**, 1123–1125 (2017).
17. Zhang, Z. *et al.* Genomic analysis of the nuclear receptor family: New insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res.* **14**, 580–590 (2004).
18. Mazaira, G. I. *et al.* The nuclear receptor field: A historical overview and future challenges. *Nucl Recept. Res.* **5**, 1–26 (2018).
19. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* **97**, 161–163 (1999).
20. Gronemeyer, H., Gustafsson, J. Å. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 950–964 (2004).
21. Pratts, W. B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 21455–21458 (1993).
22. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V. Overview of nomenclature of

- nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 685–704 (2006).
23. Umesono, K. & Evans, R. M. Determinants of target gene specificity for steroid /thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139–1146 (1989).
  24. Glass, C. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* **15**, 391–407 (1994).
  25. Gronemeyer, H. & Moras, D. Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature* **375**, 190–191 (1995).
  26. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature* **375**, 377–382 (1995).
  27. Renaud, J.-P. *et al.* Crystal structure of the RAR- $\gamma$  ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**, 681–689 (1995).
  28. Wurtz, J. M. *et al.* A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 206 (1996).
  29. Savkur, R. S. & Burris, T. P. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J. Pept. Res.* **63**, 207–212 (2004).
  30. Nolte, R. T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Nature* **395**, 137–143 (1998).
  31. Huang, P., Chandra, V. & Rastinejad, F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: Insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol.* **72**, 247–272 (2010).
  32. Khorasanizadeh, S. & Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 384–390 (2001).
  33. Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R. M. & Sigler, P. B. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* **375**, 203–211 (1995).
  34. Nelson, C. C. *et al.* Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: Evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* **13**, 2090–2107 (1999).
  35. Yu, V. C. *et al.* RXR $\beta$ : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* **67**, 1251–1266 (1991).
  36. Kliewer, S. A., Kazuhiko, U., Mangelsdorf, D. J. & Evans, R. M. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355**, 446–449 (1992).
  37. Yamada, S. & Kakuta, H. Retinoid X receptor ligands: a patent review (2007 – 2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* **24**, 443–452 (2014).
  38. Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR & the Big Bang. *Cell* **157**, 255–266 (2014).
  39. Shulman, A. I., Larson, C., Mangelsdorf, D. J. & Ranganathan, R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* **116**, 417–429 (2004).
  40. Shulman, A. I. & Mangelsdorf, D. J. Retinoid X Receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **353**, 604–615 (2005).
  41. Dasgupta, S., Lonard, D. M. & O'Malley, B. W. Receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annu. Rev. Med.* **65**, 279–292 (2014).
  42. Hermanson, O., Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. Nuclear receptor coregulators: Multiple modes of modification. *Trends Endocrinol. Metab.* **13**, 55–60 (2002).
  43. Mitsui, A. & Sharp, P. A. Ubiquitination of RNA polymerase II large subunit signaled by phosphorylation of carboxyl-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 6054–6059 (1999).
  44. York, B. & O'Malley, B. W. Steroid Receptor Coactivator (SRC) family: Masters of systems

- biology. *J. Biol. Chem.* **285**, 38743–38750 (2010).
45. Moore, J. T., Collins, J. L. & Pearce, K. H. The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *ChemMedChem* **1**, 504–523 (2006).
  46. Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A. C., Brouwer, A. & van der Burg, B. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol. Sci.* **83**, 136–148 (2005).
  47. Wolf, G. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor? *Nutr. Rev.* **64**, 532–538 (2006).
  48. Davies, S. S. *et al.* Oxidized alkyl phospholipids are specific , high affinity Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  ligands and agonists. *J. Biol. Chem.* **276**, 16015–16023 (2001).
  49. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty Acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318–4323 (1997).
  50. Forman, B. M., Chen, J. & Evans, R. M. Hypolipidemic drugs , polyunsaturated fatty acids , and eicosanoids are ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$  and  $\delta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am. Vol.* **94**, 4312–4317 (1997).
  51. Riggs, B. L. & Hartmann, L. C. Selective estrogen-receptor modulators — Mechanisms of action and application to clinical practice. *N. Engl. J. Med.* **348**, 618–629 (2003).
  52. Reed, M. J. & Kloosterboer, H. J. Tibolone: A selective tissue estrogenic activity regulator (STEAR). *Maturitas* **48**, S4–S6 (2004).
  53. Gellrich, L. & Merk, D. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor modulation in non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Nucl. Recept. Res.* **4**, 1–52 (2017).
  54. Neuschwander-Tetri, B. A. *et al.* Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **385**, 956–965 (2015).
  55. Forrest, D., Erway, L. C., Ng, L., Altschuler, R. & Curran, T. Thyroid hormone receptor  $\beta$  is essential for development of auditory function. *Nat. Genet.* **13**, 354–357 (1996).
  56. Roberts, M. R., Srinivas, M., Forrest, D., Escobar, G. M. de & Reh, T. A. Making the gradient: Thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 6218–6223 (2006).
  57. Forman, B. M., Casanova, J., Raaka, B. M., Ghysdael, J. & Samuels, H. H. Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to DNA response elements as monomers, homodimers, or heterodimers. *Mol. Endocrinol.* **6**, 429–442 (1992).
  58. Baniahmad, A., Steiner, C., Köhne, A. C. & Renkawitz, R. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* **61**, 505–514 (1990).
  59. Glass, C. K., Holloway, J. M., Devary, O. V. & Rosenfeld, M. G. The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell* **54**, 313–323 (1988).
  60. Dong, H. *et al.* Hepatic gene expression changes in hypothyroid juvenile mice: Characterization of a novel negative thyroid-responsive element. *Endocrinology* **148**, 3932–3940 (2007).
  61. Shibusawa, N., Hollenberg, A. N. & Wondisford, F. E. Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J. Biol. Chem.* **278**, 732–738 (2003).
  62. Chen, J. D. & Evans, R. M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454–457 (1995).

63. Hörlein, A. J. *et al.* Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397–403 (1995).
64. Zamir, I. *et al.* A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5458–5465 (1996).
65. Takeshita, A. *et al.* Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* **137**, 3594–3597 (1996).
66. Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. & Gronemeyer, H. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 3667–3675 (1996).
67. Cavaillès, V. *et al.* Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* **14**, 3741–3751 (1995).
68. Wong, J., Shi, Y. B. & Wolffe, A. P. A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR $\beta$ A gene by the thyroid hormone receptor. *Genes Dev.* **9**, 2696–2711 (1995).
69. Braverman, L. E. & Cooper, D. S. *Werner & Ingbar's the thyroid: A fundamental and clinical text.* (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
70. Yen, P. M. *et al.* Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol. Cell. Endocrinol.* **246**, 121–127 (2006).
71. Zhang, J. & Lazar, M. A. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 439–466 (2000).
72. Yen, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* **81**, 1097–1142 (2001).
73. Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S. & Chin, W. W. Identification of a rat c-erbA $\alpha$ -related protein which binds deoxyribonucleic acid but does not bind thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* **2**, 893–901 (1988).
74. Koenig, R. J. *et al.* Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* **337**, 659–661 (1989).
75. Lazar, M. A., Hodin, R. A. & Chin, W. W. Human carboxyl-terminal variant of alpha-type c-erbA inhibits trans-activation by thyroid hormone receptors without binding thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 7771–7774 (1989).
76. Yin, L. *et al.* Rev-erba, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science (80- )*. **318**, 1786–1789 (2007).
77. Yin, L., Wu, N. & Lazar, M. A. Nuclear receptor Rev-erba: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* **8**, 1–6 (2010).
78. Ribeiro, M. O. *et al.* Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor- $\beta$  isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology* **151**, 432–440 (2010).
79. Ng, L. *et al.* Suppression of the deafness and thyroid dysfunction in *Thrb*-null mice by an independent mutation in the *Thra* thyroid hormone receptor  $\alpha$  gene. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2701–2708 (2001).
80. Bradley, D. J., Towle, H. C. & Young, W. S.  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: Evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 439–443 (1994).
81. Bradley, D. J., Towle, H. C. & Young, W. S. Spatial and temporal expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thyroid hormone receptor mRNAs, including the  $\beta$ 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* **12**, 2288–2302 (1992).
82. Hodin, R. A., Lazar, M. A. & Chin, W. W. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *Am. Soc. Clin. Investig.* **85**,

- 101–105 (1990).
83. Cook, C. B., Kakucska, I., Lechan, R. M. & Koenig, R. J. Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology* **130**, 1077–1079 (1992).
  84. Yen, P. M., Sunday, M. E., Darling, D. S. & Chin, W. W. Isoform-specific thyroid hormone receptor antibodies detect multiple thyroid hormone receptors in rat and human pituitaries. *Endocrinology* **130**, 1539–1546 (1992).
  85. Bernal, J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 249–259 (2007).
  86. Amma, L. L., Campos-Barros, A., Wang, Z., Vennström, B. & Forrest, D. Distinct tissue-specific roles for thyroid hormone receptors  $\beta$  and  $\alpha 1$  in regulation of type 1 deiodinase expression. *Mol. Endocrinol.* **15**, 467–475 (2001).
  87. Lee, L. R., Mortensen, R. M., Larson, C. A. & Brent, G. A. Thyroid hormone receptor- $\alpha$  inhibits retinoic acid-responsive gene expression and modulates retinoic acid-stimulated neural differentiation in mouse embryonic stem cells. *Mol. Endocrinol.* **8**, 746–756 (1994).
  88. Wang, X., Matsuda, H. & Shi, Y. B. Developmental regulation and function of thyroid hormone receptors and 9-cis retinoic acid receptors during *Xenopus tropicalis* metamorphosis. *Endocrinology* **149**, 5610–5618 (2008).
  89. Morte, B. *et al.* Thyroid hormone regulation of gene expression in the developing rat fetal cerebral cortex: Prominent role of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV pathway. *Endocrinology* **151**, 810–820 (2010).
  90. Manzano, J., Cuadrado, M., Morte, B. & Bernal, J. Influence of thyroid hormone and thyroid hormone receptors in the generation of cerebellar  $\gamma$ -aminobutyric acid-ergic interneurons from precursor cells. *Endocrinology* **148**, 5746–5751 (2007).
  91. Mittag, J. *et al.* Thyroid hormone is required for hypothalamic neurons regulating cardiovascular functions. *J. Clin. Invest.* **123**, 509–516 (2013).
  92. Wikström, L. *et al.* Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor  $\alpha 1$ . *EMBO J.* **17**, 455–461 (1998).
  93. Fraichard, A. *et al.* The T3R $\alpha$  gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J.* **16**, 4412–4420 (1997).
  94. Gauthier, K. *et al.* Different functions for the thyroid hormone receptors TR $\alpha$  and TR $\beta$  in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.* **18**, 623–631 (1999).
  95. Forrest, D., Hallböök, F., Persson, H. & Vennström, B. Distinct functions for thyroid hormone receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in brain development indicated by differential expression of receptor genes. *EMBO J.* **10**, 269–275 (1991).
  96. Sun, G. & Shi, Y. B. Thyroid hormone regulation of adult intestinal stem cell development: Mechanisms and evolutionary conservations. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 1217–1224 (2012).
  97. Freake, H., Schwartz, H. & Oppenheimer, J. The regulation of lipogenesis by thyroid hormone and its contribution to thermogenesis. *Endocrinology* **125**, 2868–2874 (1989).
  98. Haber, R. & Loeb, J. Stimulation of potassium efflux in rat liver by a low dose of thyroid hormone: evidence for enhanced cation permeability in the absence of Na,K-ATPase induction. *Endocrinology* **118**, 207–211 (1986).
  99. Silva, J. E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **86**, 435–464 (2006).
  100. Clausen, T., Van Hardeveld, C. & Everts, M. E. Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis. *Physiol. Rev.* **71**, 733–774 (1991).
  101. Edelman, I. & Ismail-Beigi, F. Thyroid thermogenesis and active sodium transport. *Recent Prog Horm Res.* **30**, 235–257 (1974).

102. Ismail-Beigi, F. Regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase expression by thyroid hormone. *Semin Nephrol.* **12**, 44–48 (1992).
103. Jiang, M., Xu, A., Tokmakejian, S. & Narayanan, N. Thyroid hormone-induced overexpression of functional ryanodine receptors in the rabbit heart. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **278**, H1429–H1438 (2000).
104. Simonides, W. S. *et al.* Characterization of the promoter of the rat sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1 gene and analysis of thyroid hormone responsiveness. *J. Biol. Chem.* **271**, 32048–32056 (1996).
105. Simonides, W. S., Thelen, M. H., van der Linden, C. G., Muller, A. & van Hardeveld, C. Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: Implications for thermogenesis. *Biosci. Rep.* **21**, 139–154 (2001).
106. Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C. & Ravussin, E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J. Clin. Invest.* **86**, 1423–1427 (1990).
107. Hafner, R., Nobes, C., McGown, A. & Brand, M. Altered relationship between protonmotive force and respiration rate in non-phosphorylating liver mitochondria isolated from rats of different thyroid hormone status. *Eur. J. Biochem.* **178**, 511–518 (1988).
108. Ribeiro, M. O. *et al.* Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *J. Clin. Invest.* **108**, 97–105 (2001).
109. Bianco, A. C., Sheng, X. & Silva, J. E. Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **263**, 18168–18175 (1988).
110. Lopez, D., Abisambra Socarrás, J. F., Bedi, M. & Ness, G. C. Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta.* **1771**, 1216–1225 (2007).
111. Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A. & Brown, M. S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35–46 (2006).
112. Goldberg, I. J. *et al.* Thyroid hormone reduces cholesterol via a non-LDL receptor-mediated pathway. *Endocrinology* **153**, 5143–5149 (2012).
113. Tamehiro, N. *et al.* Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: Mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status. *J. Biol. Chem.* **282**, 21090–21099 (2007).
114. Huuskonen, J., Vishnu, M., Pullinger, C., Fielding, P. & Fielding, C. Regulation of ATP-binding cassette transporter A1 transcription by thyroid hormone receptor. *Biochemistry* **43**, 1626–1632 (2004).
115. Siljevik Ellis, E. C. Suppression of bile acid synthesis by thyroid hormone in primary human hepatocytes. *World J. Gastroenterol.* **12**, 4640–4645 (2006).
116. Chiang, J. Y. L. Bile acids: Regulation of synthesis. *J. Lipid Res.* **50**, 1955–1966 (2009).
117. Lee, J.-Y. *et al.* Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *Am. J. Physiol. Physiol.* **302**, C463–C472 (2011).
118. Huang, C. & Freake, H. C. Thyroid hormone regulates the Acetyl-CoA carboxylase PI promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 704–708 (1998).
119. Obregon, M. J. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front. Physiol.* **5**, 1–12 (2014).
120. Singh, S. & Snyder, A. Effect of thyrotoxicosis on gluconeogenesis from alanine in the perfused rat liver. *Endocrinology* **102**, 182–187 (1978).
121. Park, E. A., Song, S., Vinson, C. & Roesler, W. J. Role of CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  in the thyroid hormone and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* **274**, 211–217 (1999).
122. Weinstein, S., Watts, J. & Haber, R. Thyroid hormone increases muscle/fat glucose transporter

- gene expression in rat skeletal muscle. *Endocrinology* **129**, 455–464 (1991).
123. Aguayo-Mazzucato, C. *et al.* Thyroid hormone promotes postnatal rat pancreatic  $\beta$ -cell development and glucose-responsive insulin secretion through MAFA. *Diabetes* **62**, 1569–1580 (2013).
  124. Yen, P. M. *et al.* Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep.* **4**, 581–587 (2003).
  125. Chan, I. H. & Privalsky, M. L. Isoform-specific transcriptional activity of overlapping target genes that respond to thyroid hormone receptors  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 1. *Mol Endocrinol* **23**, 1758–1775 (2009).
  126. Zimmermann, M. B. Iodine deficiency. *Endocr. Rev.* **30**, 376–408 (2009).
  127. Zimmermann, M. B. Iodine deficiency in pregnancy and the effects of maternal iodine supplementation on the offspring: A review. *Am J Clin Nutr* **89**, 668S-672S (2009).
  128. Gilbert, M. E., Rovet, J., Chen, Z. & Koibuchi, N. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* **33**, 842–852 (2012).
  129. Basraon, S. & Costantine, M. Mood disorders in pregnant women with thyroid dysfunction. *Clin Obs. Gynecol.* **54**, 506–514 (2011).
  130. Howland, R. H. Use of endocrine hormones for treating depression. *J Psychosoc Nurs Ment Heal. Serv.* **48**, 13–16 (2010).
  131. Forrest, D. *et al.* Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: Evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J.* **15**, 3006–3015 (1996).
  132. Williams, G. R. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 784–794 (2008).
  133. Bernal, J. Thyroid hormones and brain development. *Vitam. Horm.* **71**, 95–122 (2005).
  134. Zhu, X. & Cheng, S. New insights into regulation of lipid metabolism by thyroid hormone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* **17**, 408–413 (2010).
  135. Liu, Y. Y. & Brent, G. A. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 166–173 (2010).
  136. Danforth, E. & Burger, A. The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. *Clin. Endocrinol. Metab.* **13**, 581–595 (1984).
  137. Silva, J. E. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med.* **139**, 205–213 (2003).
  138. Kim, B. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* **18**, 141–144 (2008).
  139. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
  140. Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517 (2009).
  141. van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500–1508 (2009).
  142. Silva, J. E. & Rabelo, R. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur. J. Endocrinol.* **136**, 251–264 (1997).
  143. Flandin, P. *et al.* Uncoupling protein-3 as a molecular determinant of the action of 3,5,3'-triiodothyronine on energy metabolism. *Endocrine* **36**, 246–254 (2009).

