

Entwicklung von chemischen Tools für nukleäre Rezeptoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Silvia Arifi

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2023)

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Daniel Merk
Prof. Dr. Stefan Knapp

Datum der Disputation: 21.12.2023

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzwerfen.“

Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Nukleäre Rezeptoren	1
1.1.1 Einteilung	1
1.1.1.1 Einteilung nach Phylogenese	2
1.1.1.2 Einteilung nach dem molekularen Mechanismus.....	3
1.1.2 Struktur und Funktion.....	4
1.1.2.1 Strukturelle Merkmale und Funktions-Mechanismen.....	4
1.1.2.2 Allosterie	7
1.2 NR4A- und Peroxisomen-Proliferator-aktivierende-Rezeptoren.....	11
1.2.1 Nukleäre Rezeptoren der NR4A-Familie.....	11
1.2.1.1 Physiologische Rolle	12
1.2.1.2 Liganden der NR4A-Familie.....	23
1.2.2 Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ	30
1.2.2.1 Physiologische Rolle von PPAR γ	30
1.2.2.2 Liganden des PPAR γ -Rezeptors	31
2. Motivation und Zielsetzung	38
3. Ergebnisse und Diskussion	40
3.1 NR4A-Familie.....	40
3.1.1 Arzneistoff-Fragment-Screening.....	40
3.1.2 Charakterisierung der Screening-Hits.....	41
3.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung der neu identifizierten Nur77-Liganden	43
3.1.4 Docking-getriebene Fragmenterweiterung	46
3.1.5 Charakterisierung der Docking-Hits.....	49
3.1.6 Charakterisierung neuer NOR-1 Modulatoren.....	51
3.2 Entwicklung und Charakterisierung eines selektiv allosterischen PPARγ-Liganden .	53
3.2.1 Identifikation eines allosterischen Liganden	54
3.2.2 Struktur basiertes Design und Synthese	56
3.2.3 Molekulare Modellierung	65
3.2.4 Charakterisierung des allosterischen PPAR γ -Liganden	66
3.2.4.1 Zelluläre Tests	66
3.2.4.2 Differentielle Scanning Fluorometrie	68
3.2.4.2 Kristallisierung.....	69
3.2.4.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	72
3.2.4.4 MS-basierter-PPAR γ -Ligandenbindungs-Assay	73
3.2.4.5 Molekulare Effekte – Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay	75
3.2.4.6 PPAR γ -RXR α -Heterodimerisierungs-Assay	77
3.2.4.7 Adipozyten-getriebene mesenchymale Stammzellendifferenzierung	77
3.2.4.8 Differentielle Genexpressionsanalyse von Hepatozyten.....	79
3.2.4.9 Beobachtung von FOXO-Phosphorylierung und Aktivität.....	84
4. Zusammenfassung und Ausblick	85
5. Experimenteller Teil	97
5.1 Chemisch-synthetischer Teil.....	97
5.1.1 Synthese und analytische Daten von Derivaten für Nur77	98

5.1.2 Synthese und analytische Daten des allosterischen PPAR γ -Ligand.....	100
5.2 PPARγ-LBD-Expression, Aufreinigung und Kristallisation	104
5.3 Bindungs-Assays.....	105
5.3.1 Differentielle Scanning Fluorometrie.....	105
5.3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie.....	106
5.3.3 MS-basierter PPAR γ -Ligandbindungs-Assay.....	107
5.4 Reporter-gen-Assays	108
5.4.1 Kultivierung der verwendeten Zellen	108
5.4.2 Hybrid-Reporter-gen-Assay	108
5.4.3 PPAR γ -PPRE-Assay	110
5.4.4 Nur77-Volllängen-Assay	110
5.5 PPARγ-Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay	111
5.6 Konzentrationsabhängiger PPARγ-Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay	113
5.7 PPARγ-RXRα-Heterodimerisierungs-Assay	113
5.8 PPARγ-Phosphorylierung an Ser273	114
5.9 Toxizitäts-Assay	115
5.10 Effekte an der GATA2-Expression in HeLa-Zellen.....	116
5.11 Adipozyten-getriebene mesenchymale Stammzellendifferenzierung	117
5.12 Differentielle Genexpressionsanalyse von Hepatozyten.....	118
5.13 Beobachtung der FOXO-Phosphorylierung und Aktivität	120
5.14 Molekulares Docking	122
6. Literatur	125
7. Abkürzungsverzeichnis	143
8. Abbildungsverzeichnis	145
9. Schemenverzeichnis	150
10. Tabellenverzeichnis	152
11. Publikationsliste	153
12. Kooperationspartner	154
13. Curriculum Vitae.....	156
14. Eidesstattliche Erklärung	156
15. Danksagung	158

1. Einleitung

Nukleäre Rezeptoren (NRs) stellen seit mehreren Jahrzehnten ein sehr attraktives Forschungsgebiet für die Arzneistoffentwicklung dar, da sie in vielfältige wichtige physiologische (wie Metabolismus, Immunantwort, Enzymaktivität, Zelldifferenzierung) und pathologische (wie Krebs, Immunsuppression, Rheumatoide Arthritis, Asthma, metabolisches Syndrom) Prozesse unseres Körpers involviert sind¹. Die ersten Liganden für NRs wurden bereits in den 30er (Ethinylestradiol) und 40er (Cortison) Jahren des 20. Jahrhunderts noch vor Identifikation der Rezeptoren entdeckt². Mitte der 1980er Jahre gelang es die ersten Hormon-Rezeptoren zu isolieren und zu klonieren³ und bis heute stellen NRs wichtige therapeutische Zielstrukturen dar. Zur Zeit rückt dabei unter anderem die Rolle von NRs in neurodegenerativen Erkrankungen immer mehr in den Fokus^{4,5}. Neben der Entwicklung von Liganden für klassische NRs, spielt besonders die Entwicklung von Liganden für die sogenannten Waisenrezeptoren, die keinen bekannten endogenen Liganden haben, eine wichtige Rolle^{6,7}. Ebenso ist in den vergangenen Jahren ein gesteigertes Interesse an alternativen Liganden, die nicht die viel beforschte orthosterische Bindungstasche, sondern alternative Epitope adressieren, zu verzeichnen. Die Entwicklung solcher allosterischer Liganden könnte in der Zukunft zu einem besseren Verständnis von bereits bekannten und zur Identifikation von noch unbekanntem Wirkmechanismen führen und somit neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen⁸⁻¹⁰.

Diese Arbeit untergliedert sich im Folgenden in zwei Themengebiete, die ihre Gemeinsamkeit in dem Anspruch finden, innovative Liganden für den Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor γ (PPAR γ , NR1C3) und die Waisenrezeptoren Nervenwachstumsfaktor-induzierter Klon B (Nur77, NGFI-B, NR4A1) und Neuronen-abgeleiteter Waisenrezeptor (NOR-1, NR4A3) zu finden.

1.1 Nukleäre Rezeptoren

1.1.1 Einteilung

NRs sind Ligand-aktivierbare Transkriptionsfaktoren, die zu einer großen Superfamilie aus 48 humanen Mitglieder gehören¹. Die Kategorisierung in Gruppen kann auf unterschiedliche Weise geschehen. Im Folgenden werden zwei gängige Methoden beschrieben.

1. Einleitung

1.1.1.1 Einteilung nach Phylogenese

Aufgrund der Schwierigkeiten der Benennung von Waisenrezeptoren und Mehrfachbenennung von identischen Rezeptoren wurde vom Nuclear Receptors Nomenclature Committee eine einheitliche Einteilung von NRs aufgrund der Phylogenese erstellt. Dabei erfolgt die Einteilung in 7 Gruppen (0-6), aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) und Ligandenbindungsdomäne (LBD). In die Gruppe 0 werden die Rezeptoren eingeordnet, die nur eine DBD oder LBD beinhalten. Zusätzlich zu dieser Einteilung wurde noch ein Nomenklatorsystem entwickelt, das eine eindeutige und fortlaufende Bezeichnung von NRs ermöglicht. Für die Entwicklung dieses Systems orientierte man sich an einem bereits bestehenden und funktionierenden System für die Bezeichnung von Cytochrom P450 Enzymen. Tabelle 1 listet alle 48 humanen NRs mit Trivialnamen und phylogenetischen Namen auf¹¹.

Tabelle 1: Superfamilie der 48 humanen NRs.

TRIVIALNAME	ABKÜRZUNG	NOMENKLATUR
THYROID HORMONE RECEPTOR	THR α	NR1A1
	THR β	NR1A2
RETINOIC ACID RECEPTOR	RAR α	NR1B1
	RAR β	NR1B2
	RAR γ	NR1B3
PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR	PPAR α	NR1C1
	PPAR β	NR1C2
	PPAR γ	NR1C3
REVERSE ERBA	Rev-erb α	NR1D1
	Rev-erb β	NR1D2
RAR-RELATED ORPHAN RECEPTOR	ROR α	NR1F1
	ROR β	NR1F2
	ROR γ	NR1F3
LIVER X RECEPTOR	LXR α	NR1H3
	LXR β	NR1H2
FARNESOID X RECEPTOR	FXR α	NR1H4
VITAMIN D RECEPTOR	VDR	NR1I1
PREGNANE X RECEPTOR	PXR	NR1I2
CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR	CAR	NR1I3
HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 4	HNF4 α	NR2A1
	HNF γ	NR2A2
RETINOID X RECEPTOR	RXR α	NR2B1
	RXR β	NR2B2
	RXR γ	NR2B3
TESTICULAR RECEPTOR	TR2	NR2C1
	TR4	NR2C2
TAILLESS RECEPTOR	TLX	NR2E2
PHOTORECEPTOR-SPECIFIC NUCLEAR RECEPTOR	PNR	NR2E3
	COUP-TFI	NR2F1

1. Einleitung

TRIVIALNAME	ABKÜRZUNG	NOMENKLATUR
CHICKEN OVALBUMIN UPSTREAM PROMOTER-TRANSCRIPTION FACTOR	COUP-TFII	NR2F2
V-ERBA-RELATED PROTEIN	EAR2	NR2F6
ESTROGEN RECEPTOR	Er α	NR3A1
	Er β	NR3A2
ESTROGEN-RELATED RECEPTOR	ERR α	NR3B1
	ERR β	NR3B2
	ERR γ	NR3B3
GLUCOCORTICOID RECEPTOR	GR	NR3C1
MINERALCORTICOID RECEPTOR	MR	NR3C2
PROGESTERON RECEPTOR	PR	NR3C3
ANDROGEN RECEPTOR	AR	NR3C4
NERVE GROWTH FACTOR IB	NFGIB/Nur77	NR4A1
NUR-RELATED FACTOR 1	NURR1	NR4A2
NEURON-DERIVED ORPHAN RECEPTOR 1	NOR-1	NR4A3
STEROIDOGENIC FACTOR 1	SF1	NR5A1
LIVER RECEPTOR HOMOLOG 1	LRH1	NR5A2
GERM CELL NUCLEAR FACTOR	GCNF	NR6A1
DOSAGE-SPECIFIC SEX REVERSAL-ADRENAL HYPOPLASIA CONGENITA CRITICAL REGION ON THE X CHROMOSOME-1	DAX1	NR0B1
SHORT HETERODIMERIC PARTNER	SHP	NR0B2

1.1.1.2 Einteilung nach dem molekularen Mechanismus

Neben der Einteilung nach Phylogenese, ist eine weitere Möglichkeit NRs nach ihrem molekularen Mechanismus einzuteilen. Dabei erfolgt die Unterteilung in vier Klassen (I-IV) nach ihren Dimerisierungs- und DNA-Bindungseigenschaften.

NRs der Klasse I (Steroidrezeptoren) sind in der Abwesenheit eines Liganden im Cytosol lokalisiert und dort an Hitzeschockproteine gebunden. Nach der Bindung eines Liganden an den Rezeptor werden die Hitzeschockproteine freigesetzt und der Steroidrezeptor transloziert als Homodimer in den Zellkern, rekrutiert dort Co-Aktivatoren, bindet an die DNA und moduliert die Transkription von Zielgenen¹².

NRs der Klasse II (RXR-Heterodimere) bilden mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR, NR2B1-3) Heterodimere. Dabei kann zwischen permissiven und nicht permissiven Heterodimeren unterschieden werden. Permissive Heterodimere, wie PPAR (NR1C1-3), zeichnen sich dadurch aus, dass für die Aktivierung des Dimers nur ein Ligand eines Partners binden muss. Bei einer Bindung von beiden Liganden, führt das zu einer synergistischen Aktivierung. Bei nicht permissiven Heterodimeren, wie dem Thyroidhormon-Rezeptor (TR, NR1A1-2), reicht die Bindung des RXR-Liganden für eine Aktivierung nicht aus, diese können nur durch die Anwesenheit eines Agonisten des Partners aktiviert werden¹³.

1. Einleitung

Die NRs der Klassen III und IV spielen pharmakologisch noch eine untergeordnete Rolle, da es sich hier weitestgehend um Waisenrezeptoren handelt. NRs der Klasse III können wie NRs von Klasse I Homodimere formen, jedoch unterscheiden sich hier die Erkennungssequenzen. Rezeptoren der Klasse I binden die DNA über Response-Elemente (RE) mit invertierten Sequenzwiederholungen, Klasse III Rezeptoren dagegen über REs mit direkten Sequenzwiederholungen¹⁴. Rezeptoren der Klasse IV binden die REs der DNA als Monomere¹².

1.1.2 Struktur und Funktion

1.1.2.1 Strukturelle Merkmale und Funktions-Mechanismen

NRs weisen gemeinsame charakteristische strukturelle Merkmale auf und bestehen aus fünf bis sechs Domänen: N-terminale Domäne (NTD, A/B-Region), DBD (C-Region), Gelenk-Region (Hinge-Region, D-Region), LBD (E-Region) und C-terminale Domäne (F-Region) (Abbildung 1).