144. Sinha, R. A., Singh, B. K. & Yen, P. M. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nat Rev Endocrinol* **14**, 259–269 (2018).
145. Webb, P. Thyroid hormone receptor and lipid regulation. *Curr Opin Investig Drugs* **11**, 1135–1142 (2010).
146. Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Lane, J. T. & Thompson, M. P. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* **87**, 125–132 (1991).
147. Wagner, R. L. *et al.* A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**, 690–697 (1995).
148. Wagner, R. L. *et al.* Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* **15**, 398–410 (2001).
149. Sandler, B. *et al.* Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. *J. Biol. Chem.* **279**, 55801–55808 (2004).
150. Martinez, L. *et al.* Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 20717–20722 (2009).
151. Schriks, M., Roessig, J. M., Murk, A. J. & Furlow, J. D. Thyroid hormone receptor isoform selectivity of thyroid hormone disrupting compounds quantified with an in vitro reporter gene assay. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **23**, 302–307 (2007).
152. Schroeder, A., Jimenez, R., Young, B. & Privalsky, M. L. The ability of thyroid hormone receptors to sense T4 as an agonist depends on receptor isoform and on cellular cofactors. *Mol. Endocrinol.* **28**, 745–757 (2014).
153. Koury, E. J. *et al.* Characterization of ligands for thyroid receptor subtypes and their interactions with co-regulators. *Steroids* **74**, 270–276 (2009).
154. Shiizaki, K., Asai, S., Ebata, S., Kawanishi, M. & Yagi, T. Establishment of yeast reporter assay systems to detect ligands of thyroid hormone receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Toxicol. Vitro.* **24**, 638–644 (2010).
155. Mendoza, A. *et al.* 3,5-T2 is an alternative ligand for the thyroid hormone receptor  $\beta$ 1. *Endocrinology* **154**, 2948–2958 (2013).
156. Pitt-Rivers, R. Physiological activity of the acetic-acid analogues of some iodinated thyronines. *Lancet* **265**, 234–235 (1953).
157. Roche, J., Michel, R., Jouan, P. & Wolf, W. Sur la présence de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique dans le rein de rats après administration de 3,5,3'-L-triiodothyronine. *C R Hebd Seances Acad Sci.* **241**, 1880–1882 (1955).
158. Roche, J., Michel, R., Jouan, P. & Wolf, W. The recovery of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid and 3,3'-diiodothyronine from rat kidney after injection of 3,5,3'-triiodothyronine. *Endocrinology* **59**, 425–432 (1956).
159. Brent, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* **122**, 3035–3043 (2012).
160. Goglia, F. The effects of 3,5-diiodothyronine on energy balance. *Front. Physiol.* **5**, 1–4 (2015).
161. Lombardi, A. *et al.* 3,5-Diiodo-L-Thyronine activates brown adipose tissue thermogenesis in hypothyroid rats. *PLoS One* **10**, 1–22 (2015).
162. Persani, L. Central hypothyroidism: Pathogenic, diagnostic and therapeutic challenges. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, 3068–3078 (2012).
163. Gupta, V. & Lee, M. Central hypothyroidism. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **15**, S99–S106 (2011).
164. Chaker, L., Bianco, A. C., Jonklaas, J. & Peeters, R. P. Hypothyroidism. *Lancet* **390**, 1550–1562 (2017).
165. Radetti, G. *et al.* Clinical and hormonal outcome after two years of triiodothyroacetic acid



- treatment in a child with thyroid hormone resistance. *THYROID* **7**, 775–778 (1997).
166. Kunitake, J. M. *et al.* 3, 5, 3'-Triiodothyroacetic acid therapy for thyroid hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **69**, 461–466 (1989).
  167. Lerman, J. The activity of dl-Tribromthyronine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **16**, 1395–1397 (1956).
  168. Anzai, R. *et al.* Long-term 3,5,3'-triiodothyroacetic acid therapy in a child with hyperthyroidism caused by thyroid hormone resistance: Pharmacological study and therapeutic recommendations. *THYROID* **22**, 1069–1075 (2012).
  169. Pittman, C. S., Shimizu, T., Burger, A. & Chambers, J. B. The nondeiodinative pathways of thyroxine metabolism: 3, 5, 3', 5'-tetraiodothyroacetic acid turnover in normal and fasting human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **50**, 712–716 (1980).
  170. Moreno, M., Kaptein, E., Goglia, F. & Visser, T. J. Rapid glucuronidation of tri- and tetraiodothyroacetic acid to ester glucuronides in human liver and to ether glucuronides in rat liver. *Endocrinology* **135**, 1004–1009 (1994).
  171. Leo, S. De, Lee, S. Y. & Braverman, L. E. Hyperthyroidism. *Lancet* **388**, 906–918 (2016).
  172. Vatner, D. F. *et al.* Thyroid hormone receptor- $\beta$  agonists prevent hepatic steatosis in fat-fed rats but impair insulin sensitivity via discrete pathways. *Am. J. Physiol. Metab.* **305**, E89–E100 (2013).
  173. Furlow, J. D. *et al.* Induction of larval tissue resorption in xenopus laevis tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 26555–26562 (2004).
  174. Borngraeber, S. *et al.* Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15358–15363 (2003).
  175. Shiohara, H. *et al.* Discovery of novel indane derivatives as liver-selective thyroid hormone receptor  $\beta$  (TR $\beta$ ) agonists for the treatment of dyslipidemia. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 3622–3634 (2012).
  176. Cable, E. E. *et al.* Reduction of hepatic steatosis in rats and mice after treatment with a liver-targeted thyroid hormone receptor agonist. *Hepatology* **49**, 407–417 (2009).
  177. Boyer, S. H. *et al.* Synthesis and biological evaluation of a series of liver-selective phosphonic acid thyroid hormone receptor agonists and their prodrugs. *J. Med. Chem.* **51**, 7075–7093 (2008).
  178. Kelly, M. J. *et al.* Discovery of 2-[3,5-dichloro-4-(5-isopropyl-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yl)oxy]phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro[1,2,4]triazine-6-carbonitrile (MGL-3196), a highly selective thyroid hormone receptor  $\beta$  agonist in clinical trials for the treatment of dy. *J. Med. Chem.* **57**, 3912–3923 (2014).
  179. Goldman, S. *et al.* DITPA (3,5-diiodothyropropionic acid), a thyroid hormone analog to treat heart failure: Phase II trial veterans affairs cooperative study. *Circulation* **119**, 3093–3100 (2009).
  180. Pennock, G. D., Raya, T. E., Bahl, J. J., Goldman, S. & Morkin, E. Cardiac effects of 3,5-diiodothyropropionic acid, a thyroid hormone analog with inotropic selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 163–169 (1992).
  181. Lim, W., Nguyen, N. H., Yang, H. Y., Scanlan, T. S. & David Furlow, J. A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**, 35664–35670 (2002).
  182. Freitas, F. R. S. *et al.* Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR $\beta$ -selective compound GC-1. *Am. J. Physiol. Metab.* **285**, E1135–E1141 (2003).
  183. Ladenson, P. *et al.* Use of thyroid hormone analogue eprotirome in statin-treated dyslipidemia. *N. Engl. J. Med.* **362**, 906–916 (2010).
  184. Chiellini, G. *et al.* A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone

- receptor. *Chem. Biol.* **5**, 299–306 (1998).
185. Wagner, R. L. *et al.* Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* **15**, 398–410 (2001).
  186. S Scanlan, M Hartley, AT Placzek, M. R. Use of sobetirome in the treatment of x-linked adrenoleukodystrophy. *World Intell Prop Org* (2014).
  187. Devereaux, J., Ferrara, S. J. & Scanlan, T. S. Quantification of thyromimetic sobetirome concentration in biological tissue samples. *Methods Mol Biol.* **1801**, 193–206 (2018).
  188. Ye, L. *et al.* Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor  $\beta 1$ . *J. Med. Chem.* **46**, 1580–1588 (2003).
  189. Angelin, B. *et al.* Reductions in serum levels of LDL cholesterol, apolipoprotein B, triglycerides and lipoprotein(a) in hypercholesterolaemic patients treated with the liver-selective thyroid hormone receptor agonist eprotirome. *J. Intern. Med.* **277**, 331–342 (2015).
  190. Berkenstam, A. *et al.* The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 663–667 (2008).
  191. Sweetlove, M. Phase III trial of eprotirome: Discontinued for safety concerns. *Pharmaceut. Med.* **26**, 185–187 (2012).
  192. Erion, M. D. *et al.* Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15490–15495 (2007).
  193. Meruvu, S., Ayers, S. D., Winnier, G. & Webb, P. Thyroid hormone analogues: Where do we stand in 2013? *THYROID* **23**, 1333–1344 (2013).
  194. Grover, G. J. *et al.* Pharmacological profile of the thyroid hormone receptor antagonist NH3 in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **322**, 385–390 (2007).
  195. Carlsson, B. *et al.* Synthesis and preliminary characterization of a novel antiarrhythmic compound (KB130015) with an improved toxicity profile compared with amiodarone. *J Med Chem.* **45**, 623–630 (2002).
  196. de Duve, C. Evolution of the peroxisome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **168**, 369–381 (1969).
  197. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645–650 (1990).
  198. Brown, J. D. & Plutzky, J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation* **115**, 518–533 (2007).
  199. Vamecq, J. & Latruffe, N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* **354**, 141–148 (1999).
  200. Dreyer, C. *et al.* Positive regulation of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol. Cell* **77**, 67–76 (1993).
  201. Coll, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\beta/\delta$ : A new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2**, 46–55 (2009).
  202. Wagner, K. D. & Wagner, N. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR beta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol. Ther.* **125**, 423–435 (2010).
  203. Salvadó, L. *et al.* PPAR  $\beta/\delta$  prevents endoplasmic reticulum stress-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia* **57**, 2126–2135 (2014).
  204. Salvadó, L., Serrano-Marco, L., Barroso, E., Palomer, X. & Vázquez-Carrera, M. Targeting

- PPAR $\beta/\delta$  for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Ther Targets* **16**, 209–223 (2012).
205. Shimaya, A. *et al.* YM268 increases the glucose uptake, cell differentiation, and mRNA expression of glucose transporter in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* **30**, 543–548 (1998).
  206. Berger, J. P., Akiyama, T. E. & Meinke, P. T. PPARs: Therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 244–251 (2005).
  207. Evans, R. M. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **10**, 1–7 (2004).
  208. Nolan, J. J., Ludvik, B., Beerdsen, P., Joyce, M. & Olefsky, J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1188–1193 (1994).
  209. Fujita, T. *et al.* Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes* **32**, 804–810 (1983).
  210. Harris, P. K. & Kletzien, R. F. Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol. Pharmacol.* **45**, 439–445 (1993).
  211. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 12953–12956 (1995).
  212. Feige, J. N. *et al.* Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J. Biol. Chem.* **280**, 17880–17890 (2005).
  213. Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. & Evans, R. M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**, 771–774 (1992).
  214. Keller, H. *et al.* Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 2160–2164 (1993).
  215. Gearing, K. L., Gottlicher, M., Teboul, M., Widmark, E. & Gustafsson, J. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1440–1444 (1993).
  216. Palmer, C. N. A., Hsu, M.-H., Griffin, K. J. & Johnson, E. F. Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J. Biol. Chem.* **270**, 16114–16121 (1995).
  217. Nagy, L. & Schwabe, J. W. R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 317–324 (2004).
  218. Molnár, F., Matilainen, M. & Carlberg, C. Structural determinants of the agonist-independent association of human peroxisome proliferator-activated receptors with coactivators. *J. Biol. Chem.* **280**, 26543–26556 (2005).
  219. Werman, A. *et al.* Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 20230–20235 (1997).
  220. Xu, H. E. & Li, Y. Ligand-dependent and -independent regulation of PPAR $\gamma$  and orphan nuclear receptors. *Sci. Signal.* **1**, 1–4 (2008).
  221. Juge-Aubry, C. E. *et al.* Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 10505–10510 (1999).
  222. Jain, S. *et al.* Differential expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and its coactivators steroid receptor coactivator-1 and PPAR-binding protein PBP in the brown fat, urinary bladder, colon, and breast of the mouse. *Am. J. Pathol.* **153**, 349–354 (1998).

223. Pascual, G. *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- $\gamma$ . *Nature* **437**, 759–763 (2005).
224. Wilkinson, K. A. & Henley, J. M. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* **428**, 133–145 (2012).
225. Choi, S. S., Park, J. & Choi, J. H. Revisiting PPAR $\gamma$  as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Rep.* **47**, 599–608 (2014).
226. Yamashita, D. *et al.* The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes to Cells* **9**, 1017–1029 (2004).
227. Burn, K. A. & Heuvel, J. P. Vanden. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 952–960 (2007).
228. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147–1156 (1994).
229. Francis, G. A., Fayard, E., Picard, F. & Auwerx, J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 261–311 (2003).
230. Greene, M. E. *et al.* Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: Expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Express.* **4**, 281–299 (1995).
231. Fajas, L., Fruchart, J. C. & Auwerx, J. PPAR $\gamma$ 3 mRNA: A distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* **438**, 55–60 (1998).
232. Tontonoz, P. *et al.* Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR $\gamma$  and RXR $\alpha$ . *Nucleic Acids Res.* **22**, 5628–5634 (1994).
233. Zhu, Y. *et al.* Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (mPPAR $\gamma$ ) gene: Alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR $\gamma$  isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7921–7925 (1995).
234. Auboeuf, D. *et al.* Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* **46**, 1319–1327 (1997).
235. Liu, S. *et al.* Differential roles of PPAR $\gamma$  vs TR4 in prostate cancer and metabolic diseases. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, R279–R300 (2014).
236. Dreyer, C. *et al.* Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **68**, 879–887 (1992).
237. Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ : Adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798–800 (1994).
238. Peter, T., Erding, H. & Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis by PPAR $\gamma$ 2, a lipid-activated in fibroblasts transcription factor. *Cell* **79**, 1147–1156 (1994).
239. Zhou, J., Wilson, K. M. & Medh, J. D. Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  splice variants in monkey macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **293**, 274–283 (2002).
240. Aprile, M. *et al.* PPAR $\gamma$  $\Delta$ 5, a naturally occurring dominant-negative splice isoform, impairs PPAR $\gamma$  function and adipocyte differentiation. *Cell Rep.* **25**, 1577–1592 (2018).
241. Valmaseda, A. *et al.* Opposite regulation of PPAR- $\alpha$  and - $\gamma$  gene expression by both their ligands and retinoic acid in brown adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **154**, 101–109 (1999).
242. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. & Spiegelman, B. M. mPPAR gamma 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* **8**, 1224–1234 (1994).
243. Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M. & McKnight, S. L. Cascade regulation of terminal adipocyte

- differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* **9**, 168–181 (1995).
244. Wu, Z. *et al.* Cross-regulation of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* **3**, 151–158 (1999).
  245. Aubert, J. *et al.* Up-regulation of UCP-2 gene expression by PPAR agonists in preadipose and adipose cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 606–611 (1997).
  246. Ren, D., Collingwood, T. N., Rebar, E. J., Wolffe, A. P. & Camp, H. S. PPAR  $\gamma$  knockdown by engineered transcription factors: Exogenous PPAR $\gamma$ 2 but not PPAR $\gamma$ 1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev.* **16**, 27–32 (2002).
  247. Rosen, E. D. *et al.* C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : A unified pathway. *Genes Dev.* **16**, 22–26 (2002).
  248. Barquissau, V. *et al.* White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol. Metab.* **5**, 352–365 (2016).
  249. Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376 (2012).
  250. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülcke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
  251. Feige, J. N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B. & Wahli, W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid Res.* **45**, 120–159 (2006).
  252. Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and beyond: The diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 289–312 (2008).
  253. Spiegelman, B. M., Hu, E., Kim, J. B. & Brun, R. PPAR $\gamma$  and the control of adipogenesis. *Biochimie* **79**, 111–112 (1997).
  254. Lehrke, M. & Lazar, M. A. The many faces of PPAR $\gamma$ . *Cell* **123**, 993–999 (2005).
  255. Chui, P. C., Guan, H., Lehrke, M. & Lazar, M. A. PPAR  $\gamma$  regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J. Clin. Invest.* **115**, 2244–2256 (2005).
  256. Zhang, W., Sun, Q., Zhong, W., Sun, X. & Zhou, Z. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling contributes to alcohol-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **40**, 988–999 (2016).
  257. Schadinger, S. E., Bucher, N. L. R., Schreiber, B. M. & Farmer, S. R. PPAR $\gamma$ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am. J. Physiol. Metab.* **288**, E1195–E1205 (2005).
  258. Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs : Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125–1131 (2002).
  259. Kim, J. B. & Spiegelman, B. M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* **10**, 1096–1107 (1996).
  260. Fajas, L. *et al.* Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5495–5503 (1999).
  261. Hibuse, T. *et al.* Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase. *PNAS* **102**, 10993–10998 (2005).
  262. Rodriguez-Cuenca, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -dependent regulation of lipolytic nodes and metabolic flexibility. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1555–1565 (2012).
  263. Festuccia, W. T., Laplante, M., Berthiaume, M., Gélinas, Y. & Deshaies, Y. PPAR $\gamma$  agonism

- increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* **49**, 2427–2436 (2006).
264. Berg, A. H., Terry, P. & Scherer, P. E. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *TRENDS Endocrinol. Metab.* **13**, 84–89 (2002).
  265. Maeda, N. *et al.* PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* **50**, 2094–2099 (2001).
  266. Fruebis, J. *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2005–2010 (2001).
  267. Ouchi, N. *et al.* Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- $\kappa$ B signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* **102**, 1296–1301 (2000).
  268. Berg, A., Combs, T., Du, X., Brownlee, M. & Scherer, P. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* **7**, 947–953 (2001).
  269. Santulli, G. Angiopoietin-like proteins: A comprehensive look. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **5**, 1–6 (2014).
  270. La Paglia, L. *et al.* Potential role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway. *PPAR Res.* 1–15 (2017). doi:10.1155/2017/8187235
  271. Törüner, F. *et al.* Effects of PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists on serum leptin levels in diet-induced obese rats. *Horm. Metab. Res.* **36**, 226–230 (2004).
  272. Savage, D. B. *et al.* Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  action in humans. *Diabetes* **50**, 2199–2202 (2001).
  273. Witte, N. *et al.* The glucose sensor ChREBP links de novo lipogenesis to PPAR $\gamma$  activity and adipocyte differentiation. *Endocrinology* **156**, 4008–4019 (2015).
  274. Kim, J. B. *et al.* Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.* **101**, 1–9 (1998).
  275. Tobin, K. A. R. *et al.* Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 10691–10697 (2002).
  276. Kramer, D., Shapiro, R., Adler, A., Bush, E. & Rondinone, C. M. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism* **50**, 1294–1300 (2001).
  277. Kim, H. *et al.* Identification and functional characterization of peroxisomal proliferator activated receptor response element in rat GLUT2 promoter. *Diabetes* **49**, 1517–1524 (2000).
  278. Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R. F., Bucher, N. L. R. & Farmer, S. R. PPAR $\gamma$  induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBP $\alpha$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J. Clin. Invest.* **101**, 22–32 (1998).
  279. Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E. G. & Spiegelman, B. M. PPAR $\gamma$ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 351–357 (1995).
  280. Kim, H. & Ahn, Y. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in the glucose-sensing apparatus of liver and  $\beta$ -cells. *Diabetes* **53**, S60–S65 (2004).
  281. Kim, H. *et al.* Peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  upregulates glucokinase gene expression in  $\beta$ -cells. *Diabetes* **51**, 676–685 (2002).
  282. Cabrero, A., Laguna, J. C. & Vázquez, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. *Curr. Drug Targets- Inflamm. Allergy* **1**, 243–248 (2002).
  283. Jiang, C., Ting, A. T. & Seed, B. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokine. *Nature* **391**, 82–86 (1998).
  284. Inoue, I. *et al.* The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )

- and PPAR $\gamma$  increase Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* **50**, 3–11 (2001).
285. Hwang, J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C899–C905 (2005).
  286. Zechner, R., Kienesberger, P. C., Haemmerle, G., Zimmermann, R. & Lass, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J. Lipid Res.* **50**, 3–21 (2009).
  287. Lass, A. *et al.* Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in chananin-dorfman syndrome. *Cell Metab.* **3**, 309–319 (2006).
  288. Moore, J. B., Gunn, P. J. & Fielding, B. A. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* **6**, 5679–5703 (2014).
  289. Dentin, R., Girard, J. & Postic, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* **87**, 81–86 (2005).
  290. Grommes, C., Landreth, G. E. & Heneka, M. T. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *Lancet Oncol.* **5**, 419–429 (2004).
  291. Lefebvre, A. *et al.* Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat. Med.* **4**, 1053–1057 (1998).
  292. Saez, E. *et al.* Activators of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  enhance colon polyp formation. *Nat. Med.* **4**, 1058–1061 (1998).
  293. Varley, C. L., Stahlschmidt, J., Smith, B., Stower, M. & Southgate, J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  reverses squamous metaplasia and induces transitional differentiation in normal human urothelial cells. *Am. J. Pathol.* **164**, 1789–1798 (2004).
  294. Itoh, T. *et al.* Structural basis for the activation of PPAR $\gamma$  by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 924–931 (2008).
  295. Michalik, L. *et al.* International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 726–41 (2006).
  296. Zoete, V., Grosdidier, A. & Michielin, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 915–925 (2007).
  297. Xu, H. E. *et al.* Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *PNAS* **98**, 13919–13924 (2001).
  298. Kallenberger, B. C., Love, J. D., Chatterjee, V. K. K. & Schwabe, J. W. R. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 136–140 (2003).
  299. Lee, M. A., Tan, L., Yang, H., Im, Y. G. & Im, Y. J. Structures of PPAR $\gamma$  complexed with lobeglitazone and pioglitazone reveal key determinants for the recognition of antidiabetic drugs. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
  300. Uppenberg, J. *et al.* Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* **273**, 31108–31112 (1998).
  301. Oberfield, J. L. *et al.* A peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 6102–6106 (1999).
  302. Bruning, J. B. *et al.* Partial agonists activate PPAR $\gamma$  using a helix 12 independent mechanism. *Structure* **15**, 1258–1271 (2007).
  303. Jang, J. Y. *et al.* Structural basis for the enhanced anti-diabetic efficacy of lobeglitazone on PPAR $\gamma$ . *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
  304. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct

- interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318–4323 (1997).
305. Shang, J. *et al.* Cooperative cobinding of synthetic and natural ligands to the nuclear receptor PPAR $\gamma$ . *Elife* **7**, 1–34 (2018).
  306. Jang, J. Y. *et al.* Structural basis for differential activities of enantiomeric PPAR $\gamma$  agonists: Binding of S35 to the alternate site. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1865**, 674–681 (2017).
  307. Choi, J. H. *et al.* Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. *Nature* **466**, 451–456 (2010).
  308. Soccio, R. E., Chen, E. R. & Lazar, M. A. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab.* **20**, 573–591 (2014).
  309. Choi, J. H. *et al.* Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR $\gamma$  ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* **477**, 477–481 (2011).
  310. Bae, H. *et al.* Mechanistic elucidation guided by covalent inhibitors for the development of anti-diabetic PPAR $\gamma$  ligands. *Chem. Sci.* **7**, 5523–5529 (2016).
  311. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G. A., Chen, H. & Evans, R. M. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ . *Cell* **93**, 229–240 (1998).
  312. Schopfer, F. J. *et al.* Nitrolinoleic acid : An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand. *PNAS* **102**, 2340–2345 (2005).
  313. Alexander, R. L. *et al.* Differential potencies of naturally occurring regioisomers of nitrolinoleic acid in PPAR $\gamma$  activation. *Biochemistry* **48**, 492–498 (2009).
  314. McIntyre, T. M. *et al.* Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR $\gamma$  agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 131–136 (2003).
  315. Tsukahara, T. *et al.* Different residues mediate recognition of 1-O-oleyl-lysophosphatidic acid and rosiglitazone in the ligand binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* **281**, 3398–3407 (2006).
  316. Kliewer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Morris, D. C. & Lehmann, J. M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813–819 (1995).
  317. Itoh, T. & Yamamoto, K. Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  and oxidized docosahexaenoic acids as new class of ligand. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **377**, 541–547 (2008).
  318. Naruhn, S. *et al.* 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  agonist. *Mol. Pharmacol.* **77**, 171–184 (2010).
  319. Goto, T. *et al.* Farnesyl pyrophosphate regulates adipocyte functions as an endogenous PPAR $\gamma$  agonist. *Biochem. J.* **438**, 111–119 (2011).
  320. Schupp, M. & Lazar, M. A. Endogenous ligands for nuclear receptors: Digging deeper. *J. Biol. Chem.* **285**, 40409–40415 (2010).
  321. Xu, H. E. *et al.* Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* **3**, 397–403 (1999).
  322. Villacorta, L., Schopfer, F. J., Zhang, J., Freeman, B. A. & Chen, Y. E. PPAR $\gamma$  and its ligands: therapeutic implications in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. **116**, 205–218 (2009).
  323. Shiraki, T., Kodama, T. S., Shiki, S., Nakagawa, T. & Jingami, H. Spectroscopic analyses of the binding kinetics of 15d-PGJ 2 to the PPAR $\gamma$  ligand-binding domain by multi-wavelength global fitting. *Biochem. J.* **393**, 749–755 (2006).
  324. Sauer, S. Ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 688–704 (2015).



325. Bell-Parikh, L. C. *et al.* Biosynthesis of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> and the ligation of PPAR $\gamma$ . *J. Clin. Invest.* **112**, 945–955 (2003).
326. Chen, R. *et al.* Rational screening of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists from natural products: Potential therapeutics for heart failure. *Pharm. Biol.* **55**, 503–509 (2017).
327. Wright, M. B., Bortolini, M., Tadayyon, M. & Bopst, M. Minireview: Challenges and opportunities in development of PPAR agonists. *Mol. Endocrinol.* **28**, 1756–1768 (2014).
328. Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D. & Henke, B. R. The PPARs : from orphan receptors to drug discovery. *J. Med. Chem.* **43**, 527–550 (2000).
329. Hellmold, H. *et al.* Tesaglitazar, a PPAR $\alpha/\gamma$  agonist, induces interstitial mesenchymal cell DNA synthesis and fibrosarcomas in subcutaneous tissues in rats. *Toxicol. Sci.* **98**, 63–74 (2007).
330. Groot, J. C. de *et al.* Structural characterization of amorfrutins bound to the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J. Med. Chem.* **56**, 1535–1543 (2013).
331. Weidner, C. *et al.* Amorfrutin B is an efficient natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist with potent glucose-lowering properties. *Diabetologia* **56**, 1802–1812 (2013).
332. Weidner, C. *et al.* Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 7257–7262 (2012).
333. Herbst, L., Goebel, M., Bandholtz, S., Gust, R. & Kintscher, U. Characterization of telmisartan-derived PPAR $\gamma$  agonists: Importance of moiety shift from position 6 to 5 on potency, efficacy and cofactor recruitment. *ChemMedChem* **7**, 1935–1942 (2012).
334. Schupp, M. *et al.* Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes* **54**, 3442–3452 (2005).
335. Puhl, A. C. *et al.* Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  regulation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nucl. Recept. Signal.* **13**, 1–17 (2015).
336. Heitel, P. *et al.* Urate transporter inhibitor lesinurad is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator (sPPAR $\gamma$ M) in vitro. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
337. Kim, M. K. *et al.* PAM-1616, a selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulator with preserved anti-diabetic efficacy and reduced adverse effects. *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 673–681 (2011).
338. Kim, K. R. *et al.* KR-62980: A novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist with weak adipogenic effects. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 446–454 (2006).
339. Chang, C. H. *et al.* A novel selective peroxisome proliferator-activator receptor- $\gamma$  modulator-SPPAR $\gamma$ M5 improves insulin sensitivity with diminished adverse cardiovascular effects. *Eur. J. Pharmacol.* **584**, 192–201 (2008).
340. Zhang, J., Liu, X., Xie, X. Bin, Cheng, X. C. & Wang, R. L. Multitargeted bioactive ligands for PPARs discovered in the last decade. *Chem. Biol. Drug Des.* **88**, 635–663 (2016).
341. Carmona, M. C. *et al.* S 26948: A new specific peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulator with potent antidiabetes and antiatherogenic effects. *Diabetes* **56**, 2797–2808 (2007).
342. Fujimura, T., Sakuma, H., Ohkubo-Suzuki, A., Aramori, I. & Mutoh, S. Unique properties of coactivator recruitment caused by differential binding of FK614, an anti-diabetic agent, to peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 423–429 (2006).
343. Lee, H. W., Ahn, J. B., Kang, S. K., Ahn, S. K. & Ha, D. C. Process development and scale-up of PPAR  $\alpha/\gamma$  dual agonist lobeglitazone sulfate (CKD-501). *Org. Process Res. Dev.* **11**, 190–199 (2007).
344. Liu, C. *et al.* Identification of a novel selective agonist of PPAR $\gamma$  with no promotion of adipogenesis and less inhibition of osteoblastogenesis. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).