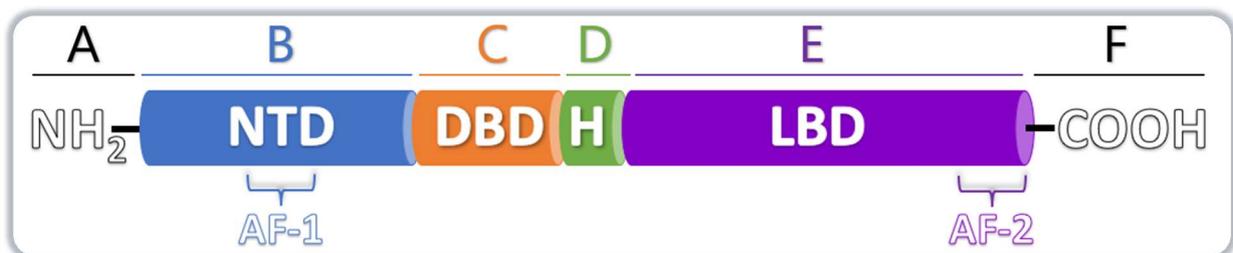


Abbildung 1: Allgemeiner struktureller Aufbau von nukleären Rezeptoren. H = Hinge-Region.

Sie werden vom N- bis zum C-terminalen Ende mit den Buchstaben A bis F benannt. Die variable NTD beinhaltet eine transkriptionelle Aktivierungsfunktion 1 (AF-1), die ligandenunabhängig operiert. Zudem finden hier posttranslationale Modifikationen, sowie Interaktionen mit sogenannten Co-Regulatoren und anderen Transkriptionsfaktoren statt¹⁵.

Neben der NTD befindet sich die DBD, welche über die ganze Familie der Kernrezeptoren hochkonserviert ist. Sie setzt sich aus circa 66 Aminosäuren zusammen, die typischerweise aus zwei cysteinreichen Zink-Finger Domänen, zwei alpha-Helices und einer carboxyterminalen Verlängerung bestehen¹⁶. Die beiden Zink-Finger bilden sich über tetraedrische Komplexe aus insgesamt neun Cysteinresten, zusammen mit anderen Aminosäuren und zwei Zink-Ionen sorgen sie für eine hochaffine DNA-Bindung^{13,16}. Innerhalb der DBD lassen sich vier Sequenzelemente unterscheiden, die als P-, D-, T- und A-Box bezeichnet werden. Diese Sequenzelemente definieren oder tragen zu der Spezifität der RE bei und stellen darüber hinaus Dimerisierungsschnittstellen innerhalb der DBD dar¹⁷. Die P-Box ist ein hoch konservierter Bereich, der sich im ersten Zink-Finger (N-terminaler Zinkfinger) zwischen den letzten zwei Cystein-Resten befindet

1. Einleitung

und für die Unterscheidung von DNA-Erkennungsmotiven entscheidend ist¹⁸. Im zweiten Zinkfinger (C-terminaler Zinkfinger) befindet sich ein ebenfalls konservierter Bereich, die D-Box, die an der Dimerisierung beteiligt ist¹⁷. Die DBD ist ebenfalls das Ziel von translationalen Modifikationen, ist an der nuklearen Lokalisierung beteiligt und kann mit Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren interagieren¹⁷ (Abbildung 2)¹⁹.

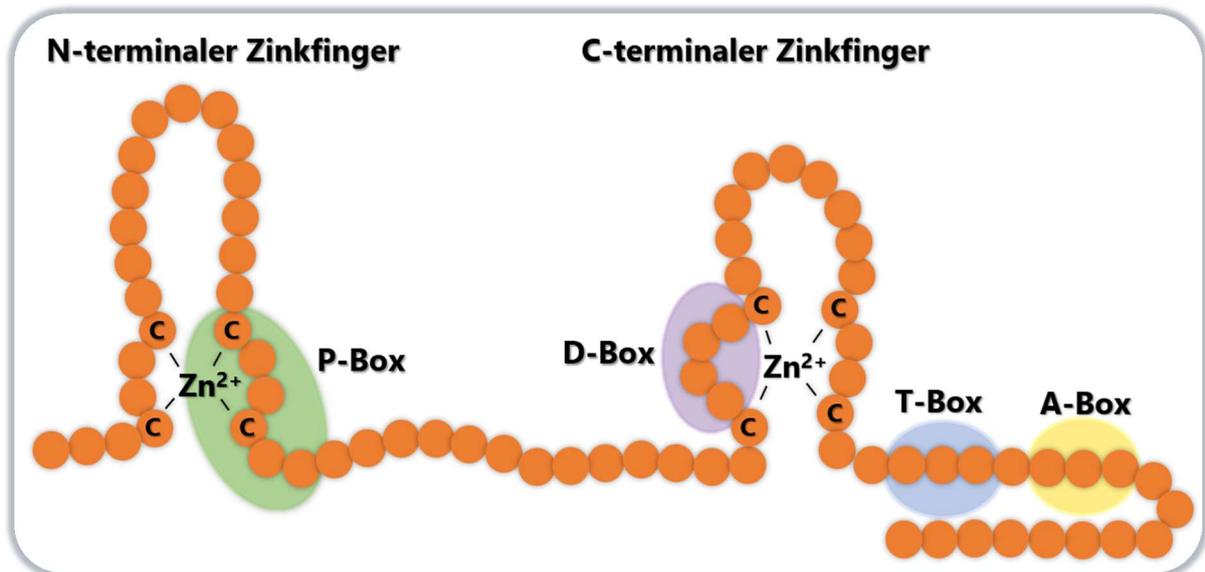


Abbildung 2: Schematisierte Darstellung der DBD. P-Box (grün), D-Box (violett), T-Box (blau) und A-Box (gelb) sind farblich hervorgehoben. (C = Cystein). Adaptiert von Referenz 19.

Die Gelenk-Region verbindet die beiden Domänen DBD und LBD. Sie ist eine schwach konservierte Region, die eine Rotation der DBD ermöglicht, sodass diese ohne sterische Hinderung unterschiedliche Konformationen einnehmen kann um die Bildung von Dimeren zu ermöglichen¹³.

Im Vergleich zur DBD ist die LBD weniger konserviert. Sie ist zuständig für die Vermittlung der Ligandenbindung und Dimerisierung und beinhaltet die ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion 2 (AF-2)¹³. Die LBD setzt sich in der Regel aus einer charakteristischen Struktur die aus einer kurzen beta-Schleife (s1 und s2) und insgesamt meist zwölf α -Helices (H1-H12), die ein dreischichtiges antiparalleles alpha-helikales „Sandwich“ bilden, zusammen¹⁷. Die Helices H1 bis H3 bilden den oberen und die Helices H6, H7 und H10 den unteren Teil, während die Helices H4, H5, H8, H9 sowie der N-terminale Teil von H11 zwischen ihnen eingebettet sind^{20,21}. Die hydrophobe Ligandenbindetasche (*ligand-binding pocket*, LBP) bildet in den meisten Fällen den unteren Bereich dieses „Sandwiches“^{22,20,23}. Die orthosterische LBP von NRs weist in Form und Volumen eine hohe Variabilität auf und unterliegt durch Ligandenbindung großen Konformationsänderungen. Das Volumen kann hier, von einer fast nicht vorhandenen LBP, auf-

1. Einleitung

grund einer Blockade durch große hydrophobe Aminosäurereste, bis hin zu sehr großen Volumina von $> 1500 \text{ \AA}^3$ variieren^{24,25,26}. Innerhalb der LBP befindet sich unter anderem die beta-Schleife, die zwischen H5 und H6 lokalisiert ist¹⁷. Neben ihren strukturellen Merkmalen erweist sich die LBD als äußerst vielseitig und erfüllt mehrere wichtige Aufgaben: Sie ist in der Lage mit kleinen organischen Molekülen zu interagieren, an ihrer Oberfläche findet die Homo-/Heterodimerisierung mit anderen NRs statt und sie ist an der Interaktion mit vielen Co-Regulatoren beteiligt²⁷. Eins der wichtigsten Motive der LBD ist die AF-2, die in der C-terminalen Helix, meist H12 enthalten ist. Zusammen mit H3 und H4 bildet die AF-2 eine hydrophobe Oberfläche, die eine Interaktionsoberfläche für Co-Regulatoren bietet²⁸. Bei der Liganden-abhängigen Aktivierung von NRs spielt die Bindung und Freisetzung von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren durch die dynamische Position der AF-2 eine entscheidende Rolle. Die Position und Konformation der AF-2 unterliegen abhängig von der Ligandenbindung dynamischen Änderungen und bestimmen dadurch den Aktivierungszustand des NR. Da die AF-2 vielfältige Zustände annehmen kann, können durch unterschiedliche Modulatoren unterschiedliche Aktivierungslevel des Rezeptors induziert werden. Im inaktiven Zustand (apo oder Antagonist-gebunden) weist die AF-2 eine hohe Flexibilität auf und zeigt keine Bindung an den Kern der LBD. Dadurch ist eine hydrophobe Oberfläche zwischen H3 und H4 zugänglich, die in der Lage ist Co-Repressoren über spezifische α -helikale Motive zu binden, wodurch die Genexpression verhindert werden kann^{29,30}. Durch Bindung eines Agonisten wird eine Änderung der AF-2 Konformation induziert, wodurch es zu einer Stabilisation und Bindung der AF-2 an den Kern der LBD im aktivierten Zustand kommt^{24,31}. Durch die veränderte Konformation kommt es zu einer Veränderung in der hydrophoben Oberfläche der LBD und einer dadurch resultierenden Destabilisierung der Co-Repressoren-Bindung, die daraufhin freigesetzt werden. Die Freisetzung der Co-Repressoren erlaubt eine Rekrutierung von Co-Aktivatoren an die neu gebildete hydrophobe Oberfläche der AF-2, die eine zusätzliche Stabilisierung der aktivierten LBD bewirken und schlussendlich zu einer Aktivierung der Genexpression führen³². Daraus wird ersichtlich, dass die AF-2 eine kritische Rolle für das Gleichgewicht der Co-Regulator-Bindung und somit der Aktivierung von NRs spielt. Neben der Bindung eines Agonisten kann auch durch die Bindung eines Antagonisten die Aktivität eines NRs beeinflusst werden. Dieser kann an die Bindungsstelle des (endogenen) Agonisten binden und dessen Bindung verhindern, führt aber nicht zu einer Konformationsänderung, die für die Aktivierung erforderlich ist.

1. Einleitung

Neben Rezeptoren, die durch einen Agonisten aktiviert oder durch die Bindung eines Antagonisten blockiert werden, gibt es Rezeptoren, die ohne Anwesenheit eines Liganden spontan eine aktive Konformation annehmen können, sogenannte konstitutiv aktive Rezeptoren. Die AF-2 befindet sich bei diesen NRs trotz Abwesenheit eines Liganden in einer stabilisierten und an die LBD gebundenen Form. Durch die Entdeckung dieser Rezeptoren, kam es zu einer Definition eines neuen Liganden-Typs: inverser Agonist. Inverse Agonisten sind Liganden, die die konstitutive Aktivierung eines Rezeptors herunterregulieren, d.h. sie binden an den Rezeptor, stabilisieren diesen in seiner inaktiven Konformation und halten ihn davon ab eine auto-aktivierte Konformation einzunehmen. Durch diese Entdeckung konnten viele vermeintliche Antagonisten als inverse Agonisten identifiziert werden³³.

Die C-terminale F-Region stellt das Schlusslicht, ist nicht in allen Rezeptoren vorhanden und über ihre Funktion ist nur wenig bekannt¹⁷.

1.1.2.2 Allosterie

Neben den strukturellen Merkmalen und Mechanismen der NRs soll noch ein weiteres Merkmal in dieser Forschungsarbeit hervorgehoben werden: die Allosterie. Wie bereits erwähnt kommt die Wirkung eines typischen NR-Liganden zustande, in dem er in die LBP des jeweiligen Rezeptors bindet. Wenn von der LBP die Rede ist, ist in den meisten Fällen die orthosterische Bindungstasche des Rezeptors gemeint. Der Großteil der bekannten Liganden von NRs adressieren diese orthosterische Bindungstasche und konkurrieren dabei gegebenenfalls mit dem jeweiligen endogenen Liganden^{34,35}. Jedoch besitzen viele NRs, wie RAR-related orphan receptor γ (ROR γ , NR1F3), Nurr1, Nur77, RXR, Androgenrezeptor (AR, NR3C4) und PPAR γ , neben der orthosterischen auch eine allosterische Bindungstasche(n). Während für andere Rezeptorklassen, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) oder verschiedene Enzymklassen die Erforschung der allosterischen Modulation schon erfolgreich war und zu ersten zugelassenen Wirkstoffe geführt hat, steigt das Interesse für die Erforschung alternativer Bindungstaschen bei NRs erst langsam an. Die Anzahl der Publikationen nimmt in den letzten Jahren zwar zu, liegt aber deutlich hinter denen der anderen Protein-Klassen⁸⁻¹⁰.

1. Einleitung

Der Anstieg des Interesses für neue allosterische Liganden erklärt sich durch mehrere Vorteile. Allosterische Bindungstaschen zeigen im Gegensatz zur orthosterischen Bindungstasche typischerweise eine größere strukturelle Diversität, wodurch eine höhere Selektivität gegenüber Proteinen erreicht werden könnte^{36,37}. Sie bieten darüber hinaus den Vorteil, dass der allosterische Ligand nicht mit dem endogenen Liganden konkurrieren muss, da dieser (per Definition) an die orthosterische Bindungstasche bindet. Dadurch kann der allosterische Ligand gegebenenfalls in einer niedrigeren Konzentration verwendet werden und folglich im Idealfall weniger unerwünschte Wirkungen auslösen. Ein weiterer Vorteil könnte sich bei einer Mutation der orthosterischen Tasche ergeben. Wenn der Rezeptort nicht mehr orthosterisch adressiert werden kann, bietet ein allosterischer Ligand eine Alternative⁸. Des Weiteren kann die allosterische Bindung die Wirksamkeit und die Bindungsaffinität des orthosterischen Liganden modifizieren, wodurch eine Modulation der physiologischen Reaktion möglich ist⁸ (Abbildung 3).

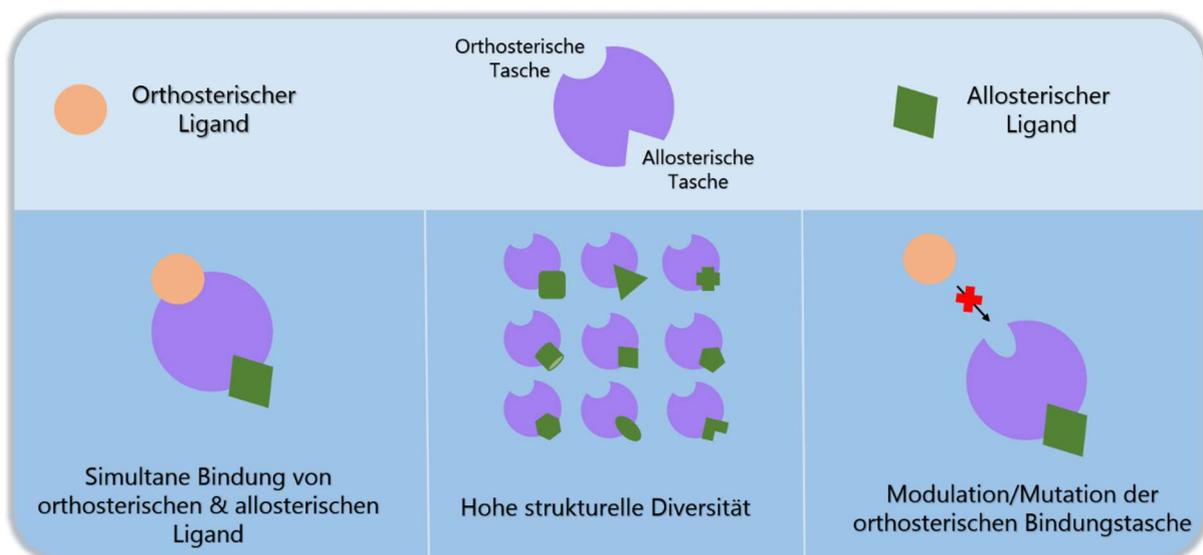


Abbildung 3: Potenzielle Vorteile der Verwendung eines allosterischen Liganden.

Die trotz der zahlreichen Vorteile nur langsam zunehmende Zahl allosterischer NR-Liganden lässt sich zum Teil auf die schwierige Identifikation solcher Liganden zurückführen. Konventionelle Wege der Wirkstoffentdeckung, wie das Hochdurchsatz-Screening (*high-throughput-screening*, HTS), identifizieren Liganden durch ihre Bindungsaffinität. Da die orthosterische Bindung meist die dominante darstellt, ist eine Identifizierung von allosterischen Bindungsmodi nicht trivial. Alternative aber nicht immer geeignete Möglichkeiten zur Identifizierung von allosterischen Liganden sind beispielsweise rechnerische Ansätze (*computational approaches*), Struktur-basiertes Fragmentscreening (*fragment soaking*), Fragmenterweiterung (*tethering*) und Phagendisplay³⁸⁻⁴². Eine weitere Strategie für die Entdeckung von allosterischen Liganden,

1. Einleitung

ist die gezielte Blockade der orthosterischen Bindungsstelle mit einem Antagonisten^{8,43}, sodass eine Bindung nur noch an allosterischen Bindungsstellen möglich ist. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Verfügbarkeit eines bekannten orthosterischen Antagonisten, was die Anwendung dieser Strategie bei vielen Waisenzepatoren einschränkt.

Im Gegensatz zu orthosterischen Bindungsstellen, die typischerweise durch die Bindung des endogenen Liganden (oder Substrats) definiert sind und eine spezifische Region beschreiben, können allosterische Bindungsstellen vielfältig sein und unterschiedliche Arten der Modulation vermitteln. Meijer et al. definieren für allosterische NR-Liganden drei Untergruppen an Bindungsmodi: Liganden die an die expandierte orthosterische Bindungsstelle, Liganden die an zwei Epitope und Liganden die an alternative Taschen binden⁸ (Abbildung 4).

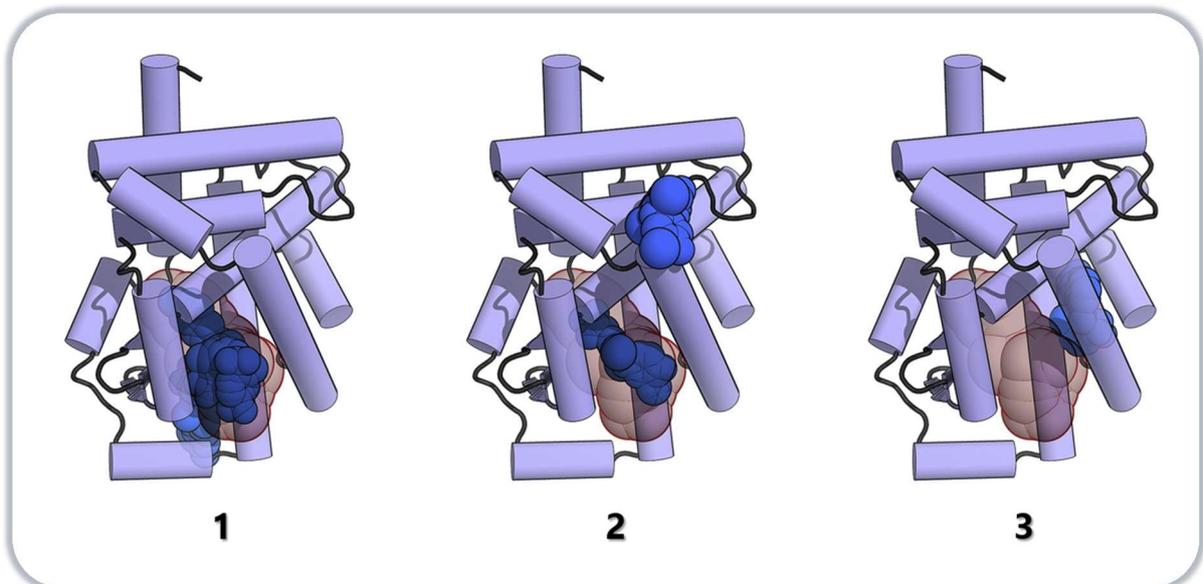


Abbildung 4: Bindungsmodi für allosterische Liganden: 1) Expandierte orthosterische Bindungsstelle, 2) Liganden die an zwei Stellen des Rezeptors binden und 3) alternative Bindungstasche. Die Abbildung ist aus Referenz 8 entnommen.

Bei Liganden, die an die expandierte orthosterische Bindungsstelle binden, handelt es sich um Liganden, die orthosterisch binden, aber sich dazu noch in eine zur orthosterischen Bindungstasche benachbarten Tasche einlagern, die mit der orthosterischen Bindungstasche verbunden ist. Diese Beobachtung ist häufig bei NRs zu finden, die eine größere orthosterische Bindungstasche (PPAR γ , FXR, LRH-1, PXR) besitzen⁴⁴⁻⁴⁷. Liganden, die an zwei Stellen des Rezeptors binden, binden zum einen die klassische orthosterische Bindungstasche und zum anderen in eine oberflächenzugängliche allosterische Tasche, die nicht in Verbindung mit der orthosterischen Tasche steht. Meistens wurden diese Liganden als orthosterische Liganden identifiziert und binden üblicherweise in einer 1:2 (Rezeptor:Ligand)-Stöchiometrie ortho- und allosterisch⁸. Im

1. Einleitung

dritten Fall bindet der Ligand selektiv nur in eine allosterische Tasche. Eine allosterische Bindungstasche wurde schon für einige NRs (ROR γ , Nur1, Nur77, RXR, AR, PPAR γ) beschrieben^{9,10,48–52}.

Bislang erfolgte die Entdeckung allosterischer Liganden von NRs häufig zufällig. Jedoch beschrieben Scheepstra et al. erstmals eine allosterische Bindungsstelle bei NRs für ROR γ . Die Co-Kristallisation der LBD von ROR γ mit verschiedenen kleinen antagonistischen Verbindungen führte zur Entdeckung einer Verbindung (MRL-871, **1**) die in eine bis dahin unbekannte allosterische Bindungstasche band, welche sich von der orthosterischen Bindungsstelle unterschied. Hierbei kristallisierte die ROR γ -LBD mit der typischen Anordnung der NRs für die H1-H11, jedoch befand sich H12 in einer zu dieser Zeit neuartigen Konformation. Die genaue Untersuchung der Kristallstruktur offenbarte, dass sich die allosterische Tasche, die in der klassischen NR-Faltung fehlte, sich durch H4, H5 und H11 und der neu ausgerichteten H12 bildete. Bei weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese einzigartige Konformation, die Interaktion mit Co-Faktor-Peptiden auf eine ligandenabhängige Weise verhinderte. Um die strukturellen Entdeckungen zu bestätigen und mehr Einblicke in den Bindungsmodus zu bekommen, wurde ein kompetitiver Bindungs-Assay durchgeführt. Dafür erfolgte zunächst die Betrachtung der Auswirkungen von **1** gegen verschiedene Konzentrationen des Agonisten Cholesterol⁵³. Cholesterol ist ein schwacher Aktivator, der die Aktivität der Interaktion von Co-Aktivatoren mit der LBD von ROR γ verstärkt⁵⁴. Bei dieser Untersuchung konnte beobachtet werden, dass **1** unabhängig von der Cholesterolkonzentration effektiv gegen die Bindung von Co-Aktivatoren wirkte, was sich durch die unterschiedlichen Bindungsstellen erklären ließ, da die Moleküle nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren müssen. Das gleiche Experiment mit dem inversen Agonist T0901317, der ebenfalls in die orthosterische Tasche bindet und somit um die gleiche Bindungsstelle wie Cholesterol konkurriert, zeigte, dass es in diesem Fall zu einer kompetitiven Verdrängung kam. Diese Verdrängung geschah in Abhängigkeit zur Cholesterolkonzentration und hatte einen Einfluss auf den IC₅₀-Wert von T0901317, was demonstrierte, dass die Inhibition in der Anwesenheit eines Agonisten weniger potent war. Um **1** auch auf zellulärer Ebene⁵³ zu charakterisieren wurde auf EL4-Zellen (murine Tumorzellen) zurückgegriffen, die ROR γ konstitutiv exprimieren, wodurch die Produktion von IL17a angetrieben wird⁵⁵. Die Zellen erhielten eine 24-stündige Behandlung mit 10 μ M von **1**, mit anschließender Messung der mRNA-Level von IL17a. Dabei war zu beobachten, dass **1** die IL17a mRNA-

1. Einleitung

Level signifikant verringern konnte und somit eine funktionale Modulation durch einen allosterischen Liganden zu zellulären Reaktionen, wie eine verringerte Gentranskription, führen kann⁵³. Diese Studie lieferte einen ersten Einblick in das Potenzial, das die allosterische Modulation von NRs besitzt und zeigte, dass selektive allosterische Liganden dringend für die gezielte Erforschung von allosterischen Effekten benötigt werden, da der Einfluss der allosterischen Bindungstasche auf molekulare Wirkmechanismen noch nahezu unerforscht ist.

1.2 NR4A- und Peroxisomen-Proliferator-aktivierende-Rezeptoren

Diese Forschungsarbeit befasst sich mit zwei Rezeptorfamilien. Zum einen mit den wenig erforschten NR4A-Rezeptoren, um neue potentere Liganden zu identifizieren und zum anderen mit dem gut erforschten PPAR γ -Rezeptor, für den eine neuartige Art der Modulation entwickelt werden soll. Im Folgenden werden zunächst die physiologische Rolle und die Liganden der in dieser Forschungsarbeit relevanten NRs beschrieben.

1.2.1 Nukleäre Rezeptoren der NR4A-Familie

Die NR4A-Familie setzt sich aus Nur 77, dem Kernrezeptor verwandtes Protein 1 (Nurr1, NR4A2) und NOR-1 zusammen. Bei allen drei Rezeptoren handelt es sich um konstitutiv aktive Waisenrezeptoren (*orphan receptor*). Während die Homologie in ihren DBDs bei 90-97% und in ihren LBDs bei 60-67% liegt, unterscheiden sie sich in ihren N-terminalen Transaktivierungsdomänen (20-30%)^{56,57}. Daraus resultieren zum Teil unterschiedliche Aktivitäten, die außerdem durch die Interaktion mit unterschiedlichen Cofaktoren und Liganden und durch eine gewebe-spezifische Expression zustande kommen⁵⁸. Das Expressionsmuster der NR4A-Rezeptoren unterscheidet sich teilweise deutlich. Während Nurr1 (mesenzephaler dopaminerge Neuronen des ventralen tegmentalen Bereichs, Substantia nigra pars compacta und paraventriculären Thalamuskernen)⁵⁹ und NOR-1 (zerebraler Neokortex, Hippocampus, Amygdala, Kleinhirn und dopaminozeptiven Arealen)^{60,61} hauptsächlich im Zentralen-Nerven-System (ZNS) exprimiert werden, zeigt Nur77 (Hypophyse, Nebenniere, Schilddrüse, Leber, Hoden, Eierstöcke, Thymusdrüse, Muskel, Lunge, Prostata, Großhirnrinde, Hippocampus)^{59,62} ein breiteres Expressionsmuster, das zusätzlich auch viele Gewebe außerhalb des ZNS betrifft. Darüber hinaus sind alle drei Rezeptoren in der Lage als Monomere das NFGI-B Response-Element (NBRE) und als Homodimere am NurRE zu binden⁶³⁻⁶⁵. Eine Heterodimer-Bildung mit RXR findet jedoch nur bei Nurr1 und Nur77 statt⁵⁸.