345. Leesnitzer, L. M. *et al.* Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* **41**, 6640–6650 (2002).
346. Wright, H. M. *et al.* A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 1873–1877 (2000).
347. Zheng, J. *et al.* Chemical crosslinking mass spectrometry reveals the conformational landscape of the activation helix of PPAR $\gamma$ ; a model for ligand-dependent antagonism. *Structure* **26**, 1431–1439 (2018).
348. Mukherjee, R. *et al.* A selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1425–1433 (2000).
349. Natali, A. & Ferrannini, E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetologia* **49**, 434–441 (2006).
350. Woodcock, J., Sharfstein, J. M. & Hamburg, M. Regulatory action on rosiglitazone by the U.S. food and drug administration. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1489–1491 (2010).
351. Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee. *Summary minutes of the joint meeting of the endocrinologic and metabolic drugs advisory committee and the drug safety and risk management advisory committee held on July 30, 2007. Food and drug administration center for drug evaluation and research* (2007).
352. Murphy, C. E. & Rodgers, P. T. Effects of thiazolidinediones on bone loss and fracture. *Ann. Pharmacother.* **41**, 2014–2018 (2007).
353. Home, P. D. *et al.* Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): A multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet* **373**, 2125–2135 (2009).
354. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften - AWMF. Programm für Nationale Versorgungsleitlinien: Therapie des Typ-2-Diabetes Kurzfassung. **1. Auflage**, 1–64 (2013).
355. Bundesministerium für Gesundheit. Bekanntmachung eines Beschlusses des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL): Anlage III – Übersicht der Verordnungseinschränkungen und -ausschlüsse Glitazone zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. *BAnz.* **175**, 3855 (2010).
356. McCarthy, M. US regulators relax restrictions on rosiglitazone. *BMJ* **347**, 1 (2013).
357. Mitka, M. FDA eases restrictions on the glucose-lowering drug rosiglitazone. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **310**, 2604 (2013).
358. Mahaffey, K. W. *et al.* Results of a reevaluation of cardiovascular outcomes in the RECORD trial. *Am. Heart J.* **166**, 240-249.e1 (2013).
359. Dormandy, J. A. *et al.* Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone clinical trial in macrovascular events): A randomised controlled trial. *Lancet* **366**, 1279–1289 (2005).
360. Schneider, C. A. *et al.* Effect of pioglitazone on cardiovascular outcome in diabetes and chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 182–187 (2008).
361. Tzoulaki, I. *et al.* Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: Retrospective cohort study using UK general practice research database. *BMJ* **339**, 1–9 (2009).
362. Vallarino, C. *et al.* Comparing pioglitazone to insulin with respect to cancer, cardiovascular and bone fracture endpoints, using propensity score weights. *Clin. Drug Investig.* **33**, 621–631 (2013).
363. Miyazaki, Y. *et al.* Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in

- type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2784–2791 (2002).
364. Iwaki, M. *et al.* Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52**, 1655–1663 (2003).
365. Semple, R. K., Chatterjee, V. K. K. & O’Rahilly, S. Review series PPAR $\gamma$  and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 581–589 (2006).
366. Charlton, M. Nonalcoholic fatty liver disease: A review of current understanding and future impact. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 1048–1058 (2004).
367. Day, C. P. & James, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two ‘hits’? *Gastroenterology* **114**, 842–845 (1998).
368. Bénardeau, A. *et al.* Aleglitazar, a new, potent, and balanced dual PPAR $\alpha/\gamma$  agonist for the treatment of type II diabetes. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 2468–2473 (2009).
369. Loke, Y. K., Kwok, C. S. & Singh, S. Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* **342**, 1–22 (2011).
370. Rousseaux, C. *et al.* Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *J. Exp. Med.* **201**, 1205–1215 (2005).
371. Dubuquoy, L. *et al.* PPAR $\gamma$  as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut* **55**, 1341–1349 (2006).
372. Fuhr, L., Rousseau, M., Plauth, A., Schroeder, F. C. & Sauer, S. Amorfrutins are natural PPAR $\gamma$  agonists with potent anti-inflammatory properties. *J. Nat. Prod.* **78**, 1160–1164 (2015).
373. Tegeder, I., Pfeilschifter, J. & Geisslinger, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* **15**, 2057–2072 (2001).
374. Taygerly, J. *et al.* Discovery of INT131: a selective PPAR $\gamma$  modulator that enhances insulin sensitivity. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 979–992 (2013).
375. Motani, A. *et al.* INT131: a selective modulator of PPAR gamma. *J. Mol. Biol.* **386**, 1301–1311 (2009).
376. Xie, X. *et al.* L312, a novel PPAR $\gamma$  ligand with potent anti-diabetic activity by selective regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 62–72 (2015).
377. Acton, J. J. *et al.* Discovery of (2R)-2-(3-{3-[(4-methoxyphenyl)carbonyl]-2-methyl-6-(trifluoromethoxy)-1H-indol-1-yl}phenoxy)butanoic acid (MK-0533). *J. Med. Chem.* **52**, 3846–3854 (2009).
378. Gregoire, F. M. *et al.* MBX-102/JNJ39659100, a novel peroxisome proliferator-activated receptor-ligand with weak transactivation activity retains antidiabetic properties in the absence of weight gain and edema. *Mol. Endocrinol.* **23**, 975–988 (2009).
379. Sohn, K.-A. K. *et al.* S26948, a new specific peroxisome proliferator activated receptor gamma modulator improved in vivo hepatic insulin sensitivity in 48 h lipid infused rats. *Eur. J. Pharmacol.* **608**, 104–111 (2009).
380. Fujimura, T. *et al.* FK614, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator, induces differential transactivation through a unique ligand-specific interaction with transcriptional coactivators. *J. Pharmacol. Sci.* **99**, 342–352 (2005).
381. Minoura, H. *et al.* Pharmacological characteristics of a novel nonthiazolidinedione insulin sensitizer, FK614. *Eur. J. Pharmacol.* **494**, 273–281 (2004).
382. Amato, A. A. *et al.* GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. *J. Biol. Chem.* **287**, 28169–28179 (2012).
383. Choi, S.-S. *et al.* A novel non-agonist peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand UHC1 blocks PPAR $\gamma$  phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and improves insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* **289**, 26618–26629 (2014).
384. Jiang, W. *et al.* SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative

- human disc nucleus pulposus cells. *Sci. Rep.* **4**, 1–8 (2014).
385. Clasen, R. *et al.* PPAR $\gamma$ -activating angiotensin type-1 receptor blockers induce adiponectin. *Hypertension* **46**, 137–143 (2005).
386. Souza-Mello, V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Hepatol.* **7**, 1012–1019 (2015).
387. Fujimura, A., Ushijima, K. & Ando, H. Does the PPAR- $\gamma$ -activating property of telmisartan provide a benefit in clinical practice? *Hypertens. Res.* **36**, 183 (2013).
388. de Almeida, N. R. & Conda-Sheridan, M. A review of the molecular design and biological activities of RXR agonists. *Med. Res. Rev.* **39**, 1372–1397 (2019).
389. Thacher, S., Vasudevan, J. & Chandraratna, R. Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Curr. Pharm. Des.* **6**, 25–58 (2000).
390. Altucci, L. & Gronemeyer, H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer.* **1**, 181–189 (2001).
391. Clarke, N., Germain, P., Altucci, L. & Gronemeyer, H. Retinoids: Potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **6**, 1–23 (2004).
392. Dawson, M. I. Synthetic retinoids and their nuclear receptors. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* **4**, 199–230 (2004).
393. Szanto, A. *et al.* Review retinoid x receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ.* **11**, S126–S143 (2004).
394. Dragnev, K. H. *et al.* Bexarotene and erlotinib for aerodigestive tract cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8757–8764 (2005).
395. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the x-files. *Science (80-. ).* **294**, 1866–1870 (2001).
396. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* **81**, 1269–1304 (2017).
397. Wagner, C. E. *et al.* Modeling, synthesis and biological evaluation of potential retinoid-X-receptor (RXR) selective agonists: Novel analogs of 4-[1-(3,5,5,8,8- Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2- naphthyl) ethynyl]benzoic acid (bexarotene). *J Med Chem* **52**, 5950–5966 (2009).
398. Chen, Z. P. *et al.* Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers. *J. Mol. Biol.* **275**, 55–65 (1998).
399. Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J. & Evans, R. M. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**, 541–550 (1995).
400. Kurokawa, R. *et al.* Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxyterminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev.* **7**, 1423–1435 (1993).
401. Leblanc, B. P. & Stunnenberg, H. G. 9-Cis retinoic acid signaling: Changing partners causes some excitement. *Genes Dev.* **9**, 1811–1816 (1995).
402. Sánchez-Martínez, R., Castillo, A. I., Steinmeyer, A. & Aranda, A. The retinoid X receptor ligand restores defective signalling by the vitamin D receptor. *EMBO Rep.* **7**, 1030–1034 (2006).
403. Széles, L. *et al.* Research resource: Transcriptome profiling of genes regulated by RXR and its permissive and nonpermissive partners in differentiating monocyte-derived dendritic cells. *Mol. Endocrinol.* **24**, 2218–2231 (2010).
404. Perlmann, T. & Jansson, L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* **9**, 769–782 (1995).
405. Yasmin, R., Kannan-Thulasiraman, P., Kagechika, H., Dawson, M. I. & Noy, N. Inhibition of

- mammary carcinoma cell growth by RXR is mediated by the receptor's oligomeric switch. *J. Mol. Biol.* **397**, 1121–1131 (2010).
406. Ijpenberg, A. *et al.* In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J.* **23**, 2083–2091 (2004).
  407. Kersten, S., Kelleher, D., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Noy, N. Retinoid X receptor  $\alpha$  forms tetramers in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 8645–8649 (1995).
  408. Gampe, R. T. *et al.* Structural basis for autorepression of retinoid X receptor by tetramer formation and the AF-2 helix. *Genes Dev.* **14**, 2229–2241 (2000).
  409. Egea, P. F. *et al.* Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J. Mol. Biol.* **307**, 557–576 (2001).
  410. Mangelsdorf, D. J. *et al.* A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* **66**, 555–561 (1991).
  411. Mader, S. *et al.* The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J.* **12**, 5029–5041 (1993).
  412. Germain, P. *et al.* International union of pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 760–772 (2006).
  413. Schulman, I. G., Juguilon, H. & Evans, R. M. Activation and repression by nuclear hormone receptors: Hormone modulates an equilibrium between active and repressive states. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3807–3813 (1996).
  414. Zhang, J., Zamir, I. & Lazar, M. A. Differential recognition of liganded and unliganded thyroid hormone receptor by retinoid X receptor regulates transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6887–6897 (1997).
  415. Chandra, V. *et al.* Structure of the intact PPAR- $\gamma$ -RXR- $\alpha$  nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **456**, 350–356 (2008).
  416. Lou, X. *et al.* Structure of the retinoid X receptor  $\alpha$ -liver X receptor  $\beta$  (RXR $\alpha$ -LXR $\beta$ ) heterodimer on DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 277–281 (2014).
  417. Perlmann, T., Rangarajan, P. N., Umesono, K. & Evans, R. M. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* **7**, 1411–1422 (1993).
  418. Chan, L. S. A. & Wells, R. Cross-talk between PPARs and the partners of RXR: A molecular perspective. *PPAR Res.* **2009**, 1–9 (2009).
  419. Orlov, I., Rochel, N., Moras, D. & Klaholz, B. P. Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *EMBO J.* **31**, 291–300 (2012).
  420. Lammi, J., Perlmann, T. & Aarnisalo, P. Corepressor interaction differentiates the permissive and non-permissive retinoid X receptor heterodimers. *Arch. Biochem. Biophys.* **472**, 105–114 (2008).
  421. Ghosh, J. C. *et al.* Interactions that determine the assembly of a retinoid X receptor/corepressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5842–5847 (2002).
  422. Lee, W. Y. & Noy, N. Interactions of RXR with coactivators are differentially mediated by helix 11 of the receptor's ligand binding domain. *Biochemistry* **41**, 2500–2508 (2002).
  423. Pogenberg, V. *et al.* Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J. Biol. Chem.* **280**, 1625–1633 (2005).
  424. Zhang, J., Hu, X. & Lazar, M. A. A novel role for helix 12 of retinoid X receptor in regulating repression. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6448–6457 (1999).
  425. Vivat, V. *et al.* A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J.* **16**, 5697–5709 (1997).

426. Zechel, C. *et al.* The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* **13**, 1425–1433 (1994).
427. Lee, M. S., Kliewer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E. & Evans, R. M. Structure of the retinoid X receptor  $\alpha$  DNA binding domain: A helix required for homodimeric DNA binding. *Science* (80-). **260**, 1117–1121 (1993).
428. Zhang, X. K., Salbert, G., Lee, M. O. & Pfahl, M. Mutations that alter ligand-induced switches and dimerization activities in the retinoid X receptor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4311–4323 (1994).
429. Au-Fliegner, M., Helmer, E., Casanova, J., Raaka, B. M. & Samuels, H. H. The conserved ninth C-terminal heptad in thyroid hormone and retinoic acid receptors mediates diverse responses by affecting heterodimer but not homodimer formation. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5725–5737 (1993).
430. Laflamme, L., Hamann, G., Messier, N., Maltais, S. & Langlois, M.-F. RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 61–72 (2002).
431. Lefebvre, P., Benomar, Y. & Staels, B. Retinoid X receptors: Common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 676–683 (2010).
432. Mangelsdorf, D. J. *et al.* Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* **6**, 329–344 (1992).
433. Hamada, K. *et al.* H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8289–8293 (1989).
434. Dollé, P., Fraulob, V., Kastner, P. & Chambon, P. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech. Dev.* **45**, 91–104 (1994).
435. Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A. & Evans, R. M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **345**, 224–229 (1990).
436. Rowe, A., Eager, N. S. C. & Brickell, P. M. A member of the RXR nuclear receptor family is expressed in neural-crest-derived cells of the developing chick peripheral nervous system. *Development* **111**, 771–778 (1991).
437. Heyman, R. A. *et al.* 9-Cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**, 397–406 (1992).
438. Leid, M. *et al.* Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* **68**, 377–395 (1992).
439. Levin, A. A. *et al.* 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR $\alpha$ . *Nature* **355**, 359–361 (1992).
440. Fleischauer, K. *et al.* Isolation of a full-length cDNA clone encoding a N-terminally variant form of the human retinoid X receptor  $\beta$ . *Nucleic Acids Res.* **20**, 1801 (1992).
441. Nagata, T., Kanno, Y., Ozato, K. & Taketo, M. The mouse RXRb gene encoding RXR $\beta$ : Genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters. *Gene* **142**, 183–189 (1994).
442. Brocard, J., Kastner, P. & Chambon, P. Two novel RXR $\alpha$  isoforms from mouse testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 211–218 (1996).
443. Liu, Q. & Linney, E. The mouse retinoid-X receptor- $\gamma$  gene: Genomic organization and evidence for functional isoforms. *Mol. Endocrinol.* **7**, 651–658 (1993).
444. Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940–954 (1996).
445. Sapin, V., Dollé, P., Hindelang, C., Kastner, P. & Chambon, P. Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXR $\alpha$  null fetuses. *Dev. Biol.* **191**, 29–41 (1997).