1. Einleitung

Eine mögliche Rolle der NR4A-Rezeptoren in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson (*Parkinson's disease*, PD), Morbus Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD) und Multiple Sklerose (MS) ruft zurzeit besonderes Interesse hervor. Im Folgenden wird der derzeitige Forschungsstand der einzelnen Rezeptoren in Bezug auf die neurodegenerativen Erkrankungen und verfügbaren Liganden aufgeführt.

1.2.1.1 Physiologische Rolle

Nur77

Aufgrund seines breiten Expressionsmusters wird Nur77 mit metabolischen (Diabetes), entzündlichen (Asthma, Arteriosklerose, Arthritis, Sepsis) und neurodegenerativen (PD, AD, MS) Erkrankungen in Verbindung gebracht⁵. Vor allem eine mögliche Beteiligung von Nur77 bei PD wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht.

Gilbert et al. zeigten, dass ein Knockout (KO) von Nur77 mit anschließender Behandlung mit Haloperidol (5 mg/kg) bei jungen männlichen Mäusen einen positiven Effekt auf die Funktion von dopaminergen Neuronen hat und die neuronale biochemische Aktivität sowie den Umsatz von Dopamin und seinen Metaboliten veränderte. Bei dieser Studie wurden die Versuchstiere (Nur77-KO oder Wildtyp (WT)) in zwei Gruppen eingeteilt und entweder mit Kochsalzlösung oder Haloperidol behandelt. Jeweils ein Teil der Gruppe der beiden Stämme (KO, WT) wurde eine Stunde nach der Haloperidol-Behandlung/Kochsalz-Behandlung geopfert. Die Opferung des anderen Teils der Gruppe erfolgte fünf Stunden nach der Haloperidol-/Kochsalz-Behandlung, mit anschließender Bestimmung der Dopamin- und Dopaminmetabolit-Level in bestimmten Bereichen des Gehirns nach entsprechender Aufarbeitung mittels HPLC. Interessanterweise konnte nach einer Stunde im WT eine Haloperidol-induzierte Hochregulierung von Nur77 fast ausschließlich in Zellen der Substantia nigra (SN) oder ventralen tegmental Area (VTA) beobachtet werden, die Thyrosinhydroxylase (TH) exprimieren. In Nur77-KO wurde im Vergleich zum WT eine höhere Expression von TH und Nurr1 mRNA in der SN/VTA und im frontalen Kortex nachgewiesen. Fünf Stunden nach Verabreichung von Haloperidol war eine Erhöhung des Dopamin-Umsatzes in Nur77-WT im frontalen Kortex zu sehen, während sich der Dopamin-Umsatz bei Nur77-KO reduzierte. In der SN blieb der Umsatz nahezu gleich. Deutlichere Effekte waren beim Dopamin-Metaboliten Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) zu beobachten. Dort zeigte sich im Striatum eine deutliche Erhöhung des Dopamin-Umsatzes bei Nur77-KO im Vergleich zu Nur77-WT. Ebenso war auch im SN/VTA und frontalen Kortex der

1. Einleitung

Umsatz erhöht. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Aktivität von Dopamin-Neuronen (TH, DOPAC) in Nur77-KO erhöht und der Dopamin-Umsatz verändert war. Dies legt nahe, dass es ein Zusammenspiel zwischen der NR4A-Familie und dem Dopaminsystem gibt, das noch weiter untersucht werden muss⁶⁶.

Eine weitere Studie untersuchte ebenfalls die Effekte von Nur77 bei Verabreichung von Haloperidol mit dem Unterschied, dass hier ein besonderes Augenmerk auf den zusätzlichen Einfluss des RXR-Rezeptors genommen wurde. Diese Studie untersuchte den Einfluss von Nur77, des RXR-Agonisten Docosahexaensäure (DHA, **2**) und des RXR-Antagonisten (HX531) auf eine durch Haloperidol ausgelöste orale Dyskinesie (leere Kaubewegungen). Dafür erfolgte die Einteilung von jungen erwachsenen männliche Nur77-KO- und -WT-Mäusen in vier Versuchsreihen mit unterschiedlichen Applikationsschema (Tabelle 2).

Tabelle 2: Behandlung und Durchführung der Versuchsreihen 1-4 von Nur77-KO und -WT-Mäusen.

Reihe	Anzahl Tiere pro Gruppe	Art der Versuchstiere	Applikation	Behandlung
1	8	Nur77-KO Nur77-WT	8 Tage (1x tgl.)	<ul style="list-style-type: none"> • Vehikel (2% DMSO) • HX531 (20 mg/kg/Tag) • DHA (100 mg/kg/Tag)
2	10	Nur77-KO Nur77-WT	14 Wochen (2x tgl.)	13 Wochen: <ul style="list-style-type: none"> • Vehikel (8% PEG-600) • Haloperidol (2 mg/kg/Tag) 14 Woche (Haloperidolgruppe): <ul style="list-style-type: none"> • Haloperidol (2 mg/kg/Tag) (n = 5) • Haloperidol (2 mg/kg/Tag) + DHA (100 mg/kg/Tag) (n = 5)
3	10	Nur77-KO Nur77-WT	alle 3 Wo. (insg. 17 Wo.)	13 Wochen: <ul style="list-style-type: none"> • Haloperidol decanoat (25 mg/kg, entspricht 1,25 mg/kg/Tag) 14 Woche: <ul style="list-style-type: none"> • DHA (100 mg/kg/Tag) für 8 Tage + Haloperidol decanoat

1. Einleitung

10	Nur77-KO	alle 3 Wo.	11 Wochen: <ul style="list-style-type: none">• Haloperidol decanoat (50 mg/kg, entspricht 2,5 mg/kg/Tag)
	Nur77-WT	(insg. 15 Wo.)	
4	Messung: periodische Messung bei der Behandlung mit Haloperidol decanoat. Zweifache Messung in der 12. Woche, nach 5 und 8 Tagen. Letzte Messung drei Wochen nach dem Auswaschen von HX531.		

In der ersten Versuchsreihe war zu beobachten, dass ein KO von Nur77 zu einer signifikanten Steigerung von leeren Kaubewegungen führte. Die Verabreichung von **2** ohne Haloperidol dagegen zeigte weder in KO noch in WT einen signifikanten Effekt auf die Kaubewegungen. Die Verabreichung von HX531 verursachte eine signifikante Steigerung der Kaubewegungen im WT. In der zweiten Versuchsreihe ergab die zusätzliche Verabreichung von **2** in der 14. Woche eine signifikante Verbesserung der leeren Kaubewegungen im WT im Vergleich zur Gruppe, die weiter nur Haloperidol erhielt – im KO konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Bei einer chronischen Behandlung (3. Versuchsreihe) mit Haloperidol decanoat, einem langwirksamen Haloperidol-Derivat, über 14 Wochen wurde der Wert der Kaubewegungen beim WT signifikant erhöht und zeigte beim KO eine zwei bis dreifachen höheren Wert im Vergleich. Die Co-Behandlung in der 14. Woche mit **2** verringerte die leeren Kaubewegungen im WT signifikant, jedoch ließ sich dieser Effekt im KO nicht beobachten. Hier waren die Effekte höher als bei der Einzelbehandlung vom KO mit Haloperidol decanoat. In der letzten Versuchsreihe wurde der Effekt von HX531 nach vorrangigener Haloperidol decanoat Behandlung untersucht. HX531 verschlechterte die durch Haloperidol induzierte Kaubewegung im WT, während es beim KO keinen Effekt gab. Die Effekte von **2** und HX531 waren nach der Behandlung reversibel. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Nur77 und RXR innerhalb der Haloperidol induzierten Dyskinesie miteinander interagieren und die Effekte von **2** und HX531 von der Anwesenheit von Nur77 abhängig sind⁶⁷.

Ein 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)-Primatenmodell untersuchte ebenfalls den Einfluss von **2** auf die Dyskinesie, in diesem Fall durch Levodopa (L-Dopa) induziert und das Zusammenspiel von Nur77 mit RXR. Die Untersuchung umfasste 20 weibliche sterilisierte Affen, wobei fünf Tiere als gesunde Kontrolle dienten, während die restlichen 15 das Neurotoxin MPTP erhielten. Nach dem Erreichen einer stabilen Parkinson-Symptomatik bekamen fünf Tiere ausschließlich L-Dopa, die übrigen zehn Tiere L-Dopa in Kombination mit **2**. Dabei wurde eine feste orale Dosis von L-Dopa/Benserazid (100/25 mg) verabreicht. Zusätzlich

1. Einleitung

erfolgte eine Bewertung der Tiere für die Zeit der Behandlung mehrmals pro Woche mit einer Invaliditätsskala. In der Versuchsgruppe, die zusätzlich zu L-Dopa auch **2** verabreicht wurde, erhielten die Affen drei Tage vor Beginn der L-Dopa-Therapie einmal täglich eine Behandlung mit **2** (100 mg/kg) und nach Ablauf der drei Tagen erfolgte die Behandlung mit L-Dopa in Kombination. Die Kombinationsbehandlung wurde ebenfalls einmal pro Tag verabreicht. Die Therapie erfolgte einen Monat lang. Vier Stunden nach der letzten oralen Dosis wurden die Tiere geopfert, die Gehirne entnommen und die mRNA-Level von Nur77 und RXR in den Hirnarealen Nucleus caudatus und Putamen nach entsprechender Aufarbeitung bestimmt. Die basalen Nur77 mRNA-Level in den Affengehirnen waren gering. Die Denervierung mittels MPTP führte zu einer 50-65%igen Reduktion der Nur77 mRNA-Level. Durch die Behandlung der Affen mit L-Dopa konnte beobachtet werden, dass die mRNA-Level wieder auf den Wert der Kontrollgruppe angehoben wurden. Die zusätzliche Kombination mit **2** bewirkte eine weitere signifikante Steigerung des mRNA-Levels. Dies könnte auf einen positiven Effekt von **2** bezüglich der L-Dopa induzierten Dyskinesie (LID) hindeuten. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung der mRNA-Level von Nur77 in Relation zu den Gesamtbewertungen auf den Invaliditätsskalen für jeden Affen. Dabei konnte eine inverse Korrelation in zwei Unterbereichen des Caudate putamen, zwischen dem mRNA-Level von Nur77 und dem Gesamtwert der Invaliditätsskala, gefunden werden. Die Untersuchung der mRNA-Level von RXR, zeigte hingegen in keiner Gruppe eine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe⁶⁸. Zusammenfassend kommt diese Studie wie auch schon Éthier et al. zu dem Schluss, dass Nur77 und RXR eine wichtige Rolle bei PD spielen und neue therapeutische Möglichkeiten bieten könnten. Ob **2** tatsächlich einen antidyskinetischen Effekt bei PD zeigt muss in weiteren Studien noch bestätigt werden sowie das genaue Zusammenspiel des Nur77/RXR Komplexes und deren Interaktion.

Mount et al. untersuchten den Einfluss des neuronalen Überlebensfaktor Myozytenverstärkungsfaktor 2 (*myocyte enhancer factor 2*, MEF2) auf die Expression von Nur77 *in vitro* und *in vivo*, bei vorheriger Behandlung mit MPTP⁶⁹. MEF2 ist ein Transkriptionsfaktor mit einer kritischen Rolle in Muskelentwicklung, neuronaler Differenzierung und neuronalem Überleben^{70,71,72,73} und stellt ein Substrat von CDK5 dar. Bei einer *in vivo* Untersuchung von jeweils sechs bis acht männlichen Nur77-KO- und -WT-Mäusen (Alter: 8-10 Wochen), die an fünf aufeinanderfolgenden Tagen MPTP (25 mg/kg) oder eine Salzlösung (0,9%) erhielten, gab es keinen statistischen Unterschied in der Anzahl der TH-Neuronen in der SN zwischen KO und WT. Lediglich eine signifikante Herunterregulierung der relativen Nur77-Expression war nach sechs

1. Einleitung

Stunden nach der Behandlung im KO im Vergleich zum WT zu beobachten. Daraufhin erfolgte die Untersuchung des Einflusses von MEF2D an den endogenen Nur77-Promotor im basalen in kultivierten kortikalen Neuronen, wobei sich zeigte, dass die Bindung von MEF2D basal vorhanden war, aber die Behandlung mit dem Neurotoxin 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺, Vorstufe von MPTP) zu einer Verringerung führte. Um den Zusammenhang der Reduktion von Nur77 mit dem Verlust von MEF2D genauer zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der Nur77-Level in WT-Mäusen, die einen Tag lang mit MPTP behandelt wurden sowie MEF2D oder GFP (*green fluorescent protein*) viral exprimierten. Daraus ergab sich, dass das adenovirale MEF2D den Rückgang der Nur77-Level einen Tag nach der MPTP-Behandlung abmilderte⁶⁹. Der genaue Mechanismus konnte jedoch nicht vollständig geklärt werden, daher braucht es weitere Studien, um die genaue Interaktion besser zu verstehen und Schlüsse daraus ziehen zu können. Eine weitere in vitro Untersuchung von kultivierten Neuronen aus den Mittelhirnen von WT und Nur77-defizienten Mäusen die 24 Stunden mit MPP⁺ behandelt wurden zeigte, dass der Nur77-Mangel in TH-Neuronen im Vergleich zum WT eine signifikante Hypersensitivität gegenüber Neurotoxinen verursachte und diese durch die exogene Expression von Nur77 wieder aufgehoben werden konnte⁶⁹.

Liu et al. demonstrierte ebenfalls in einem MPTP-Mausmodell, dass die Expression von Nur77 in aktivierter Mikroglia reduziert war. Für die Auswertung dienten, wie auch in zuvor erwähnten Untersuchungen, TH-Neuronen. Zudem sollte der Einfluss des Nur77 Agonisten Cytosporon B (Csn-B, **3**) als Zusatzbehandlung untersucht werden. Für die Untersuchung erfolgte die Einteilung der männlichen Mäuse in fünf Versuchsgruppen: Salzlösung (0,9%) + Salzlösung, Csn-B (10 mg/kg) + Salzlösung, Salzlösung + MPTP, Csn-B (5 mg/kg) + MPTP, MPTP + Csn-B (10 mg/kg). Bei den Gruppen die **3** als Co-Behandlung erhielten wurde drei Tage vor und drei Tage nach der Behandlung mit MPTP (sieben aufeinanderfolgende Tage), **3** verabreicht. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden die Tiere geopfert. Die Ergebnisse zeigten eine Herabsetzung der Nur77-Expression in aktivierten Mikroglia in MPTP-behandelten Mäusen im Vergleich zur Gruppe der mit Salzlösung-behandelten Mäusen. Zusätzlich war eine Deletion von dopaminergen Neuronen zu erkennen. Eine Vorbehandlung mit **3** führte dazu, dass der Verlust an TH-Neuronen im Vergleich zu Mäusen, die nur eine Behandlung mit MPTP erhielten, sich verringerte. Daneben erfolgte eine Kultivierung von primärer Mikrogliazellen von Mäusen und BV2-Mikrogliazellen, gefolgt von einer Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS). In beiden Zelllinien war eine Reduktion der Nur77-Expression in einer zeitabhängigen Weise festzustellen.

1. Einleitung

Darüber hinaus sollte der Einfluss von Nur77 auf die durch LPS ausgelöste Entzündungsreaktion untersucht werden. Dafür wurden die BV2-Mikrogliazellen mit Lentivirus exprimierendem Nur77 (Lenti-Nur77) sowie mit Lenti-Vektor (Negativkontrolle) inkubiert. Die Ergebnisse offenbarten, dass die Überexpression von Nur77 die LPS-stimulierte Sekretion von NO, die erhöhte mRNA-Expression von iNOS, COX-2, IL-1 β und TNF- α und die erhöhten Proteinlevel von iNOS und COX-2 hemmte. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls in KO-Experimenten in beiden Zelllinien bestätigt werden. Die Untersuchung des Einflusses von **3** auf LPS induzierte BV2-Mikrogliazellen Aktivierung demonstrierte, dass **3** signifikant die LPS-induzierte Expression von proinflammatorischen Genen (IL-1 β , COX-2, iNOS und TNF- α) in einer dosisabhängigen Weise unterdrückte. Dieser Effekt konnte bei gleichbleibender Durchführung des Experiments mit Nur77 KO nicht gezeigt werden⁷⁴.

Yan et al. untersuchten mittels MTT-Assay den Einfluss von Nur77 auf das zelluläre Überleben (PC12, Phäochromozytom – neuroendokrine Tumorzellen) die entweder mit MPP⁺ (1,0 mM) oder **3** (10 mg/mL) und/oder siNur77 behandelt wurden. Bei der Messung der zellulären Stoffwechselaktivität (MTT-Wert) war zu beobachten, dass die Anwesenheit von Nur77 einen signifikanten protektiven Effekt bei MPP⁺-behandelten Zellen hatte, der sich in einem höheren MTT-Wert äußerte. Dagegen führte ein Silencing von Nur77 mit siRNA zu einer erhöhten Expression von NF κ B, TNF- α , IL-6 und MCP-1 in MPP⁺-behandelten Zellen und einem deutlich herabgesetzten MTT-Wert. Diese Ergebnisse sind konsistent zu denen von Liu et al. Zudem wurde ein signifikant erhöhtes Level von phosphoryliertem I κ B in siNur77-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Phosphoryliertes I κ B ist nicht mehr in der Lage NF κ B zu binden und es durch die Bindung zu inaktivieren. Die Behandlung mit **3** schwächte diesen Effekt ab, was auf neuroprotektive Effekte von Nur77, durch die Inhibierung der Phosphorylierung von I κ B hindeuten könnte⁷⁵.

Kontroverse Ergebnisse zeigten sich bei den Untersuchungen von Rouillard et al. Obwohl die Nur77-Expression in der SN und VTA fast vernachlässigbar ist, wurde eine schnelle Hochregulierung von Nur77 in der SN und im Mittelhirn in einem 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-induzierten Rattenmodell mit gleichzeitiger Herunterregulierung von Nurr1 und TH im Mittelhirn beobachtet. Für dieses Modell wurden WT-Ratten und mutierte Ratten verwendet. Die mutierten Ratten enthielten eine Mutation im TCA-Codon vor Tyr130, das ein Stopcodon (TAA) in der Nur77 Kodierungssequenz erzeugte. Diese Sequenz führte zu einem nicht funktionsfähigen Nur77-Protein, in dem verschiedene Domänen fehlten die entscheidend für die Aktivierung

1. Einleitung

sind. Die Tiere wurden mit dem Neurotoxin 6-OHDA behandelt und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 9 und 24 h) geopfert. Die Datenerhebung erfolgte durch Auszählung der TH-Neuronen in den zu untersuchenden Geweben. Im Vergleich zu den vorher erwähnten Studien kam es hier interessanterweise nach der Behandlung mit einem Neurotoxin und damit einhergehenden Denervierung zu einer schnellen Induktion von Nur77 im WT. Zudem war die Anzahl der TH-Neuronen im WT geringer als in den mutierten Ratten. Zusätzlich zeigte sich, dass die mutierten Ratten, die L-Dopa erhielten und ein nicht funktionsfähiges Nur77-Protein besaßen, reduzierte LID-Werte aufwiesen, während eine viral-induzierte Überexpression von Nur77 diesen Effekt wieder umkehrte⁷⁶. Dies widerspricht den Ergebnissen von Mahmoudi et al., die zu dem Schluss kamen, dass die Induktion von Nur77 der LID-Entwicklung entgegenwirkt⁶⁸.

Zusammengenommen legen die Ergebnisse dieser Studien nahe, dass Nur77 bei Parkinson-assoziierte Dyskinesie bei der Denervierung von Nervenzellen, wie es auch in PD stattfindet, eine Rolle spielt. Zudem konnte in zwei Versuchsreihen ein Zusammenspiel zwischen Nur77 und RXR festgestellt werden, wobei weitere Studien von Nöten sind, um die genauen Mechanismen dahinter zu verstehen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei PD, ist die Studienlage zur Rolle von Nur77 bei MS und AD noch schwächer. Liebmann et al. untersuchten in einem Experiment an Mäusen den Einfluss von Nur77 auf T-Zellen, die bei MS eine wichtige Rolle spielen. Sie zeigten, dass Nur77 den T-Zellstoffwechsel regulieren kann und ein Mangel an Nur77 zu einer verstärkten T-Zell-Proliferation führte. Den Autoren zufolge stellt Nur77 einen Schlüsselregulator dar, der Einfluss auf die Entwicklung von abnormen proinflammatorischen T-Zell-Reaktionen und Autoimmunität hat⁷⁷. Zudem konnte der Einfluss von Csn-B (**3**) das Fortschreiten der Krankheit bei Wildtyp-Mäusen verbessern und vor Demyelinisierung schützen - in KO Mäusen konnte dies nicht gezeigt werden⁷⁸.

Eine der wenigen Forschungsarbeiten zur Rolle von Nur77 bei AD beschäftigte sich mit dem Alpha-1-antichymotrypsin/serpinA3, einem Mitglied der Serin-Protease-Inhibitor-Familie⁷⁹. Dieses Glykoprotein ist in Akute-Phase- und Entzündungsreaktionen involviert und trägt zur Entwicklung von AD bei. Es interagiert mit dem A β -Peptid und stellt einen Hauptbestandteil der A β -Plaques dar. Ein Experiment in menschlichen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) demonstrierte, dass die Behandlung mit dem A β -Peptid und Wasserstoffperoxid eine Translokation

1. Einleitung

von RXR α und Nur77 vom Zellkern in die Mitochondrien und anschließende Apoptose verursachte. Die Behandlung mit 9-cis-Retinsäure verhinderte dagegen die Translokation und erhöhte die Proteinexpression von B-Zell-Lymphom 2 (Bcl-2)⁸⁰. Damit konnte diese Arbeit neue Informationen für ein besseres Verständnis von AD liefern.

Die bisher verfügbaren Studien zu Nur77 liefern erste Anhaltspunkte für ein interessantes Potenzial des Rezeptors in neurodegenerativen Erkrankungen. Für eine weitere Charakterisierung und Validierung von Nur77 als mögliche therapeutische Zielstruktur sind jedoch mehr Studien von Nöten, um einen besseren Einblick in die Wirkmechanismen zu erlangen und vor allem das Potenzial der Modulation des Rezeptors durch Liganden zu untersuchen. Es muss außerdem beachtet werden, dass die Aktivität von Nur77 und Nurr1 sich gegenseitig beeinflussen^{76,81,82} und in Hinblick auf die Charakterisierung von neuen NR4A-Liganden auch die anderen Subtypen Berücksichtigung finden^{83,84}. Bei der Verwendung von Csn-B (**3**) und seinen Derivaten konnte gezeigt werden, dass eine direkte Bindung bei zumindest zwei der drei NR4A-Rezeptoren zu beobachten war^{85,86,87}. Dies stellt bei dieser Rezeptorfamilie keine Seltenheit dar und war auch bei anderen Verbindungen zu beobachten. Dadurch ist es schwierig die ermittelten Ergebnisse auf eine alleinige Aktivierung von Nur77 zurückzuführen. Aus diesem Grund bedarf es potenterer, selektiverer und besser charakterisierter Nur77-Modulatoren als Tool.

Nurr1

Für Nurr1 konnte eine wichtige Rolle bei PD in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt werden. Die Post-mortem Untersuchung von Parkinson Patienten demonstrierte eine signifikante Herabsetzung der Nurr1 Expression in nigralen Neuronen, die α -Synuclein immunoreaktive Einschlüsse enthielten. Dieses α -Synuclein korreliert mit dem Verlust von TH⁸⁸. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit dopaminergen Ratten-Neuronen und bei MPTP-behandelten Mäusen erhalten. Hier konnte ebenfalls ein verringertes Expressionslevel von Nurr1, ausgelöst durch erhöhte α -Synuclein Level, nachgewiesen werden⁸⁹. Zudem zeigten mehrere Untersuchungen, dass eine Überexpression von Nurr1 eine schützende Wirkung (verstärkte Expression neuroprotektiver Gene, verbessertes Überleben der Neuronen, reduzierte Neuroinflammation) auf dopaminerge Neuronen hatte, wenn diese mit unterschiedlichen toxischen Noxen *in vitro* und *in vivo* behandelt wurden⁸⁹⁻⁹².

Weitere Experimente zeigten ebenfalls, dass sich eine Überexpression von Nurr1 positiv auf die Substantia nigra auswirkte. Dafür wurden 6-OHDA-behandelten Ratten mesenchymale

1. Einleitung

Stammzellen mit einer lentiviraler Nurr1-Überexpression transplantiert. Dies führte zur Erhöhung der Anzahl der TH-Neuronen und zu einer Reduzierung der Mikroglia-Aktivierung und der Expression von inflammatorischen Mediatoren in der Substantia nigra⁹³.

Darüber hinaus ist Nurr1 in der Lage in Mikroglia und Astrozyten als negativer Regulator von NFκB-regulierten Entzündungsgenen, durch die Stabilisierung des Co-Repressor-(CoREST)-Komplexes an p65/50 cis-wirkenden Promotorelementen, diese zu beeinflussen. Dadurch wurde die Produktion von neurotoxischen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNFα), Interleukin-1β (IL-1β) und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) in der Substantia Nigra von LPS-injizierten Mäusen limitiert⁹⁴. Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie, dass die Interaktion zwischen Nurr1 und dem Co-Aktivator Forkhead-Box-Protein A2 (FOXA2) in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns die Interaktion von Nurr1 mit dem CoREST-Komplex abschwächte und dadurch die Genexpression des Dopamin-Phänotyps auslöste⁹⁵.

Neben den bisherigen Ergebnissen stehen auch andere Ansätze wie die Regulation des Rezeptors durch Nurr1-Liganden und die Verwendung von Nurr1-RXR-Heterodimer-selektiven RXR-Agonisten im Fokus der Forschung. Bei der Untersuchung des Nurr1-Agonisten Amodiaquin (AQ, **4**), den potenziellen endogenen Liganden Prostaglandin A1 (PGA1, **5**) und E1 (PGE1, **6**) sowie dem Dopaminmetabolit 5,6-Dihydroxyindol (DHI, **7**), zeigte sich eine Beeinflussung von dopaminergen Genen (TH, VMAT2, DAT)⁹⁶⁻⁹⁸. Daneben war AQ (**4**) in der Lage in Ratten die inflammatorische Zytokin Freisetzung nach LPS-Behandlung in primärer Mikroglia zu unterdrücken und verbesserte Verhaltensdefizite in einem 6-OHDA-induzierten Parkinson-Modell⁹⁶. PGA1 (**5**), PGE1 (**6**) und die synthetischen Nurr1 Agonisten SA00025 (**8**) und IP7e (**9**) demonstrierten neuroprotektive⁹⁷ und antiinflammatorische Effekte in unterschiedlichen Nager-PD-Modellen⁹⁹. Allerdings wurde durch die Behandlung mit IP7e (**9**) eine Steigerung der Nurr1-Level im Gehirn festgestellt, was auf andere Mechanismen, als eine direkte Nurr1-Aktivierung hinwies. Es ist jedoch zu beachten, dass für **8** und **9** der Nachweis einer direkten Bindung an die LBD nicht erbracht werden konnte und dadurch die vermeintlichen Effekte mit Vorsicht zu betrachten sind, bis es gelingt eine Bindung nachzuweisen^{97,99}.