446. Kastner, P. *et al.* Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* **124**, 313–326 (1997).
447. Li, M. *et al.* Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR $\alpha$  mutations in mouse epidermis. *Nature* **407**, 633–636 (2000).
448. Li, M. *et al.* RXR $\alpha$  ablation in skin keratinocytes results in alopecia and epidermal alterations. *Development* **128**, 675–688 (2001).
449. Mascrez, B. *et al.* Ligand-dependent contribution of RXR $\beta$  to cholesterol homeostasis in sertoli cells. *EMBO Rep.* **5**, 285–290 (2004).
450. Nagy, L., Thomázy, V. A., Chandraratna, R. A. S., Heyman, R. A. & Davies, P. J. A. Retinoid-regulated expression of BCL-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Leuk. Res.* **20**, 499–505 (1996).
451. Liu, B. *et al.* Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor- $\alpha$  regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 33607–33613 (2000).
452. Krezel, W. *et al.* Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science (80- )*. **279**, 863–867 (1998).
453. Wietrych-Schindler, M. *et al.* Retinoid X receptor gamma is implicated in docosahexaenoic acid modulation of despair behaviors and working memory in mice. *Biol. Psychiatry* **69**, 788–794 (2011).
454. Huang, J. K. *et al.* Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci.* **14**, 45–53 (2011).
455. Imai, T., Jiang, M., Chambon, P. & Metzger, D. Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor  $\alpha$  mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 224–228 (2001).
456. Yamauchi, T. *et al.* Inhibition of RXR and PPAR $\gamma$  ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **108**, 1001–1013 (2001).
457. Ogilvie, K. M. *et al.* Activation of the retinoid X receptor suppresses appetite in the rat. *Endocrinology* **145**, 565–573 (2004).
458. Leibowitz, M. D. *et al.* Biological characterization of a heterodimer-selective retinoid X receptor modulator: Potential benefits for the treatment of type 2 diabetes. *Endocrinology* **147**, 1044–1053 (2006).
459. Cha, B. S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  and retinoid X receptor (RXR) agonists have complementary effects on glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Diabetologia* **44**, 444–452 (2001).
460. Lu, T. T. *et al.* Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* **6**, 507–515 (2000).
461. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–2838 (2000).
462. Schroeder, E. & McDermott, M. T. *Lipid disorders*. *Endocrine Secrets* (Elsevier Inc., 2013). doi:10.1016/B978-1-4557-4975-1.00015-2
463. Langmann, T. *et al.* Molecular cloning of the human ATP-Binding cassette transporter 1 (hABC1): Evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 29–33 (1999).
464. Mukherjee, R. *et al.* Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* **386**, 407–410 (1997).
465. Ahuja, H. S. *et al.* Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents. *Mol. Pharmacol.* **59**, 765–773 (2001).

466. Peters, S. J. *et al.* Human skeletal muscle PDH kinase activity and isoform expression during a 3-day high-fat/low-carbohydrate diet. *Am. J. Physiol. Metab.* **281**, E1151–E1158 (2001).
467. Samec, S., Seydoux, J., Russell, A. P., Montani, J. P. & Dulloo, A. G. Skeletal muscle heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3, PPAR $\gamma$  and key enzymes of lipid oxidation. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **445**, 80–86 (2002).
468. Pilegaard, H., Saltin, B. & Neufer, P. D. Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. *Diabetes* **52**, 657–662 (2003).
469. Wang, S., Subramaniam, A., Cawthorne, M. A. & Clapham, J. C. Increased fatty acid oxidation in transgenic mice overexpressing UCP3 in skeletal muscle. *Diabetes, Obes. Metab.* **5**, 295–301 (2003).
470. Liu, S. *et al.* Mechanism of selective retinoid X receptor agonist-induced hypothyroidism in the rat. *Endocrinology* **143**, 2880–2885 (2002).
471. Sherman, S. *et al.* Central hypothyroidism associated with retinoid X receptor-selective ligands. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1075–1079 (1999).
472. Rosen, E. D. *et al.* PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* **4**, 611–617 (1999).
473. Barak, Y. *et al.* PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
474. Kubota, N. *et al.* PPAR $\gamma$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* **4**, 597–609 (1999).
475. Ohsawa, F., Morishita, K. I., Yamada, S., Makishima, M. & Kakuta, H. Modification at the lipophilic domain of RXR agonists differentially influences activation of RXR heterodimers. *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 521–525 (2010).
476. Zapata-Gonzalez, F. *et al.* 9-cis-Retinoic acid (9cRA), a retinoid X receptor (RXR) ligand, exerts immunosuppressive effects on dendritic cells by RXR-dependent activation: Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  blocks some of the 9cRA activities, and precludes t. *J. Immunol.* **178**, 6130–6139 (2007).
477. Chai, D. *et al.* RXR agonists inhibit high-glucose-induced oxidative stress by repressing PKC activity in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1334–1347 (2008).
478. Shan, P. *et al.* RXR agonists inhibit oxidative stress-induced apoptosis in H9c2 rat ventricular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 528–533 (2008).
479. Lawrence, J. *et al.* A high-risk lesion for invasive breast cancer, ductal carcinoma in situ, exhibits frequent overexpression of retinoid X receptor. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**, 29–35 (1998).
480. Friedrich, M. *et al.* Analysis of vitamin D-receptor (VDR) and retinoid X-receptor  $\alpha$  in breast cancer. *Histochem. J.* **34**, 35–40 (2002).
481. Tanaka, T., Suh, K. S., Lo, A. M. & De Luca, L. M. p21WAF1/CIP1 is a common transcriptional target of retinoid receptors: Pleiotropic regulatory mechanism through Retinoic Acid Receptor (RAR)/Retinoid X Receptor (RXR) heterodimer and RXR/RXR homodimer. *J. Biol. Chem.* **282**, 29987–29997 (2007).
482. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. & Stillman, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574–578 (1994).
483. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149–1163 (1995).
484. Zeng, Z. *et al.* Nitrostyrene derivatives act as RXR $\alpha$  ligands to inhibit TNF $\alpha$  activation of NF- $\kappa$ B. *Cancer Res.* **75**, 2049–2061 (2015).
485. Krezel, W. *et al.* RXR $\gamma$  null mice are apparently normal and compound RXR $\alpha$ +/-RXR $\beta$ -/-



- /RXR $\gamma$ -/- mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9010–9014 (1996).
486. Dollé, P. Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl. Recept. Signal.* **7**, 1–13 (2009).
487. Mascrez, B., Ghyselinck, N. B., Chambon, P. & Mark, M. A transcriptionally silent RXR supports early embryonic morphogenesis and heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 4272–4277 (2009).
488. Sucov, H. M., Izpisua-Belmonte, J. C., Gañan, Y. & Evans, R. M. Mouse embryos lacking RXR $\alpha$  are resistant to retinoic-acid-induced limb defects. *Development* **121**, 3997–4003 (1995).
489. Sucov, H. M. *et al.* RXR $\alpha$  mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev.* **8**, 1007–1018 (1994).
490. Dyson, E. *et al.* Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha -/- mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7386–7390 (1995).
491. Osorio, J. C. *et al.* Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor- $\alpha$  in pacing-induced heart failure. *Circulation* **106**, 606–612 (2002).
492. Kastner, P. *et al.* Genetic analysis of RXR alpha developmental function: Convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**, 987–1003 (1994).
493. Merk, D. Chances and challenges of RXR $\gamma$  targeting for regenerative multiple sclerosis treatment. *Futur. Med. Chem.* **7**, 2411–2413 (2015).
494. Spathis, A. D. *et al.* Nurr1:RXR $\alpha$  heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 3999–4004 (2017).
495. Ardura-Fabregat, A. *et al.* Targeting neuroinflammation to treat alzheimer's disease. *CNS Drugs* **31**, 1057–1082 (2017).
496. Koster, K. P. *et al.* Retinoids as therapeutics for alzheimer's disease: Role of APOE. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**, 708–720 (2017).
497. Cramer, P. E. *et al.* ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science (80- )*. **335**, 1503–1506 (2012).
498. Cummings, J. L. *et al.* Double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial of bexarotene in moderate alzheimer's disease. *Alzheimers. Res. Ther.* **8**, 1–9 (2016).
499. Bonen, A., Dyck, D. J., Ibrahimi, A. & Abumrad, N. A. Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am. J. Physiol. Metab.* **276**, E642–E649 (1999).
500. Luiken, J. J. F. P., Han, X.-X., Dyck, D. J. & Bonen, A. Coordinately regulated expression of FAT/CD36 and FACS1 in rat skeletal muscle. *Mol. Cell. Biochem.* **223**, 61–69 (2001).
501. Himms-Hagen, J. & Harper, M.-E. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: An hypothesis. *Exp. Biol. Med.* **226**, 78–84 (2001).
502. Nohara, A., Kobayashi, J. & Mabuchi, H. Retinoid X receptor heterodimer variants and cardiovascular risk factors. *J. Atheroscler. Thromb.* **16**, 303–318 (2009).
503. Haugen, B. R. *et al.* Retinoid X receptor  $\gamma$ -deficient mice have increased skeletal muscle lipoprotein lipase activity and less weight gain when fed a high-fat diet. *Endocrinology* **145**, 3679–3685 (2004).
504. Ross, A. W. *et al.* Temporal changes in gene expression in the arcuate nucleus precede seasonal responses in adiposity and reproduction. *Endocrinology* **146**, 1940–1947 (2005).
505. Brown, N. S. *et al.* Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR- $\gamma$ -deficient mouse. *J. Clin. Invest.* **106**, 73–79 (2000).
506. Lenhard, J. M., Croom, D. K., Weiel, J. E. & Winegar, D. A. HIV protease inhibitors stimulate hepatic triglyceride synthesis. *Arter. Thromb Vasc Biol* **20**, 2625–2629 (2000).

507. Vu-Dac, N. *et al.* Retinoids increase human apo C-III expression at the transcriptional level via the retinoid X receptor: Contribution to the hypertriglyceridemic action of retinoids. *J. Clin. Invest.* **102**, 625–632 (1998).
508. Davies, P. J. A. *et al.* Metabolic effects of rexinoids: Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity. *Mol. Pharmacol.* **59**, 170–176 (2001).
509. Lenhard, J. M. *et al.* The RXR agonist LG100268 causes hepatomegaly, improves glycaemic control and decreases cardiovascular risk and cachexia in diabetic mice suffering from pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetologia* **42**, 545–554 (1999).
510. Szatmari, I. & Nagy, L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *EMBO J.* **27**, 2353–2362 (2008).
511. Liou, G.-Y. & Storz, P. *Reactive oxygen species in cancer.* *Free Radic Res.* **44**, (2010).
512. Wang, G. *et al.* Targeting truncated retinoid X receptor- $\alpha$  by CF31 induces TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. *CANCER Res.* **73**, 307–318 (2013).
513. Zhou, H. *et al.* NSAID sulindac and its analogs bind RXR $\alpha$  and inhibit RXR $\alpha$ -dependent AKT signaling. *Cancer Cell.* **17**, 560–573 (2010).
514. Schierle, S. & Merk, D. Therapeutic modulation of retinoid X receptors – SAR and therapeutic potential of RXR ligands and recent patents. *Expert Opin. Ther. Pat.* **29**, 605–621 (2019).
515. Egea, P. F. *et al.* Crystal structure of the human RXR $\alpha$  ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO J.* **19**, 2592–2601 (2000).
516. Pérez, E., Bourguet, W., Gronemeyer, H. & De Lera, A. R. Modulation of RXR function through ligand design. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 57–69 (2012).
517. Gampe, R. T. *et al.* Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell* **5**, 545–555 (2000).
518. Kersten, S., Gronemeyer, H. & Noy, N. The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J. Biol. Chem.* **272**, 12771–12777 (1997).
519. Vivat-Hannah, V., Bourguet, W., Gottardis, M. & Gronemeyer, H. Separation of retinoid X receptor homo- and heterodimerization functions. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7678–7688 (2003).
520. Dawson, M. I. & Xia, Z. The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 21–56 (2012).
521. Liby, K. T., Yore, M. M. & Sporn, M. B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 357–369 (2007).
522. Qu, L. & Tang, X. Bexarotene: A promising anticancer agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **65**, 201–205 (2010).
523. Santin, E. P. *et al.* Modulating retinoid X receptor with a series of (E)-3-[4-hydroxy-3-(3-alkoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-yl)phenyl]acrylic acids and their 4-alkoxy isomers. *J. Med. Chem.* **52**, 3150–3158 (2009).
524. Nahoum, V. *et al.* Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 17323–17328 (2007).
525. Sato, Y. *et al.* The ‘phantom effect’ of the rexinoid LG100754: Structural and functional insights. *PLoS One* **5**, 1–12 (2010).
526. Cesario, R. M. *et al.* The rexinoid LG100754 is a novel RXR:PPAR $\gamma$  agonist and decreases glucose levels in vivo. *Mol. Endocrinol.* **15**, 1360–1369 (2001).
527. Morita, K. *et al.* Selective allosteric ligand activation of the retinoid X receptor heterodimers of NGFI-B and Nurr1. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 98–107 (2005).
528. Lera, A. R. De, Bourguet, W., Altucci, L. & Gronemeyer, H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 811–820 (2007).

529. Merk, D., Grisoni, F., Friedrich, L., Gelzinyte, E. & Schneider, G. Computer-assisted discovery of retinoid X receptor modulating natural products and isofunctional mimetics. *J. Med. Chem.* **61**, 5442–5447 (2018).
530. Fitzgerald, P., Teng, M., Chandraratna, R. A. S., Heyman, R. A. & Allegretto, E. A. Retinoic acid receptor  $\alpha$  expression correlates with retinoid-induced growth inhibition of human breast cancer cells regardless of estrogen receptor status. *CANCER Res.* **57**, 2642–2650 (1997).
531. Rühl, R. *et al.* 9-cis-13,14-Dihydroretinoic acid is an endogenous retinoid acting as RXR ligand in mice. *PLOS Genet.* **11**, 1–16 (2015).
532. Lengqvist, J. *et al.* Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor  $\alpha$  ligand-binding domain. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 692–703 (2004).
533. Goldstein, J. T., Dobrzyn, A., Clagett-Dame, M., Pike, J. W. & DeLuca, H. F. Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**, 185–193 (2003).
534. Mertz, J. R. *et al.* Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis-retinol oxidation. *J. Biol. Chem.* **272**, 11744–11749 (1997).
535. Romert, A., Tuvendal, P., Simon, A., Dencker, L. & Eriksson, U. The identification of a 9-cis retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-cis retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4404–4409 (1998).
536. Kane, M. A., Chen, N., Sparks, S. & Napoli, J. L. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem. J.* **388**, 363–369 (2005).
537. Allenby, G. *et al.* Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: Interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 30–34 (1993).
538. Klaholz, B. P. *et al.* Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR $\gamma$ . *Nat. Struct. Biol.* **5**, 199–202 (1998).
539. Lera, R. De, Krezel, W. & Rühl, R. An endogenous mammalian retinoid X receptor ligand , at last! *ChemMedChem* **11**, 1027–1037 (2016).
540. Kitareewan, S. *et al.* Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1153–1166 (1996).
541. Kotani, H., Tanabe, H., Mizukami, H., Makishima, M. & Inoue, M. Identification of a naturally occurring retinoid, honokiol, that activates the retinoid X receptor. *J. Nat. Prod.* **73**, 1332–1336 (2010).
542. Zhang, H. *et al.* Molecular determinants of magnolol targeting both RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
543. Zhang, H. *et al.* Structure basis of bigelovin as a selective RXR agonist with a distinct binding mode. *J. Mol. Biol.* **407**, 13–20 (2011).
544. Zhang, H. *et al.* Danthron functions as a retinoic X receptor antagonist by stabilizing tetramers of the receptor. *J. Biol. Chem.* **286**, 1868–1875 (2011).
545. Zhang, H., Chen, L., Chen, J., Jiang, H. & Shen, X. Structural basis for retinoic X receptor repression on the tetramer. *J. Biol. Chem.* **286**, 24593–24598 (2011).
546. DeUrquiza, A. M. *et al.* Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science (80- )*. **290**, 2140–2144 (2000).
547. Lampen, A., Meyer, S. & Nau, H. Phytanic acid and docosahexaenoic acid increase the metabolism of all-trans-retinoic acid and CYP26 gene expression in intestinal cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1521**, 97–106 (2001).
548. Lemotte, P. K., Keidel, S. & Apfel, C. M. Phytanic acids is a retinoid X receptor ligand. *Eur. J. Biochem.* **236**, 328–333 (1996).