Die Untersuchung einiger Nurr1-RXR-Heterodimer-selektiver RXR-Agonisten zeigte, dass die Nurr1-Aktivierung ein wichtiger Ansatz zur Behandlung von Neuroinflammation *in vitro* und *in vivo* sein kann. Die Verbindungen XCT0139508 (XCT, **10**), IRX4204 (**11**) und BR110 (**12**) wurden in verschiedenen neuronalen Zellkulturen auf ihre neuroprotektiven Effekte untersucht und waren in der Lage Nurr1-regulierte Gene zu induzieren¹⁰⁰⁻¹⁰². Zusätzlich verbesserten IRX4204

1. Einleitung

(**11**) und BRF110 (**12**) die motorischen Funktionen und reduzierten den Verlust von dopaminergen Neuronen in 6-OHDA und MPTP-Nagetiermodellen^{101,102}. In einem ischämischen Schlaganfallmodell bei Mäusen konnten außerdem für das Diabenzodiazepin HX600 (synthetischer RXR-Agonist, **13**) neuroprotektive Effekte festgestellt werden. Diese Effekte wurden durch die Reduzierung von pro-inflammatorische Mediatoren in LPS-stimulierten primären Mausmikroglia beobachtet. Ebenso zeigte sich ein verringertes Auftreten des entzündungsbedingten neuronalen Todes in einem *in vitro* Co-Kulturmodell von Neuronen und Mikroglia¹⁰³. Neben einem besseren Verständnis über die Wirkungsweisen von Nurr1 in PD, steht auch insbesondere AD im Fokus der aktuellen Forschung. Mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien bringen den Einfluss einer Dysregulation von Nurr1 mit der Pathogenese von AD in Zusammenhang. Wie bei PD konnte auch bei AD bei post-mortem Untersuchungen von Alzheimer-Patienten eine Verringerung der Nurr1-Expression in nigralen Neuronen, die neurofibrilläre Bündel enthalten, gefunden werden. Die Verringerung der Expression offenbarte ebenfalls eine Korrelation mit dem Verlust von TH-Neuronen⁸⁸. In zwei *in vitro* Studien in mit A β -Fibrillen behandelten Zellen konnte eine Herunterregulation der mRNA-Level von Nurr1 in primären Rattenneuronen und in neuronal differenzierten menschlichen Mesenchymzelllinien beobachtet werden¹⁰⁴. Zudem zeigte ein transgenes Mausmodell mit mutierten Amyloid-Vorläufer Proteinen (APP) eine Reduzierung des mRNA-Levels von Nurr1 im Hippocampus¹⁰⁵. Ein weiteres Modell mit 5XFAD-behandelten Mäusen untersuchte die Nurr1 Expression in einem zeitlichen Verlauf der Erkrankung. Im frühen Stadium kam es zu einer verstärkten Expression von Nurr1 bei A β -Akkumulation im frontalen Kortex und Subiculum und erst in späteren Stadien war ein Verlust von Nurr1 exprimierenden Zellen zu beobachten¹⁰⁶. Moon et al. stellten ebenfalls in 5XFAD Mäusen fest, dass ein Knockdown von Nurr1 im Subiculum zu einer Verstärkung der AD-Pathologie führte, wohingegen eine Nurr1-Überexpression oder Nurr1-Aktivierung mit AQ (**4**) die AD-Symptome durch eine Verringerung der A β -Akkumulation, einer geringeren Neurodegeneration und verbesserten kognitiven Funktionen, verbesserte¹⁰⁷. Diese Studienergebnisse weisen darauf hin, dass die Nurr1-Expression einen Einfluss auf die Mechanismen in AD hat. Das Problem, das diese Arbeiten vereint, ist jedoch, dass die Ergebnisse überwiegend durch Nurr1-Überexpression und -KO-Experimente erhoben wurden, da für die pharmakologische Untersuchung der Effekte die erforderlichen selektiven und potenten Liganden noch fehlen.

1. Einleitung

Auch ein möglicher Einfluss von Nurr1 auf MS ist bereits untersucht worden, jedoch haben bisherige Experimente widersprüchliche Ergebnisse geliefert. Die Nurr1-Expression war in sieben von acht Untersuchungen von Patienten mit schubförmiger remittierender MS im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert. Der Vergleich der Untersuchungen ist jedoch nur bedingt möglich, da die Ergebnisse durch verschiedene Blutkompartimente (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, Vollblut, CD14⁺-Monozyten und CD4⁺-T-Zellen) erhoben wurden. Lediglich eine japanische Forschergruppe stellte eine Hochregulierung der Genexpression in CD3⁺ T-Zellen fest¹⁰⁸. In mehreren Tiermodellen mit experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) Mäusen konnte eine neuroprotektive Wirkung von Nurr1 gezeigt werden. Der Einsatz des vermeintlichen Nurr1-Aktivators IP7e (**9**) führte zu einer Hemmung der NFκB vermittelten Entzündung im frühen Krankheitsstadium¹⁰⁹. Des Weiteren induzierte heterozygoter KO von Nurr1 einen früheren Beginn der EAE-Krankheit mit einer verstärkten Infiltration des Rückenmarks durch proinflammatorische Zellen¹¹⁰. Zudem demonstrierte eine Überexpression von Nurr1 in dendritischen Zellen des Knochenmarks, die Progression der EAE durch vermehrte Differenzierung von regulatorischen T-(T_{Reg})-Zellen und eine damit verbundene geringere Neuroinflammation verlangsamt werden konnte.¹¹¹ Dazu widersprüchliche Ergebnisse berichten über eine Abschwächung der EAE Symptomatik bei Nurr1 KO bei Mäusen, was die Autoren auf eine mögliche Beteiligung von Nurr1 bei der T_H17-Zelldifferenzierung, über die Regulierung der IL21 und IL23R Expression, zurückführten¹¹².

Diese bisherigen Untersuchungen liefern erste Hinweise hinsichtlich der Beteiligung von Nurr1 bei MS, jedoch bedarf es auch hier weiterer Studien, um Nurr1 als mögliche Zielstruktur für MS zu validieren.

NOR-1

NOR-1 stellt das am wenigsten untersuchte Mitglied der NR4A-Familie dar. Durch die geringe Anzahl an Studien und einen Mangel an NOR-1 Modulatoren sind seine physiologischen Funktionen noch weitgehend unbekannt¹¹³. Dennoch existieren erste Hinweise auf eine Beteiligung von NOR-1 an Gefäßentwicklung, Entzündungen, Immunologie, Lipid- und Glucosemetabolismus, sodass eine Dysregulation von NOR-1 unter anderem möglicherweise zu Fettleibigkeit, Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs führen könnte¹¹⁴. Erste Ergebnisse geben außerdem Hinweise auf eine Rolle von NOR-1 in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen. So zeigte sich, dass NOR-1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des ZNS

1. Einleitung

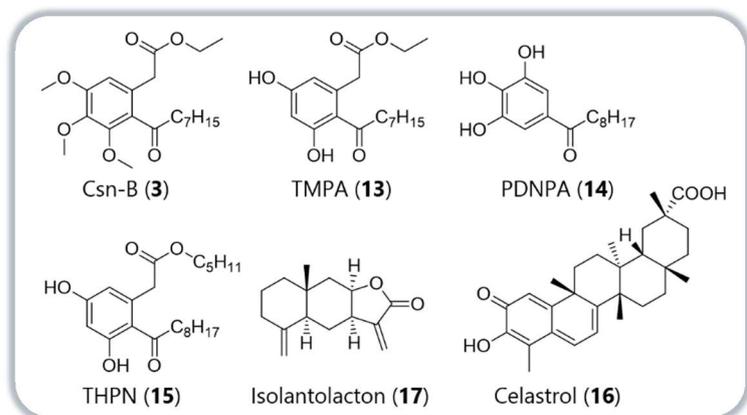
spielte, insbesondere durch die Vermittlung der neuronalen Differenzierung und Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität¹¹³. Der KO von NOR-1 in Mäusen führte zu einer Beeinträchtigung des axonalen Wachstums im Hippocampus, zum postnatalen Absterben neuronaler Zellen und zur fehlenden Bildung einer kompakten Pyramidenzellschicht des Ammonshorns in CA1 und CA3 bei NOR-1^{-/-} Mäusen. Dazu kommt, dass NOR-1 KO-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für limbische Anfälle aufwiesen und die axonale Führung im Gyrus dentatus und in den Moosfasern beeinträchtigt waren. Ein weiteres Indiz für eine Rolle von NOR-1 in neurodegenerativen Erkrankungen ist die Akkumulation des Rezeptors in Lewy-Körpern in Patienten mit PD oder AD sowie in glialen und neuronalen zytoplasmatischen Einschlüssen bei multipler Systematrophie¹¹⁵. Darüber hinaus konnte NOR-1 in einem cAMP RE bindendes Protein (CREB) abhängigen Mechanismus das antiapoptotische Protein cIAP2 in neuronalen Zellen unter oxidativem Stress, Hypoxie und Ischämie induzieren^{91,116}. Die CREB-regulierte Expression von NOR-1 in neuronalen Zellen, wurde auch bei den anderen Mitgliedern der NR4A-Familie beobachtet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die NR4A-Familie als Mediator für die CREB-induzierte Neuroprotektion und neuronales Überleben fungiert^{91,116}.

1.2.1.2 Liganden der NR4A-Familie

Da es sich bei den drei Vertretern der NR4A-Familie um Waisenrezeptoren handelt sind ihre endogenen Liganden noch nicht (zweifelsfrei) bekannt. In den letzten Jahren wurden jedoch immer mehr natürliche und synthetische NR4A Liganden entdeckt, die im Folgenden betrachtet werden.

Liganden des Nur77

Die erste Verbindung, für die eine direkte Bindung an Nur77 nachgewiesen wurde, war Csn-B (**3**) (Schema 1). Die Bestimmung der Transaktivierung von Nur77 durch **3** erfolgte durch Gal4-Nur77-Vollängen-Assay ($EC_{50} = 0,278$ nM) und Gal4-Nur77-LBD-Assay ($EC_{50} = 0,115$ nM) in einer humanen Magenzelllinie (BGC-823)¹¹⁷. Zudem bestätigten Muñoz-Tello et al. in NMR-Störungsstudien die Bindung an Nur77, jedoch war die Transaktivierung



Schema 1: Bekannte Nur77 Modulatoren.

1. Einleitung

von Nur77 schwach.⁸⁵ *In vivo* Versuche an Wild-Typ Tieren zeigten, dass es durch Csn-B (**3**) zu einer Steigerung der Blutglucose und einer Induktion der Gluconeogenese kommt, während diese Effekte in Nur77^{-/-}-KO Mäusen nicht beobachtet wurde, was auf eine Nur77-vermittelte Wirkung hindeutete. Zusätzlich konnte durch die Behandlung von BGC-823-Zellen mit **3** eine Nur77-induzierte Apoptose, durch gezielte Translokation vom Nukleus zum Cytoplasma, beobachtet werden⁸⁵. In weiteren Studien wurde die Aktivität von **3** als Antikrebsmittel, durch die Evaluierung der Struktur-Wirkungsbeziehung (*structure-activity relationship*, SAR) von Csn-B (**3**) an Nur77, untersucht^{86,118}.

Ausgehend von Csn-B (**3**) und seiner bestätigten Bindung an Nur77 beschäftigten sich verschiedene Arbeitsgruppen mit dessen Derivatisierung zur Potenzsteigerung. Zhan et al. entwickelten aus **3** die Verbindung 2-[2,3,4-Trimethoxy-6-(-1-octanoyl)phenyl]acetat (TMPA, **14**), die einen neutralen Antagonisten für Nur77 darstellte und keine Nur77-Aktivierung im Reporter-genassay zeigte⁵⁰. Bei *n*-Pentyl-2-[3,5-dihydroxy-2-(1-nonanyl)phenyl]acetat (PDNPA, **15**) handelte es sich um ein weiteres Csn-B-Derivat, das als kompetitiver Inhibitor der Nur77-p38 α Interaktion durch die Bindung an Nur77 wirkte und dadurch die Phosphorylierung von Nur77 verhinderte, wobei die Fähigkeit von Nur77 die NF κ B Aktivität durch Interaktion mit der NF κ B Untereinheit p65 zu hemmen, erhalten blieb. In einer murinen Makrophagen-Zelllinie (RAW264.7) konnte für **15** ein IC₅₀-Wert von 1,6 μ M ermittelt werden. Co-Kristallisation mit Nur77 (PDB: 4RZG) bestätigte die Bindung und offenbarte einen ähnlichen Bindungsmodus wie bei TMPA (**14**)⁸⁷. Die Bindung des Csn-B-Derivates 1-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)nonan-1-on (THPN, **16**) konnte durch Co-Kristallisation (PDB: 4J6V¹¹⁹) ebenfalls bestätigt werden. **16** war in der Lage einen mitochondrialen Signalweg zu induzieren, der zum autophagischen Zelltod führte¹²⁰. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde **16** in Zellviabilitätsassays in mehreren Melanom- und Nicht-Melanom-Zelllinien, in Bindungsstudien und in Knockdown-Experimenten untersucht. Eine Transaktivierung von Nur77 wurde hierbei nicht betrachtet. Durch eine SAR mit sechs Derivaten, bei der die Kettenlänge und das Hydroxygruppen-Substitutionsmuster variierte, konnte ein Zusammenhang zwischen der Potenz und LBD-Bindungsaffinität festgestellt werden und lieferte ein neues Derivat mit C9 anstelle von C8¹²¹.

Durch ein Screening antiinflammatorischer Naturprodukte in einem Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR)-Assay wurde der Naturstoff Celastrol (**17**) als inverser Agonist für Nur77 entdeckt ($K_d = 0,29 \mu\text{M}$) und zusätzlich in einem Reporter-genassay (IC₅₀ = 0,5 μM) in

1. Einleitung

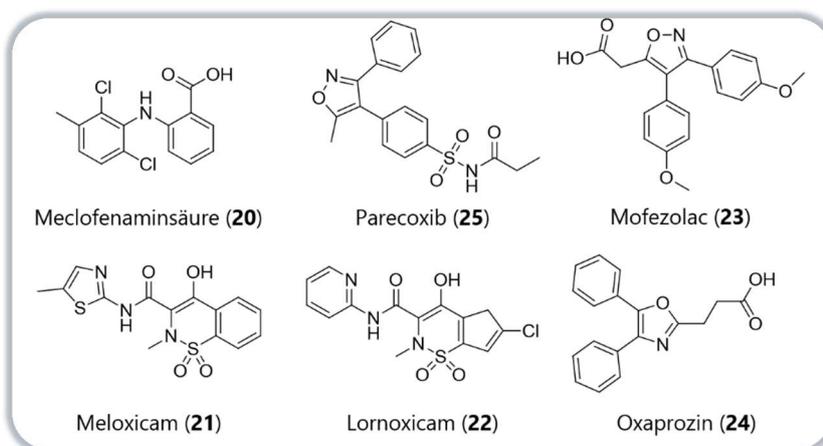
HEK293T-Zellen bestätigt. Molekulare Docking Untersuchungen wiesen auf eine ähnliche Bindungsstelle wie bei TMPA (**14**) hin¹²².

Mit Isolantolacton (**18**) wurde ein weiterer Naturstoff als Ligand von Nur77 identifiziert. Ein Gal4-Nur77-Reportergenassay in MiaPacCa2-Zellen zeigte, dass **18** die Nur77-regulierte Luciferase-Aktivität signifikant verringerte. Durch die zusätzliche Aktivierung der AMP-aktivierte Proteinkinase α (AMPK α) besitzt **18** einen dualen Mechanismus, der in der Lage war, die Adipogenese in 3T3-L1-Preadipozyten *in vitro* und *in vivo* zu hemmen¹²³.

Neben der Bindung der ungesättigten Fettsäuren¹²⁴, Arachidonsäure und DHA (**2**), wurde auch die Bindung von Prostaglandin A2 (PGA2, **19**) an Nur77 in einem im SPR-Assay charakterisiert und ergab einen K_d von 2,05 μM . In einem Nur77-Vollängenreportergenassay (NurRE) in menschlichen Bronchialepithel (NHBE) Zellen konnte eine dosisabhängige Aktivität mit 15-facher Nur77 Transaktivierung bei 10 μM PGA2 (**19**) gezeigt werden¹²⁵.

Willems et al. demonstrierten bei der Untersuchung in Gal4-Hybrid-Reportergenassay (HEK293T), dass unterschiedliche NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) als Agonisten (Meclofenaminsäure, **20**) und inverse Agonisten (Meloxicam **21**, Lornoxicam **22**, Mofezolac **23**, Oxaprozin **24**, Parecoxib **25**) für Nur77 und NOR-1 fungieren¹²⁶ (Schema 2).

Zusätzlich war bei AQ (**4**) und Chloroquin (CQ, **26**), die ursprünglich als Nur1-Modulatoren charakterisiert wurden, ebenfalls agonistische Aktivität an Nur77 und NOR-1 zu beobachten⁵. Diese Ergebnisse unterstreichen,



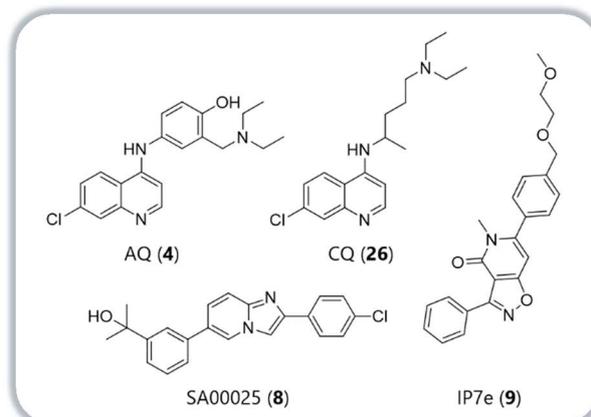
Schema 2: NSAIDs als Agonisten für Nur77, Nur1, NOR-1.

dass die Entwicklung eines selektiven Liganden für die NR4A-Familie herausfordernd ist. Dennoch bedarf es dringend potenter und selektiver Liganden für Nur77, um diesen Rezeptor als therapeutische Zielstruktur charakterisieren und validieren zu können und um ein besseres Verständnis für dessen Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen zu erlangen.

1. Einleitung

Liganden des Nurr1

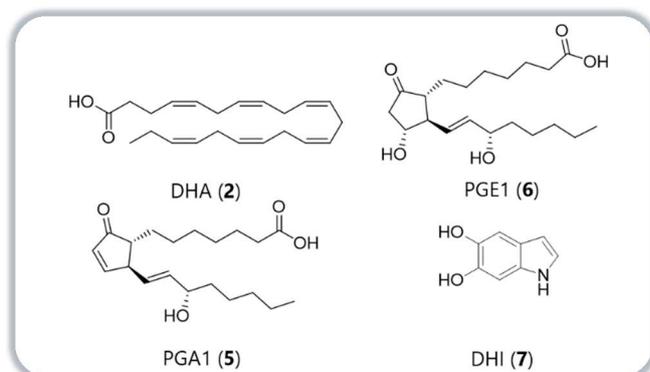
Auch für Nurr1 konnten bereits einige natürliche und synthetische Liganden identifiziert und charakterisiert werden. Kim et al. identifizierten durch ein Arzneistoff-Screening, in einem Vollängen-Nurr1-Reporterassay (menschliche Neuroblastom-Zellen, SK-N-BE(2)C), die beiden Malariamittel AQ (**4**) und CQ (**26**) als erste bekannte Nurr1-Liganden, die die LBD direkt modulieren⁹⁶ (Schema 3). NMR-Experimente bestätigten die direkte



Schema 3: Literatur bekannte Nurr1-Agonisten.

Interaktion mit der LBD, während Mutagenesestudien dieses zusätzlich untermauerten^{96,127}. Darüber hinaus offenbarten sich erste Einblicke in die Aktivierungsmechanismen von Nurr1, die die ligandabhängige Rekrutierung der nukleären Co-Repressoren 1 (NCOR-1) und 2 (SMRT) umfassten¹²⁸.

Die ersten Indizien für die Existenz von endogenen Liganden für den Nurr1-Rezeptor lieferten Vera et al. mit der ungesättigten Fettsäure DHA (**2**) (Schema 4). In zwei Vollängen-Reporter-



Schema 4: Potenzielle endogene Liganden von Nurr1.

genassays (HEK293T & dopaminergen MN9D-Zellen) konnte durch DHA (50 μM , **2**) eine dosisabhängige Unterdrückung der Nurr1-Aktivität um 25% beobachtet werden¹²⁹. Als weitere potenzielle endogene Liganden wurden später die Fettsäuremetaboliten PGA1 (**5**) und PGAE1 (**6**) identifiziert. Im Gegensatz zu

DHA (**2**) induzierten sie eine Nurr1-Aktivierung in einem Gal4-Nurr1-Reporterassay (murine dopaminerge MN9D-Zellen) und Vollängen-Reporterassay (N27-A dopaminergen Rattenneuronen), mit EC_{50} -Werten von 5 und 3 μM ⁹⁷. Zudem führte die Co-Kristallisation von **5** mit der Nurr1-LBD (PDB: 5Y41⁹⁷) zur Identifizierung der kovalenten Bindung von **5** an eine nicht kanonische Stelle zwischen H4, H5, H11 und H12 an der Nurr1-LBD^{87,130}.

Die Entdeckung des Dopaminmetaboliten DHI (**7**) führte nicht nur zur Erschließung einer neuen nicht kanonischen Bindungstasche an Nurr1, sondern lieferte möglicherweise auch einen potenziellen endogenen Liganden. Die *in vitro* Testung von DHI (100 μM , **7**) demonstrierte, dass **7** in

1. Einleitung

der Lage war die Nurr1-Aktivität in einem Gal4-Nurr1-Hybrid-Reporterassay (humane Choriokarzinomzellen, JGE-3-Zellen) um das 1,6-fache zu erhöhen⁹⁸.

Neben potenziellen endogenen Liganden wurde, wie oben erwähnt, die Arzneistoffklasse der NSAIDs als Nurr1-Modulatoren identifiziert. Dabei wirkten Oxaprozin (**24**) und Parecoxib (**25**), der intrinsischen Aktivität von Nurr1 in vier verschiedenen Reporterassays (HEK293T) als inverse Agonisten entgegen. Zusätzlich zu diesen beiden wies Meclofenaminsäure unterschiedliche Aktivitäten mit unterschiedlichen Nurr1-RE auf und lieferte im Gal4-Nurr1-Reporterassay einen EC₅₀-Wert von 4,7 µM. In zellfreien Systemen zeigte sich, dass die NSAIDs das Co-Regulatorrekrutierungsprofil von Nurr1 beeinflussten und die Bindung von NCOR-1, SMRT, nukleärer Rezeptor Co-Aktivatoren 6 (NCoA6) und nukleärer Rezeptor Interaktionsprotein (NRIP) an die Nurr1 LBD modulierten. Außerdem veränderten sie das Dimerisierungsgleichgewicht des Rezeptors. Die Untersuchung von NSAIDs in der Kombination mit AQ-Derivaten offenbarte eine gleichzeitige Nurr1-Modulation mit synergistischen Effekten. Dies könnte darauf hinweisen, dass zwei unterschiedliche Bindungsseiten in der Nurr1-LBD existieren¹²⁶.

Neben den bisher beschriebenen Verbindungen, bei denen der Nachweis einer direkten Interaktion vorliegt, existieren noch mehr Verbindungen, die die Nurr1-Aktivität beeinflussen sollen, bei denen die Bestätigung der direkten Interaktion jedoch noch aussteht. Für das Imidazolpyrimidin SA00025 (**8**) zeigten zwei Luciferase-Reporterassays ein EC₅₀-Wert von 218 nM (Gal4-Nurr1-Volllänge) und 0,7 nM (monomeres Reporterkonstrukt)^{131,132}. Neben den guten pharmakokinetischen und ADMET Eigenschaften, war zu beobachten, dass SA00025 (**8**) bei oraler Verabreichung an Mäusen über sieben Tage, das Gehirn erreichte und dort Nurr1-regulierte Gene induzierte^{99,131,133}. Die Bindung an Nurr1 wurde für mehrere Verbindungen der SA00025-Serie durch einen SPR-Assays untersucht, die Daten sind jedoch lückenhaft und es konnte keine direkte Bindung der Leitverbindung SR24237 nachgewiesen^{131,132} und bestätigt werden¹²⁷.

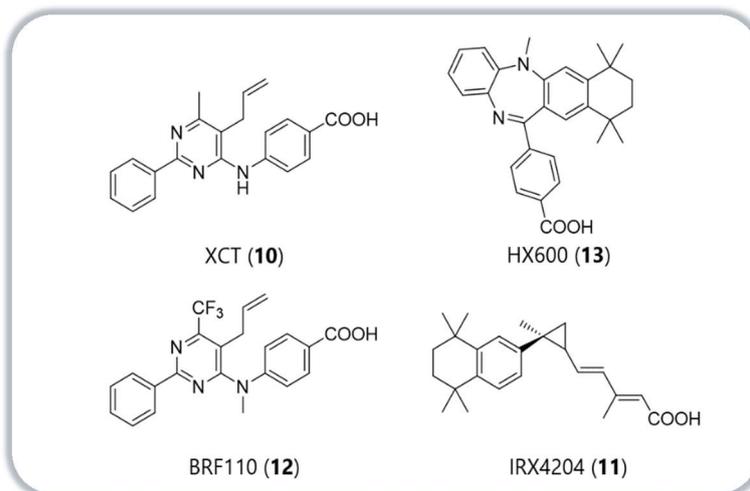
SR10098 und IP7e (**9**) stellen laut Dubios et al. und Hintermann et al. Nurr1-Agonisten mit nanomolarer Potenz (MN9D-Zellen) dar^{134,135}, jedoch bestätigte eine NMR-basierte Bindungs- und Strukturanalyse die erhobenen Daten nicht, wodurch der Beweis einer direkten Bindung zu Nurr1 noch aussteht¹²⁷.

Das antiinflammatorische und antineoplastische Arzneimittel 6-Mercaptopurin (6-MP, **27**) stellte sich in einem Gal4-Vollängen-Reporterassay (CV-1 Zellen) ebenfalls als Nurr1-Aktivatoren heraus, wobei auch hier der Nachweis der direkten Bindung noch erfolgen muss¹³⁶.

1. Einleitung

Neben der Ligandenbindung ist Nurr1 in der Lage, mit RXR ein Heterodimer zu bilden. Dieses Heterodimer kann durch RXR-Agonisten aktiviert werden und könnte eine weitere Möglichkeit bieten die neuroprotektiven Effekte von Nurr1 zu aktivieren. Hier wurden bereits mehrere vielversprechende Kandidaten, wie XCT (**10**), IRX4204 (**11**), BRF (**12**) und **13** (Schema 5), entwickelt. Diese konnten teilweise auch schon erfolgreich *in vitro* und *in vivo* untersucht werden^{101,102,137,138}.

Zudem zeigte sich, dass der RXR-Agonist Bexaroten das Nurr1-RXR-Heterodimer gegenüber dem RXR-Homodimer in einem Biolumineszenz Resonanz Energietransfer (BRET)-Assay (HEK293T-Zellen) begünstigte. *In vivo* Experimente ergaben, dass es durch Bexaroten zu einer Induktion von Nurr1-abhängigen Genen (DAT, VMAT2), zur Verminderung des Verlusts dopaminerger Neuronen und



Schema 5: Nurr1-RXR-Heterodimer-selektive RXR-Agonisten

zur Umkehrung von Verhaltensdefiziten bei Ratten mit 6-OHDA-Läsion kam. Zwar können neuroprotektive Wirkungen in diesem Fall nicht allein durch Nurr1-vermittelte Effekte gerechtfertigt werden, da auch eine Aktivierung durch andere Heterodimere, wie das Leber-X-Rezeptor-(LXR, NR1H2-3)-RXR- und PPAR-RXR-Heterodimer von Bexaroten, stattfinden kann¹³⁹. Die günstigen neuronalen Effekte von Bexaroten sind jedoch ein weiteres Indiz für die vielversprechende Rolle von Nurr1 bei neurodegenerativen Pathologien. Allerdings waren Volakakis et al. nicht imstande die beschriebenen Wirkungen von Bexaroten zu reproduzieren und die Effekte von Bexaroten auf den Verlust von dopaminergen Neuronen und auf Verhaltensdefiziten bei Ratten mit 6-OHDA-Läsion festzustellen. Es konnte nur nachgewiesen werden, dass Bexaroten in der Lage ist die gestörte Ret-Expression und die neurotrophe GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)-Signalisierung wiederherzustellen⁹⁰.