549. Mic, F. A., Molotkov, A., Benbrook, D. M. & Duester, G. Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7135–7140 (2003).
550. Araki, H., Shidoji, Y., Yamada, Y., Moriwaki, H. & Muto, Y. Retinoid agonist activities of synthetic geranyl geranoic acid derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **209**, 66–72 (1995).
551. Zomer, A. W. M. *et al.* Pristanic acid and phytanic acid: Naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *J. Lipid Res.* **41**, 1801–1807 (2000).
552. Sun, J., Narayanasamy, S., Curley, R. W. & Harrison, E. H.  $\beta$ -Apo-13-carotenone regulates retinoid X receptor transcriptional activity through tetramerization of the receptor. *J. Biol. Chem.* **289**, 33118–33124 (2014).
553. Shen, D. *et al.* Emerging roles of bexarotene in the prevention, treatment and anti-drug resistance of cancers. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **18**, 487–499 (2018).
554. Qi, L., Guo, Y., Zhang, P., Cao, X. & Luan, Y. Preventive and therapeutic effects of the retinoid X receptor agonist bexarotene on tumors. *Curr. Drug Metab.* **17**, 118–128 (2016).
555. Altucci, L., Leibowitz, M. D., Ogilvie, K. M., Lera, A. R. De & Gronemeyer, H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 793–810 (2007).
556. Ghosal, K. *et al.* A randomized controlled study to evaluate the effect of bexarotene on amyloid- $\beta$  and apolipoprotein E metabolism in healthy subjects. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2**, 110–120 (2016).
557. Forman, B. M. The antidiabetic agent LG100754 sensitizes cells to low concentrations of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands. *J. Biol. Chem.* **277**, 12503–12506 (2002).
558. Vuligonda, V., Thacher, S. M. & Chandraratna, R. A. S. Enantioselective syntheses of potent retinoid X receptor ligands: Differential biological activities of individual antipodes. *J. Med. Chem.* **44**, 2298–2303 (2001).
559. Atigadda, V. R. *et al.* Conformationally defined rexinoids and their efficacy in the prevention of mammary cancers. *J. Med. Chem.* **58**, 7763–7774 (2015).
560. Atigadda, V. R. *et al.* Methyl substitution of a rexinoid agonist improves potency and reveals site of lipid toxicity. *J. Med. Chem.* **57**, 5370–5380 (2014).
561. Grubbs, C. J. *et al.* Efficacy of new retinoids in the prevention of mammary cancers and correlations with short-term biomarkers. *Carcinogenesis* **27**, 1232–1239 (2006).
562. Atigadda, V. R. *et al.* Conformationally defined retinoic acid analogues. 5. Large-scale synthesis and mammary cancer chemopreventive activity for (2E,4E,6Z,8E)-8-(3',4'-dihydro-1'(2'H)-naphthalen-1'-ylidene)-3,7-dimethyl-2,4,6-octatrienoic acid (9cUAB30). *J. Med. Chem.* **46**, 3766–3769 (2003).
563. Pollinger, J. *et al.* Tuning nuclear receptor selectivity of Wy14,643 towards selective retinoid X receptor modulation. *J. Med. Chem.* **62**, 2112–2126 (2019).
564. Koch, S. S. C. *et al.* Identification of the first retinoid X receptor homodimer antagonist. *J. Med. Chem.* **39**, 3229–3234 (1996).
565. Zhang, K. E. Therapeutic compounds and methods. 1–52 (2017).
566. Boehm, M. F. *et al.* Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J. Med. Chem.* **38**, 3146–3155 (1995).
567. Boehm, M. F. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids. *J. Med. Chem.* **37**, 2930–2941 (1994).
568. Dominguez, M., Alvarez, S. & R. de Lera, A. Natural and structure-based RXR ligand scaffolds and their functions. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**, 631–662 (2017).

569. Duvic, M. *et al.* Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: Multinational phase II-III trial results. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2456–2471 (2001).
570. Pollinger, J. & Merk, D. Therapeutic applications of the versatile fatty acid mimetic WY14643. *Expert Opin. Ther. Pat.* **27**, 517–525 (2017).
571. Xu, J., Storer, P. D., Chavis, J. A., Racke, M. K. & Drew, P. D. Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. *J. Neurosci. Res.* **81**, 403–411 (2005).
572. Kagechika, H. & Shudo, K. Synthetic retinoids: Recent developments concerning structure and clinical utility. *J. Med. Chem.* **48**, 5875–5883 (2005).
573. Vivat-Hannah, V. & Zusi, F. C. Retinoids as therapeutic agents: Today and tomorrow. *Mini Rev. Med. Chem.* **5**, 755–760 (2005).
574. Grenningloh, R. *et al.* Cutting edge: Inhibition of the retinoid X receptor (RXR) blocks T helper 2 differentiation and prevents allergic lung inflammation. *J. Immunol.* **176**, 5161–5166 (2006).
575. Wu, S., Green, W. L., Huang, W., Hays, M. T. & Chopra, I. J. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *THYROID* **15**, 943–958 (2005).
576. Kalyanaraman, H. *et al.* Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Sci. Signal.* **7**, 1–15 (2014).
577. Friesema, E. C. H. *et al.* Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* **278**, 40128–40135 (2003).
578. Visser, W. E., Friesema, E. C. H., Jansen, J. & Visser, T. J. Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 223–236 (2007).
579. Chopra, I. J., Wu, S.-Y., Teco, G. N. C. & Santini, F. A radioimmunoassay for measurement of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate: Studies in thyroidal and nonthyroidal diseases, pregnancy, and neonatal life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**, 189–194 (1992).
580. DeBarber, A. E., Geraci, T., Colasurdo, V. P. & Scanlan, T. S. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to enable quantification of 3-iodothyronamine from serum. *J Chromatogr A.* **1210**, 55–59 (2008).
581. Burger, A. *et al.* Reduced active thyroid hormone levels in acute illness. *Lancet* **307**, 653–655 (1976).
582. Gavin, L. A., Livermore, B. M., Cavalieri, R. R., Hammond, M. E. & Castle, J. N. Serum concentration, metabolic clearance, and production rates of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid in normal and athyreotic man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**, 529–534 (1980).
583. Burger, A. G., Engler, D., Sakoloff, C. & Staeheli, V. The effects of tetraiodothyroacetic and triiodothyroacetic acids on thyroid function in euthyroid and hyperthyroid subjects. *Acta Endocrinol. (Copenh).* **92**, 455–467 (1979).
584. Hoefig, C. S. *et al.* Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1864–1872 (2011).
585. Dietrich, J. W. *et al.* Nonthyroidal illness syndrome in cardiac illness involves elevated concentrations of 3,5-diiiodothyronine and correlates with atrial remodeling. *Eur. Thyroid J.* **4**, 129–137 (2015).
586. Faber, J. *et al.* Kinetic studies of thyroxine, 3,5,3'-triiodothyronine, 3,3,5'-triiodothyronine, 3',5'-diiiodothyronine, 3,3'-diiiodothyronine, and 3'-monoiodothyronine in patients with liver cirrhosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**, 978–984 (1981).
587. Lorenzini, L. *et al.* Assay of endogenous 3,5-diiodo-L-thyronine (3,5-T2) and 3,3'-diiodo-L-thyronine (3,3'-T2) in human serum: A feasibility study. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **10**, 1–7 (2019).

588. Engler, D. & Burger, A. G. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocr. Rev.* **5**, 151–184 (1984).
589. Nakamura, Chopra & Solomon. An assessment of the concentration of acetic acid and propionic acid derivatives of 3, 5, 3-triiodothyronine in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **46**, 91–97 (1978).
590. Köhrle, J. Thyroid hormone transporters in health and disease: Advances in thyroid hormone deiodination. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **21**, 173–191 (2007).
591. Suzuki, T. & Abe, T. Thyroid hormone transporters in the brain. *The Cerebellum* **7**, 75–83 (2008).
592. Visser, W. E., Friesema, E. C. H. & Visser, T. J. Minireview : Thyroid hormone transporters : The knowns and the unknowns. *Mol. Endocrinol.* **25**, 1–14 (2011).
593. Visser, W. E., Mullem, A. A. A. Van, Jansen, J. & Visser, T. J. Molecular and cellular endocrinology the thyroid hormone transporters MCT8 and MCT10 transport the affinity-label N-bromoacetyl-[125I]T3 but are not modified by it. *Mol. Cell. Endocrinol.* **337**, 96–100 (2011).
594. Nicoloff, J. T., Low, J. C., Dussault, J. H. & Fisher, D. A. Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turnover kinetics in man. *J. Clin. Invest.* **51**, 473–483 (1972).
595. Maes, M. *et al.* Components of biological variation, including seasonality, in blood concentrations of TSH, TT3, FT4, PRL, cortisol and testosterone in healthy volunteers. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **46**, 587–598 (1997).
596. Chopra, L. J. An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) in man. *J. Clin. Invest.* **58**, 32–40 (1976).
597. Eskandari, S. *et al.* Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *J. Biol. Chem.* **272**, 27230–27238 (1997).
598. Mondal, S., Raja, K., Schweizer, U. & Muges, G. Chemistry and biology in the biosynthesis and action of thyroid hormones. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 2–27 (2016).
599. Dunn, J. T. & Dunn, A. D. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *THYROID* **11**, 407–414 (2001).
600. Lee, W., Golden, M., Van Herle, A., Lippe, B. & Kaplan, S. Inherited abnormal thyroid hormone-binding protein causing selective increase of total serum thyroxine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **49**, 292–299 (1979).
601. Szkudlinski, M. W., Fremont, V., Ronin, C. & Weintraub, B. D. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* **82**, 473–502 (2002).
602. Chiamolera, M. I. & Wondisford, F. E. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* **150**, 1091–1096 (2009).
603. Dietrich, J. W., Landgrafe, G. & Fotiadou, E. H. TSH and thyrotropic agonists: Key actors in thyroid homeostasis. *J. Thyroid Res.* **2012**, 1–29 (2012).
604. Perello, M. *et al.* Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* **147**, 2705–2716 (2006).
605. Feng, P., Li, Q. L., Satoh, T. & Wilber, J. F. Ligand (T3) dependent and independent effects of thyroid hormone receptors upon human TRH gene transcription in neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 171–177 (1994).
606. Gordon, C. J., Becker, P. & Padnos, B. Comparison of heat and cold stress to assess thermoregulatory dysfunction in hypothyroid rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R2066–R2071 (2000).
607. Langer, F., Földes, O., Macho, L. & Kvetnanský, R. Acute and transient activation of pituitary-thyroid axis during unforced restriction in rats: component of nonshivering thermogenesis in

- conscious animals? *Horm. Res.* **17**, 27–35 (1983).
608. Seoane, L. M., Carro, E., Tovar, S., Casanueva, F. F. & Dieguez, C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul. Pept.* **92**, 25–29 (2000).
609. Auwerx, J. & Staels, B. Leptin. *Lancet* **351**, 737–742 (1998).
610. Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S. & Mantzoros, C. S. Narrative review: The role of leptin in human physiology: Emerging clinical applications. *Ann. Intern. Med.* **152**, 93–100 (2010).
611. Murakami, M. *et al.* Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* **142**, 2961–2967 (2001).
612. Nakao, N. *et al.* Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* **452**, 317–322 (2008).
613. Murakami, M. *et al.* Thyrotropin receptors in brown adipose tissue: Thyrotropin stimulates type II iodothyronine deiodinase and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. *Endocrinology* **142**, 1195–1201 (2001).
614. Rutgers, M. Thyroid hormone metabolism: Importance of deiodination, conjugation and side chain modification. 1–140 (2017).
615. Visser, T. J. Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **92**, 293–303 (1994).
616. Wu, S.-Y. & Visser, T. J. *Thyroid hormone metabolism molecular biology and alternate pathways.* (1994).
617. Zoeller, R. T. New insights into thyroid hormone action in the developing brain : The importance of T3 degradation. *Endocrinology* **151**, 5089–5091 (2010).
618. Gereben, B. *et al.* Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* **29**, 898–938 (2008).
619. Griffith, A. *et al.* Knock-in mouse model for resistance to thyroid hormone (RTH): An RTH mutation in the thyroid hormone receptor beta gene disrupts cochlear morphogenesis. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **03**, 279–288 (2002).
620. Gereben, B., Zeöld, A., Dentice, M., Salvatore, D. & Bianco, A. C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 570–590 (2008).
621. Zavacki, A. M. *et al.* The E3 ubiquitin ligase TEB4 mediates degradation of type 2 iodothyronine deiodinase. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5339–5347 (2009).
622. Bianco, A. C. & Kim, B. W. Deiodinases: Implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* **116**, 2571–2579 (2006).
623. Gereben, B., McAninch, E. A., Ribeiro, M. O. & Bianco, A. C. Scope and limitations of iodothyronine deiodinases in hypothyroidism. *Nat Rev Endocrinol.* **11**, 642–652 (2015).
624. Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J. & Larsen, P. R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* **23**, 38–89 (2002).
625. Larsen, P. R. & Zavacki, A. M. Role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *Eur. Thyroid J.* **1**, 232–242 (2012).
626. Pacifici, G. M. & Coughtrie, M. W. H. *Human cytosolic sulfotransferases.* (Taylor & Francis, 2005).
627. Blanchard, R. L., Freimuth, R. R., Buck, J., Weinshilboum, R. M. & Coughtrie, M. W. H. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* **14**, 199–211 (2004).
628. Kester, M. H. A. *et al.* Sulfation of thyroid hormone by estrogen sulfotransferase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 2577–2580 (1999).

629. Kester, M. H. A. *et al.* Characterization of human iodothyronine sulfotransferases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1357–1364 (1999).
630. Fujita, K., Nagata, K., Ozawa, S., Sasano, H. & Yamazoe, Y. Molecular cloning and characterization of rat ST1B1 and human ST1B2 cDNAs, encoding thyroid hormone sulfotransferases. *J. Biochem.* **122**, 1052–1061 (1997).
631. Li, X., Clemens, D. L. & Anderson, R. J. Sulfation of iodothyronines by human sulfotransferase 1C1 (SULT1C1). *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1713–1716 (2000).
632. Li, X. & Anderson, R. J. Sulfation of iodothyronines by recombinant human liver steroid sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 632–639 (1999).
633. Pietsch, C. A., Scanlan, T. S. & Anderson, R. J. Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases. *Endocrinology* **148**, 1921–1927 (2007).
634. Wang, J., Falany, J. L. & Falany, C. N. Expression and characterization of a novel thyroid hormone-sulfating form of cytosolic sulfotransferase from human liver. *Mol. Pharmacol.* **53**, 274–282 (1998).
635. Peeters, R. P. *et al.* Increased thyroxine sulfate levels in critically ill patients as a result of a decreased hepatic type I deiodinase activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6460–6465 (2005).
636. Hoefig, C. S. *et al.* Does the aromatic L-amino acid decarboxylase contribute to thyronamine biosynthesis? *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**, 195–201 (2012).
637. Hackenmueller, S. A., Marchini, M., Saba, A., Zucchi, R. & Scanlan, T. S. Biosynthesis of 3-iodothyronamine (T1AM) is dependent on the sodium-iodide symporter and thyroperoxidase but does not involve extrathyroidal metabolism of T4. *Endocrinology* **153**, 5659–5667 (2012).
638. Piehl, S., Hoefig, C. S., Scanlan, T. S. & Köhrle, J. Thyronamines - Past, present, and future. *Endocr. Rev.* **32**, 64–80 (2011).
639. Piehl, S. *et al.* Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* **149**, 3037–3045 (2008).
640. Tomita, K., Lardy, H. A., Larson, F. C. & Albright, E. C. Enzymatic conversion of thyroxine to tetraiodothyroacetic acid and of triiodothyronine to triiodothyroacetic acid. *J. Biol. Chem.* **224**, 387–397 (1957).
641. Tata, J. R., Rall, J. E. & Rawson, R. W. Metabolism of L-thyroxine and L-3,5,3'-triiodothyronine by brain tissue preparations. *Endocrinology* **60**, 83–98 (1957).
642. Michel, R., Pitt-Rivers, R., Roche, J. & Varrone, S. Formation of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid from 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 327–335 (1962).
643. Flock, E. V., Bollman, J. L. & Stobie, G. H. C. Metabolic pathways of tetraiodothyroacetic acid, triiodothyroacetic acid, tetraiodothyropropionic acid and triiodothyropropionic acid. *Biochem. Pharmacol.* **11**, 627–637 (1962).
644. Flock, E. V., Bollman, J. L., Grindlay, J. H. & McKenzie, B. F. Metabolites of radioactive L-thyroxine and L-triiodothyronine. *Endocrinology* **61**, 461–473 (1957).
645. Galton, V. A. & Pitt-Rivers, R. The identification of the acetic acid analogues of thyroxine and tri-iodothyronine in mammalian tissues. *Biochem J.* **72**, 319–321 (1959).
646. Albright, E., Lardy, H., Larson, F. & Tomita, K. Enzymatic conversion of thyroxine and triiodothyronine to the corresponding acetic acid analogues. *Endocrinology* **59**, 252–254 (1956).
647. Nakano, M. & Danowski, T. S. Oxidative deamination of L-3,5,3'-triiodothyronine by an extract of rat kidney mitochondria. *Endocrinology* **70**, 340–349 (1962).
648. Soffer, R. L., Hechtman, P. & Savage, M. Triiodothyronine aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **248**, 1224–12230 (1973).
649. Nakano, M., Tsuchiya, S., Shimizu, S., Yamazoe, S. & Danowski, T. S. Deamination of L-



- Thyroxine by Oxidase and Transaminase of Rat Kidney Mitochondria. *Endocrinology* **73**, 237–243 (1963).
650. Kung, M.-P., Spaulding, S. W. & Roth, J. A. Desulfation of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate by microsomes from human and rat tissues. *Endocrinology* **122**, 1195–1200 (1988).
  651. Santini, F., Chopra, I. J., Wu, S. Y., Solomon, D. H. & Chua Teco, G. N. Metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate by tissues of the fetal rat: A consideration of the role of desulfation of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate as a source of T3. *Pediatr. Res.* **31**, 541–544 (1992).
  652. Rutgers, M., Pigmans, I., Bonthuis, F., Docter, R. & Visser, T. Effects of propylthiouracil on the biliary clearance of thyroxine (T4) in rats: decreased excretion of 3,5,3'-triiodothyronine glucuronide and increased excretion of 3,3',5'-triiodothyronine glucuronide and T4 sulfate. *Endocrinology* **125**, 2175–2186 (1989).
  653. Silverman, R. B. Radical ideas about monoamine oxidase. *Acc. Chem. Res.* **28**, 335–342 (1995).
  654. Magyar, K. & Mészáros, Z. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO): Present and future. *Inflammopharmacology* **11**, 165–173 (2003).
  655. Wood, W. J. L., Geraci, T., Nilsen, A., DeBarber, A. E. & Scanlan, T. S. Iodothyronamines are oxidatively deaminated to iodothyroacetic acids in vivo. *ChemBioChem* **10**, 361–365 (2009).
  656. Beedham, C., Peet, C. F., Panoutsopoulos, G. I., Carter, H. & Smith, J. A. Role of aldehyde oxidase in biogenic amine metabolism. *Prog. Brain Res.* **106**, 345–353 (1995).
  657. Teumer, A. *et al.* Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. *Nat. Commun.* **9**, 1–14 (2018).
  658. Han, Q., Cai, T., Tagle, D. A. & Li, J. Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 353–368 (2010).
  659. Thul, P. J. *et al.* A subcellular map of the human proteome. *Science (80-. )*. **356**, 1–12 (2017).
  660. Jalkanen, S. & Salmi, M. Cell surface monoamine oxidases: Enzymes in search of a function. *EMBO J.* **20**, 3893–3901 (2001).
  661. Schüle, R. & Evans, R. M. Cross-coupling of signal transduction pathways: Zinc finger meets leucine zipper. *Trends Genet.* **7**, 377–381 (1991).
  662. Yen, P. M. & Chin, W. W. Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1450–1454 (1994).
  663. Viswakarma, N. *et al.* Coactivators in PPAR-regulated gene expression. *PPAR Res.* **2010**, 1–21 (2010).
  664. Regard, J. B. *et al.* Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *J. Clin. Invest.* **117**, 4034–4043 (2007).
  665. Mousa, S. A. *et al.* Tetraiodothyroacetic acid, a small molecule integrin ligand, blocks angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Angiogenesis* **11**, 183–190 (2008).
  666. Cao, H. J., Lin, H. Y., Luidens, M. K., Davis, F. B. & Davis, P. J. Cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptor- $\beta$ 1 (TR $\beta$ 1) is directed from a plasma membrane integrin receptor by thyroid hormone. *Endocr. Res.* **34**, 31–42 (2009).
  667. Davis, P. J., Lin, H.-Y., Tang, H.-Y., Davis, F. B. & Mousa, S. A. Adjunctive input to the nuclear thyroid hormone receptor from the cell surface receptor for the hormone. *THYROID* **23**, 1503–1509 (2013).
  668. Lin, H.-Y. *et al.* L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: Activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol. Physiol.* **296**, C980–C991 (2009).
  669. Glinskii, A. B. *et al.* Modification of survival pathway gene expression in human breast cancer

- cells by tetraiodothyroacetic acid (tetrac). *Cell Cycle* **8**, 3562–3570 (2009).
670. Hammes, S. R. & Davis, P. J. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 581–593 (2015).
  671. Cody, V., Davis, P. J. & Davis, F. B. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with  $\alpha\beta3$  integrin. *Steroids* **72**, 165–170 (2007).
  672. Mousa, S. A. *et al.* Modulation of angiogenesis by thyroid hormone and hormone analogues: Implications for cancer management. *Angiogenesis* **17**, 463–469 (2014).
  673. Lin, H. Y. *et al.* Thyroid hormone, cancer, and apoptosis. in *Comprehensive Physiology* **6**, 1221–1237 (John Wiley & Sons, Inc., 2016).
  674. Davis, P. J., Sudha, T., Lin, H. Y. & Mousa, S. A. Thyroid hormone, hormone analogs, and angiogenesis. in *Comprehensive Physiology* **6**, 353–362 (John Wiley & Sons, Inc., 2015).
  675. Health Resources and Services Administration. *Orphan Drug Designations and Approvals List as of 6-1-2019 Governs July 1, 2019 - September 30, 2019.* (2019).
  676. Lin, H.-Y. *et al.* Identification and functions of the plasma membrane receptor for thyroid hormone analogues. *Discov. Med.* **11**, 337–347 (2011).
  677. Lin, H.-Y. *et al.* Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site. *Biochemistry* **42**, 7571–7579 (2003).
  678. Lin, H. Y. *et al.* L-Thyroxine of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C980–C991 (2009).
  679. Moeller, L. C. & Broecker-Preuss, M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* **4**, 1–7 (2011).
  680. Lin, H. Y. *et al.* Integrin  $\alpha\text{V}\beta3$  contains a receptor site for resveratrol. *FASEB J.* **20**, 1742–1744 (2006).
  681. Lin, H.-Y. *et al.* Nuclear monomeric integrin  $\alpha\text{v}$  in cancer cells is a coactivator regulated by thyroid hormone. *FASEB J.* **27**, 3209–3216 (2013).
  682. Berry, M. D., Gainetdinov, R. R., Hoener, M. C. & Shahid, M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacol. Ther.* **180**, 161–180 (2017).
  683. Panas, H. N. *et al.* Normal thermoregulatory responses to 3-iodothyronamine, trace amines and amphetamine-like psychostimulants in trace amine associated receptor 1 knockout mice. *J. Neurosci. Res.* **88**, 1962–1969 (2010).
  684. Doyle, K. P. *et al.* Novel thyroxine derivatives, thyronamine and 3-iodothyronamine, induce transient hypothermia and marked neuroprotection against stroke injury. *Stroke* **38**, 2569–2576 (2007).
  685. Snead, A. N. *et al.* Thyronamines inhibit plasma membrane and vesicular monoamine transport. *ACS Chem. Biol.* **2**, 390–398 (2007).
  686. Araki, O., Ying, H., Zhu, X. G., Willingham, M. C. & Cheng, S. Y. Distinct dysregulation of lipid metabolism by unliganded thyroid hormone receptor isoforms. *Mol. Endocrinol.* **23**, 308–315 (2009).
  687. Mottis, A., Mouchiroud, L. & Auwerx, J. Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes Dev.* **27**, 819–835 (2013).
  688. Li, P. *et al.* Adipocyte NCoR knockout decreases PPAR $\gamma$  phosphorylation and enhances PPAR $\gamma$  activity and insulin sensitivity. *Cell.* **147**, 815–826 (2011).
  689. Yamamoto, H. *et al.* NCoR1 is a conserved physiological modulator of muscle mass and oxidative function. *Cell.* **147**, 827–839 (2011).
  690. Araki, O., Ying, H., Furuya, F., Zhu, X. & Cheng, S. Y. Thyroid hormone receptor  $\beta$  mutants:

- Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16251–16256 (2005).
691. Deslex, S., Negrel, R. & Ailhaud, G. Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp. Cell Res.* **168**, 15–30 (1987).
692. Deslex, S., Negrel, R., Vannier, C., Etienne, J. & Ailhaud, G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int. J. Obes.* **11**, 19–27 (1987).
693. Raboudi, N. *et al.* Fasting and postabsorptive hepatic glucose and insulin metabolism in hyperthyroidism. *Am. J. Physiol.* **256**, E159–E166 (1989).
694. Weinstein, S. P., O'Boyle, E., Fisher, M. & Haber, R. S. Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: Evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology* **135**, 649–654 (1994).
695. Viguerie, N. *et al.* Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 630–634 (2002).
696. Clément, K. *et al.* In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res.* **12**, 281–291 (2002).
697. Moeller, L. C., Dumitrescu, A. M., Walker, R. L., Meltzer, P. S. & Refetoff, S. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 936–943 (2005).
698. Medina-Gomez, G., Hernández, A., Calvo, R. M., Martin, E. & Obregón, M. J. Potent thermogenic action of triiodothyroacetic acid in brown adipocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1957–1967 (2003).
699. Cao, W. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3057–3067 (2004).
700. Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–839 (1998).
701. Merk, D., Steinhilber, D. & Schubert-Zsilavecz, M. Characterizing ligands for farnesoid X receptor – available in vitro test systems for farnesoid X receptor modulator development. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 27–37 (2014).
702. Heering, J. & Merk, D. Hybrid reporter gene assays: Versatile in vitro tools to characterize nuclear receptor modulators. in *Methods in Molecular Biology* 175–192 (Humana, New York, NY, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-9195-2\_14
703. Martin, C. S., Wight, P. A., Dobretsova, A. & Bronstein, I. Dual luminescence-based reporter gene assay for luciferase and  $\beta$ -galactosidase. *Biotechniques* **21**, 520–524 (1996).
704. Linkuvienė, V., Krainer, G., Chen, W.-Y. & Matulis, D. Isothermal titration calorimetry for drug design: Precision of the enthalpy and binding constant measurements and comparison of the instruments. *Anal. Biochem.* **515**, 61–64 (2016).
705. Visser, T. J. Thyroid hormone transporters. *Horm Res* **68**, 28–30 (2007).
706. Klostermeier, D. & Millar, D. P. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer: A versatile tool for the analysis of nucleic acids. *Biopoly (Nucleic Acid Sci)* **61**, 159–179 (2002).
707. Carazo, A. & Pávek, P. The use of the LanthaScreen TR-FRET CAR coactivator assay in the characterization of constitutive androstane receptor (CAR) inverse agonists. *Sensors* **15**, 9265–9276 (2015).
708. Festuccia, W. T., Blanchard, P.-G., Richard, D. & Deshaies, Y. Basal adrenergic tone is required for maximal stimulation of rat brown adipose tissue UCP1 expression by chronic PPAR- $\gamma$  activation. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R159–R167 (2010).
709. Picard, F. *et al.* SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**, 931–941 (2002).

710. Mizukami, J. & Taniguchi, T. The antidiabetic agent thiazolidinedione stimulates the interaction between PPAR $\gamma$  and CBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 61–64 (1997).
711. Takahashi, N. *et al.* Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* **277**, 16906–16912 (2002).
712. Lin, S. *et al.* Revealing a steroid receptor ligand as a unique PPAR $\gamma$  agonist. *Cell Res.* **22**, 746–756 (2012).
713. Pap, A., Cuaranta-Monroy, I., Peloquin, M. & Nagy, L. Is the mouse a good model of human PPAR $\gamma$ -related metabolic diseases? *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–22 (2016).
714. Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M. & Brandsch, M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal. Biochem.* **425**, 88–90 (2012).
715. Klemm, D. J. *et al.* Insulin-induced adipocyte differentiation: Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J. Biol. Chem.* **276**, 28430–28435 (2001).
716. Zilberfarb, V., Siquier, K., Strosberg, A. D. & Issad, T. Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor- $\alpha$  expression in human PAZ6 cells. *Diabetologia* **44**, 377–386 (2001).
717. Scott, M. A., Nguyen, V. T., Levi, B. & James, A. W. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **20**, 1793–1804 (2011).
718. Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23–39 (2002).
719. Ginzinger, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* **30**, 503–512 (2002).
720. Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. & Filipowicz, W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**, 57–68 (2004).
721. Pratt, A. J. & MacRae, I. J. The RNA-induced silencing complex: A versatile gene-silencing machine. *J. Biol. Chem.* **284**, 17897–17901 (2009).
722. Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**, 185–197 (2004).
723. Mack, G. S. MicroRNA gets down to business. *Nat. Biotechnol* **25**, 631–638 (2007).
724. Almeida, R. & Allshire, R. C. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol.* **15**, 251–258 (2005).
725. Senese, R., Cioffi, F., De Lange, P., Goglia, F. & Lanni, A. Thyroid: biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. *J. Endocrinol.* **221**, R1–R12 (2014).
726. Araki, O., Ying, H., Furuya, F., Zhu, X. & Cheng, S. Thyroid hormone receptor  $\beta$  mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  action. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 16251–16256 (2005).
727. Patsouris, D. *et al.* PPAR $\alpha$  governs glycerol metabolism. *J. Clin. Invest.* **114**, 94–103 (2004).
728. Castelein, H. *et al.* The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 26754–26758 (1994).
729. Mariash, C. N., Kaiser, F. E., Schwartz, H. L., Towle, H. C. & Oppenheimer, J. H. Synergism of thyroid hormone and high carbohydrate diet in the induction of lipogenic enzymes in the rat. Mechanisms and implications. *J. Clin. Invest.* **65**, 1126–1134 (1980).
730. Blennemann, B., Leahy, P., Kim, T. S. & Freake, H. C. Tissue-specific regulation of lipogenic mRNAs by thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* **110**, 1–8 (1995).
731. Bianco, A. C., Carvalho, S. D., Carvalho, C. R. F., Rabelo, R. R. & Moriscot, A. S. Thyroxine

- 5'-deiodination mediates norepinephrine-induced lipogenesis in dispersed brown adipocytes. *Endocrinology* **139**, 571–578 (1998).
732. Moustaid, N. & Sul, H. S. Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine. *J. Biol. Chem.* **266**, 18550–18554 (1991).
733. Obregon, M. Metabolic effects of thyroid hormones in vitro. *THYROID* **18**, 185–195 (2008).
734. Szapary, P. O. *et al.* Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 182–188 (2006).
735. Fonseca, V. Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **115**, 42–48 (2003).
736. Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G. & Chrousos, G. Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Med.* **9**, 1–13 (2011).
737. Tanaka, T. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  induces fatty acid  $\beta$ -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15924–15929 (2003).
738. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84 (2016).
739. Ratziu, V. *et al.* Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and - $\delta$ , induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening. *Gastroenterology* **150**, 1147–1159 (2016).
740. Sanyal, A. J. *et al.* A Pilot Study of Vitamin E Versus Vitamin E and Pioglitazone. **3565**, 1107–1115 (2004).
741. European Association for the Study of the Liver (EASL) European Association for the Study of Diabetes (EASD) and European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **64**, 1388–1402 (2016).
742. Oseini, A. M. & Sanyal, A. J. Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver Int.* **37**, 97–103 (2017).
743. Caldwell, S. H. *et al.* A pilot study of a thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 519–525 (2001).
744. Rau, O. *et al.* Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Planta Med.* **72**, 881–887 (2006).
745. Heitel, P., Achenbach, J., Moser, D., Proschak, E. & Merk, D. DrugBank screening revealed alitretinoin and bexarotene as liver X receptor modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 1193–1198 (2017).
746. Flesch, D. *et al.* Nonacidic farnesoid X receptor modulators. *J. Med. Chem.* **60**, 7199–7205 (2017).
747. Schmidt, J. *et al.* NSAIDs ibuprofen, indometacin, and diclofenac do not interact with farnesoid X receptor. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
748. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
749. Evans, P. R. & Murshudov, G. N. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **69**, 1204–1214 (2013).
750. McCoy, A. J. Acknowledging errors: Advanced molecular replacement with phaser. *Methods Mol Biol.* **1607**, 421–453 (2017).
751. Emsley, P. Tools for ligand validation in coot. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* **73**, 203–210 (2017).

752. Skubák, P., Murshudov, G. N. & Pannu, N. S. Direct incorporation of experimental phase information in model refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**, 2196–2201 (2004).
753. Glatzel, D. K. *et al.* Acetyl-CoA carboxylase 1 regulates endothelial cell migration by shifting the phospholipid composition. *J. Lipid Res.* **59**, 298–311 (2018).
754. Schwenk, R. *et al.* The pretubulysin-induced exposure of collagen is caused by endothelial cell retraction that results in an increased adhesion and decreased transmigration of tumor cells. *Oncotarget* **8**, 77622–77633 (2017).

## 9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei PD Dr. Daniel Merk und Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec für die sehr gute Betreuung bedanken.

PD Dr. Daniel Merk möchte ich besonders danken dafür, dass du mir trotz intensiver Betreuung immer auch genug Freiheiten gelassen hast und mir ermöglicht hast durch zahlreiche Kooperationen auch andere Arbeitskreise und Methoden kennenzulernen. Danke, dass du für jedes Problem eine Lösung hast und immer positive Ratschläge gibst.

Dank Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec konnte ich im 6.Semester ein Praktikum in seinem Arbeitskreis absolvieren und habe dort den Spaß am Studium wiedergefunden und letztendlich 4 schöne Jahre in seiner Arbeitsgruppe verbracht. Danke auch für die vielen schönen Arbeitsgruppen-Seminare in Aigen, Zürich und Montafon.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Robert Fürst und seinem Arbeitskreis bedanken. Insbesondere durch die Betreuung durch Dr. Iris Bischoff-Kont konnte ich meine Thesis letzten Endes erfolgreich gestalten. Danke Iris für die menschlich und fachlich sehr gute Betreuung. Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Fürst, die immer gute Ansprechpartner waren und mich sehr gut unterstützt haben.

Danke auch an Dr. Alexander Paulke und Werner Pogoda vom Institut für Forensische Toxikologie für die Möglichkeit einige Versuche im forensischen Institut durchzuführen und die kompetente Betreuung während dieser Zeit.

Vielen Dank auch für die Unterstützung meines Projekts durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. Eugen Proschak, insbesondere von Dr. Jan Heering und Whitney Kilu.

Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Stefan Knapp und Dr. Apirat Chaikwad für die Kristallstruktur-Analyse und die Unterstützung bei meiner Publikation bedanken.

Auch bei Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Dr. Astrid Kahnt und Tamara Goebel möchte ich mich für die Mithilfe bei meinem Projekt bedanken.

Danke auch an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec. Besonders bedanken möchte ich mich bei Julius Pollinger dafür, dass er mit mir die letzten neun Jahre verbracht hat und immer ein super kompetenter, witziger, ehrlicher, unfassbar netter Freund und Laborpartner war. Danke, dass du immer für mich da warst und du so ein toller Mensch bist. Ich wünsche dir das Allerbeste für die Zukunft und dass wir auch in 50 Jahren noch mit einem Hacker-Pschorr anstoßen.

Danke auch an Sun-Yee Cheung und Simone Schierle, die uns im Tennis immer gewinnen lassen haben. Und danke Simone, dass du immer mein Zimmerpartner warst und wir so viel Spaß zusammen hatten.

Danke an Sabine Willems für das Korrektur lesen meiner Doktorarbeit und die schöne Zeit im Labor!

Und Danke an Pascal Heitel, Jurema Schmidt, Silvia Arifi, Moritz Helmstätter, Julia Ohrndorf, Guiseppe Faudone, Astrid Kaiser und Mario Wurglics.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken. Danke Mama, Papa und Marius, dass ihr immer für mich da seid und mich unterstützt. Ich bin sehr froh drei so tolle Menschen um mich zu haben.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich in der Doktoranden-Zeit sehr unterstützt haben:

Danke Vicky, dass du meine Arbeit Korrektur gelesen hast und die beste Schwägerin bist, die ich mir wünschen konnte.

Danke an meinen besten Freund Dominic und an Yolanda für die vielen schönen Abende, Urlaube und Belgien-Touren.

Danke an meine beste Freundin Sandra für die über 20 Jahre, die wir schon befreundet sind und dafür, dass du immer für mich da bist.

Danke auch an Nuno, Mary, Sasi, Svenja, Vanessa und Tim.

Und Danke an die Uni-Clique Julia, Hannah, Sepp, Sam, Julian, Martin, Thomas und Julia, Andy, Doro und Prisca ohne die das Studium nur halb soviel Spaß gemacht hätte.



## 10 Copyrights und Kooperationspartner

Die Abbildungen wurden zum Teil mit Hilfe von *medical images*, die auf der Homepage <http://smart.servier.com> verfügbar sind, angefertigt.

Sofern nicht durch einen Verweis oder Anerkennung anders angegeben, wurde die hier vorliegende Arbeit von mir unter der Aufsicht meines Betreuers während meiner Promotion erstellt. Auf alle Beiträge von Kollegen oder Kooperationspartnern wird zudem im experimentellen Teil der Arbeit ausdrücklich verwiesen. Die nachfolgend aufgeführten Experimente wurden im Rahmen von Kooperationen durchgeführt:

- Alle HTR-FRET-Assays wurden von Dr. Jan Heering und Whitney Kilu durchgeführt.
- Die Kristallstruktur von TETRAC (**4**) in der PPAR $\gamma$ -LBD wurde von Dr. Apirat Chaikuad gelöst.
- Die Experimente zur Adipocyten-Differenzierung wurden in Zusammenarbeit mit Tamara Goebel und Dr. Astrid Kahnt durchgeführt. Die *Oil Red O* Färbung wurde von Tamara Goebel und Dr. Astrid Kahnt ausgeführt und die qPCR-Quantifizierung wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz von Dr. Pascal Heitel und PD Dr. Daniel Merk durchgeführt.
- Die *knockdown* Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Robert Fürst und Dr. Iris Bischoff durchgeführt.
- Die Quantifizierung von Thyroidhormonen nach Inkubation mit HepG2 Zellen mit LC-MS/MS wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut der Forensische Toxikologie der Goethe Universität Frankfurt, insbesondere Dr. Alexander Paulke und Werner Pogoda durchgeführt. Die Probenaufarbeitung wurde eigenständig ausgeführt. Die Methodenentwicklung wurde von Dr. Alexander Paulke und Werner Pogoda übernommen und die Auswertung in Zusammenarbeit durchgeführt.
- Die Synthese und Charakterisierung von Br-T4 (**92**) und Br-TETRAC (**93**) wurde von Dr. Pascal Heitel durchgeführt.
- Die *in vivo*-Phase des Tierversuchs mit Br-T4 (**92**) wurde durch den Dienstleister Pharmacelsus (Saarbrücken, Deutschland) durchgeführt. Die pharmakologischen Studien an den Organen der Tiere wurden eigenständig durchgeführt.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

### ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den .....

Unterschrift

### EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

#### **Modulation nukleärer Rezeptoren durch Thyroidhormone und deren Metabolite**

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den .....

Unterschrift

## 12 Lebenslauf

Leonie Gellrich

Apothekerin

████████████████████

████████████████

████████████████

gellrich@pharmchem.uni-frankfurt.de

Geburtsdatum: 17.05.1991

Geburtsort: Wiesbaden

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Promotion

12/2015 – 11/2019

**Institut für pharmazeutische Chemie,**

**Arbeitskreis Prof. Manfred Schubert-Zsilavecz (Betreuung PD Dr. Daniel Merk),**

**Goethe-Universität, Frankfurt am Main**

Forschungsthema: Modulation nukleärer Rezeptoren durch Thyroidhormone und deren Metabolite

### Studium

10/2010 – 10/2015

**Pharmazie, Goethe-Universität, Frankfurt am Main**

1. Staatsexamen ( $\bar{x}$  = 2,75) Aug 2012

2. Staatsexamen ( $\bar{x}$  = 1,8) Okt 2014

3. Staatsexamen ( $\bar{x}$  = 1,0) Dez 2015

### Schulabschluss

06/2010

**Allgemeine Hochschulreife, Carl-von-Ossietzky-Schule,**

**Wiesbaden**

Abschlussnote: 1,6

### Schulzeit

2007 – 2010

**Oberstufe, Carl-von-Ossietzky-Schule, Wiesbaden**

2001 – 2007

**Mittelstufe, Nikolaus-August-Otto-Schule, Bad Schwalbach**

1997 – 2001

**Grundschule, Regenbogenschule, Taunusstein-Bleidenstadt**

## Praktika

- 05/2015 – 10/2015      **Pharmazeutin im Praktikum, Sanofi, Frankfurt am Main**
- LGCR Analytical Sciences FF im Bereich Forschung und Entwicklung
- 11/2014 – 04/2015      **Pharmazeutin im Praktikum, Metropolitan Pharmacy, Frankfurt am Main**
- 08/2011 – 08/2011      **Famulatur, Brunnenapotheke, Wiesbaden**
- 04/2011 – 04/2011      **Famulatur, Apotheke im toom, Taunusstein-Bleidenstadt**
- 07/2010 – 08/2010      **Praktikum, Helios Vogtland-Klinikum, Plauen**
- Krankenhausapotheke

## Fremdsprachenkenntnisse

Englisch                      Fließend

## Zertifikate & Auszeichnungen

- 10/2019                      **Zertifikat nach §15 GenTSV: Sicherheit in der Gentechnik**
- 03/2019                      **EUFEPS WIPS Women in Pharmaceutical Sciences Award**
- 06/2018                      **Zertifikat Hochschullehre**

## Publikationen in *peer-review journals*

**Gellrich L**, Heitel P, Heering J, Kilu W, Goebel T, Kahnt A, Arifi S, Pollinger J, Pogoda W, Paulke A, Steinhilber D, Proschak E, Wurglics M, Schubert-Zsilavec M, Chaikuad A, Knapp S, Bischoff I, Fürst R, Merk D. L-thyroxin and the non-classical thyroid hormone TETRAC are potent activators of PPAR $\gamma$  and RXR. submitted

Pollinger J, **Gellrich L**, Schierle S, Kilu W, Schmidt J, Kalinowsky L, Ohrndorf J, Kaiser A, Heering J, Proschak E, Merk D. Tuning nuclear receptor selectivity of Wy14,643 towards selective retinoid X receptor modulation. *J Med Chem.* **2019** Feb; 62(4):2112-2126.

Heitel P, **Gellrich L**, Kalinowsky L, Heering J, Kaiser A, Ohrndorf J, Proschak E, Merk D. Computer-assisted discovery and structural optimization of a novel retinoid X receptor agonist chemotype. *ACS Med Chem Lett.* **2019** Jan; 10(2):203-208.

Heitel P, **Gellrich L**, Heering J, Goebel T, Kahnt A, Proschak E, Schubert-Zsilavec M, Merk D. Urate transporter inhibitor lesinurad is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator (sPPAR $\gamma$ M) in vitro. *Sci Rep.* **2018** Sep; 8(1):13554.

Schmidt J, Schierle S, **Gellrich L**, Kaiser A, Merk D. Structural optimization and in vitro profiling of N-phenylbenzamide-based farnesoid X receptor antagonists. *Bioorg Med Chem.* **2018** Aug; 26(14):4240-4253.

**Gellrich L**, Merk D. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor modulation in non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Nuclear Receptor Research* **2017** Dec; 1(1):1-52.

## Publikationen in Fachzeitschriften

**Gellrich L**, Schubert-Zsilavecz M. Neue Therapieoptionen zur Behandlung der Gicht. *Pharmakon*, **2016**, Vol. 4, Nr. 5, pp. 436-444(9).

**Gellrich L**, Schubert-Zsilavecz M. Lesinurad Neues Wirkprinzip bei Gicht. *Pharmazeutische Zeitung*, **2016**, Ausgabe 6

## Abstracts und Posterbeiträge auf Tagungen

EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Athen (01. - 05.09.**2019**): **Gellrich L**, Heitel P, Heering J, Kilu W, Goebel T, Kahnt A, Arifi S, Pollinger J, Pogoda W, Paulke A, Steinhilber D, Proschak E, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M, Chaikuad A , Knapp S, Bischoff I, Fürst R, Merk D. PPAR $\gamma$  as a new target of thyroid hormones.

DPhG-Doktorandentagung bei Merck, Darmstadt (27. - 29.03.**2019**): **Gellrich L**, Heitel P, Heering J, Kilu W, Goebel T, Kahnt A, Arifi S, Pollinger J, Pogoda W, Paulke A, Steinhilber D, Proschak E, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M, Chaikuad A , Knapp S, Bischoff I, Fürst R, Merk D. PPAR $\gamma$  as a new target of thyroid hormones.

EUFEPS Annual Meeting, Frankfurt am Main (06. - 08.03.**2019**): **Gellrich L**, Heitel P, Heering J, Kilu W, Goebel T, Kahnt A, Arifi S, Pollinger J, Pogoda W, Paulke A, Steinhilber D, Proschak E, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M, Chaikuad A , Knapp S, Bischoff I, Fürst R, Merk D. PPAR $\gamma$  as a new target of thyroid hormones.

Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, Hamburg (02. - 05.10.**2018**): **Gellrich L**, Schubert-Zsilavecz M, Merk D. Improvement of a dual FXR/PPAR $\alpha$  agonist for the treatment of NASH.

Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, Saarbrücken (26. - 29.09.**2017**): **Gellrich L**, Schubert-Zsilavecz M, Merk D. New opportunities for the treatment of NASH.

Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, München (04. - 07.10.**2016**): **Gellrich L**, Schubert-Zsilavecz M, Merk D. Improvement of anthranilic acid derivatives as a dual agonist of FXR and PPAR $\alpha$ .

## Weitere Tagungsbesuche

LIPID MEETING, Leipzig (07. - 09.12.**2017**)