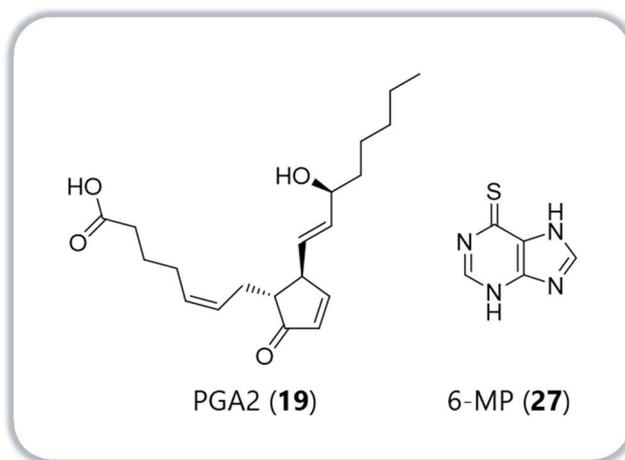
Die bisher entdeckten Liganden für Nurr1 und die Nurr1-RXR-Heterodimer-selektiven RXR-Agonisten haben wertvolle Einblicke in die Mechanismen und Effekte der Nurr1-vermittelten Signalübertragung geliefert, reichen aber noch nicht aus, um therapeutische Möglichkeiten zu

1. Einleitung

erschließen. Daher braucht es neue selektive und potente Nurr1 Modulatoren, die das Verständnis des Rezeptors und seiner pharmakologischen Modulation erweitern können, um das Potenzial von Nurr1 voll aufzuklären und auszuschöpfen.

Liganden des NOR-1

Während auf dem Gebiet der Ligandenidentifikation und -entwicklung für Nur77 und Nurr1 in den vergangenen Jahren wichtige Fortschritte erzielt wurden ist der Schatz verfügbarer Liganden für NOR-1 noch sehr klein. Dies erklärt das sehr eingeschränkte Wissen über die physiologische und pathophysiologische Rolle des Rezeptors zumindest teilweise, da pharmakologische und funktionelle Studien durch den Mangel an Liganden erschwert sind. Bei den beiden einzigen in der Literatur beschriebenen NOR-1-Ligandchemotypen handelt es sich um 6-MP (**27**) sowie dessen Analoga (6-Mercaptopurin Ribose, 6-Mercaptopurin Desoxyribose) und PGA2 (**19**) (Schema 6). 6-MP (**27**) war fähig NOR-1 zu aktivieren, brauchte aber für die Aktivierung die N-terminale AF-1-Domäne. In einem Gal4-NOR-1-AF-1-Assay (in C2C12 My-



Schema 6: NOR-1 aktivierende Verbindungen.

oblasten der Maus) konnte durch 50 μM 6-MP (**27**) eine 113-fache Aktivierung von NOR-1 erreicht werden¹⁴⁰.

Im Gegensatz dazu reichte bei PGA2 (**19**) die LBD von NOR-1 aus, um eine NOR-1-abhängige Gentranskription bei einer Konzentration von 10 μM zu induzieren. Darüber hinaus zeigte sich, dass PGA2 (**19**) in der An- und Abwesenheit von RXR α in der Lage war, NOR-1 zu aktivieren. Diese Erkenntnis stimmt damit überein, dass NOR-1 als Monomer oder Homodimer fungiert. Weiter wurde beobachtet, dass bei Abwesenheit der LBD keine NOR-1 Aktivierung durch PGA2 (**19**) erfolgte¹⁴¹.

Durch den Mangel an selektiven NOR-1 Liganden sind die wenigen bisherigen Erkenntnisse über den Rezeptor mittels KO-Studien gewonnen worden und können noch keinen ausreichenden Einblick in das pharmakologische Potenzial von NOR-1 liefern. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von neuen potenten und selektiven NOR-1 Modulatoren essenziell für die Charakterisierung des Potenzials des Waisenrezeptors.

1. Einleitung

1.2.2 Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ

Neben den Waisenrezeptoren der NR4A-Familie hat sich diese Forschungsarbeit mit dem intensiv erforschten PPAR γ und dessen allosterischer Modulation beschäftigt. Die NR-Unterfamilie NR1C der PPARs umfasst drei Subtypen: PPAR α (NRC1), PPAR δ (auch PPAR β genannt, NR1C2) und PPAR γ (NR1C3). Alle Rezeptoren dieser Gruppe spielen im Fettstoffwechsel und in der Regulation des Lipid- und Glukosehomöostase eine wichtige Rolle. Sie sind wie die NR4A-Familie in der Lage Heterodimere mit RXR zu bilden¹⁴². Die einzelnen Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters. PPAR α findet sich hauptsächlich in der Leber, wird aber auch in braunem Fettgewebe, Herz, Niere und Darm exprimiert. Hauptsächlich reguliert er die β -Oxidation und ist an der Kontrolle des Energiehaushalts beteiligt¹⁴². Der Rezeptor gilt als zentraler Regulator des hepatischen Fett- und Energiestoffwechsels im nüchternen Zustand. PPAR δ zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster, ist aber hauptsächlich an der Regulation der Fettsäureoxidation und des Energiestoffwechsels im Skelettmuskel beteiligt. PPAR γ wird in braunen und weißen Fettgewebe und Immunzellen exprimiert¹⁴³. Er reguliert unter anderem Adipogenese, Fettverteilung im Organismus und den Glucosestoffwechsel, hat aber auch wichtige Funktionen im Immunsystem und Entzündungsgeschehen. Alle drei PPARs werden auch im Gehirn exprimiert und haben dort das höchste Expressionslevel in Neuronen¹⁴². Da im Fokus dieser Arbeit PPAR γ steht, wird im Folgenden nur auf diesen Subtyp eingegangen.

1.2.2.1 Physiologische Rolle von PPAR γ

PPAR γ ist in Geweben zu finden, in denen eine insulinabhängige Glucoseaufnahme stattfindet und spielt dabei eine wichtige Rolle in der Lipid- und Glucosehomöostase¹⁴³. Im Unterschied zu PPAR α und $-\delta$, fördert PPAR γ die Lipogenese und Speicherung von Lipiden im Fettgewebe¹⁴⁴. Dabei ist er entscheidend für den Differenzierungsvorgang von Präadipozyten zu Adipozyten, im weißen und braunen Fettgewebe^{145,146}. Ohne PPAR γ sind reife Adipozyten nicht überlebensfähig, wodurch die wichtige Rolle dieses Rezeptors im Fettgewebe nochmals unterstrichen wird¹⁴⁷.

Die Aktivierung von PPAR γ bewirkt eine Aufnahme von zirkulierenden Fettsäuren in Adipozyten und zu einer Steigerung der Insulinsensitivität. Die Insulinsensitivität konnte einerseits durch eine erhöhte Expression von Proteinen erreicht werden, die in die Glucosehomöostase eingreifen (c-CBL-assoziiertes Protein) oder andererseits durch die Erhöhung der Expression des Glucosetransporters 4 (GLUT4), wodurch es zu einer Insulin-vermittelten Aufnahme von Glucose

1. Einleitung

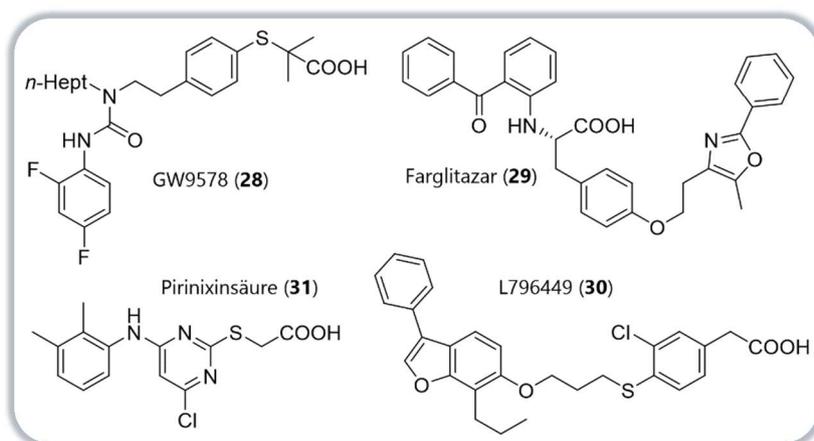
in die Zelle kam^{144,148–150}. Darüber hinaus führte die PPAR γ -Aktivierung zu einer Steigerung der Plasmakonzentration von Adiponektin, wodurch die Fettsäureoxidation in Leber und Muskel induziert wurde¹⁵¹.

Neben dem Einfluss von PPAR γ auf den Lipidstoffwechsel, war ebenfalls eine Beteiligung an Immun- und Entzündungsvorgängen zu beobachten¹⁵². PPAR γ hatte unter anderem einen Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten in funktionsfähigen Makrophagen^{153,154,155}. *In vitro* Studien zeigten, dass die Expression von PPAR γ in humanen zirkulierenden Monozyten erst stieg, wenn es zu ihrer Aktivierung und anschließender Differenzierung zu Makrophagen kam^{155,156}. Ähnlich verhielt es sich bei murinen ruhenden Makrophagen, die eine geringe Expression des Rezeptors aufwiesen während Makrophagen bei einer Entzündungsreaktion eine deutlich erhöhte PPAR γ Expression zeigten¹⁵⁷. Die Induktion von PPAR γ führte zu einer Erhöhung des Thrombozytenglykoprotein 4 (CD36) auf Makrophagen. CD36 ist in der Lage oxidiertes LDL (*low density lipoprotein*) zu erkennen und förderte dessen Aufnahme und Entsorgung¹⁵⁷.

Wie bereits erwähnt, wird PPAR γ auch im Gehirn, besonders in Neuronen und Astrozyten, exprimiert¹⁵⁸. *In vitro* Experimente in Oligodendrozyten demonstrierten, dass die Aktivierung von PPAR γ die Oligodendrozytenaktivierung förderte, bei gleichzeitiger Hemmung ihrer Proliferation^{159,160}. Zudem ist es auffällig, dass sich eine besonders hohe PPAR γ Konzentration in dopaminergen Zellen (Hippocampus, Hypothalamus, Basalganglien) findet, wofür es bisher noch keine Erklärung gibt¹⁵⁸.

1.2.2.2 Liganden des PPAR γ -Rezeptors

PPARs gelten als Fettsäuresensoren und können durch verschiedene endogene oder mit der Nahrung aufgenommene Lipide aktiviert werden. Hierzu zählen z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Fettsäuremetabolite wie Prostaglandine und Vitamin E-Metabolite^{161–163}. Basierend auf der Struktur dieser natürlichen Liganden wirken auch zahlreiche Fettsäure-Mimetika als PPAR-Agonisten. In den vergangenen Jahrzehnten



Schema 7: Nicht selektive PPAR γ -Liganden.

1. Einleitung

wurden viele Liganden für alle drei Subtypen entdeckt. Dabei stellte sich heraus, dass das Erreichen einer Subtypen-Selektivität nicht trivial ist. Viele Liganden zeigen Aktivität auf allen drei Rezeptoren, wie der pan-PPAR-Agonist GW9578 (**28**) oder dualen Agonismus, wie Farglitazar (PPAR α / δ -Agonist, **29**) oder L796449 (PPAR γ / δ -Agonist, **30**)^{164–168} (Schema 7). Die Pirinixinsäure, WY-14,643 (**31**), wurde erst als selektiver PPAR α -Agonist identifiziert¹⁶⁹, später stellte sich heraus, dass diese Verbindung ebenfalls bei PPAR γ und RXR zu einer Aktivierung führte^{170,171} (Schema 7).

Für PPAR γ existieren aber auch eine Reihe von selektiven und potenten Agonisten: Rosiglitazon

(**32**), Pioglitazon (**33**),

GW1929 (**34**)¹⁷² und **35**¹⁷³

(Schema 8). Neben einer Vielzahl von Agonisten gibt es mit

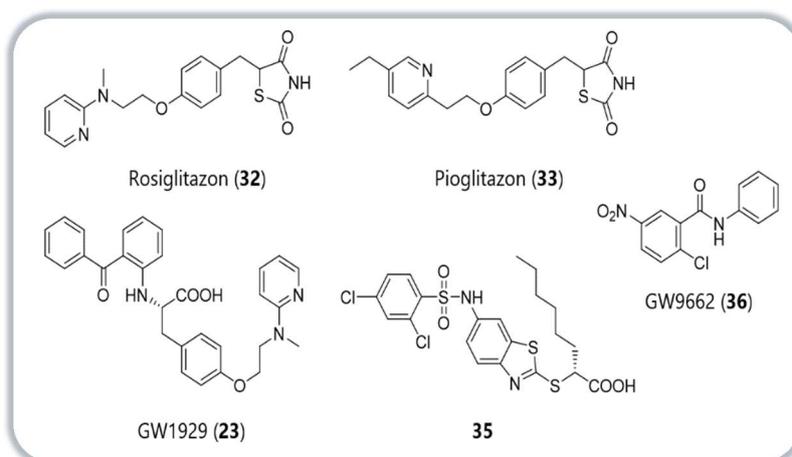
GW9662 (**36**) auch einen selektiven und potenten PPAR γ -

Antagonisten, der für die Untersuchung der PPAR γ -Aktivität

und deren Auswirkungen einen besonderen Wert als chemisches Tool besitzt¹⁷⁴.

Die prominentesten PPAR γ -Liganden sind die Thiazolidindione (TZD) Rosiglitazon (**32**) und Pioglitazon (**33**), die zur Behandlung von Typ II Diabetes verwendet werden^{175,176}. Ihr Einsatz wurde zuletzt aufgrund zum Teil schwerwiegender Nebenwirkungen (Gewichtszunahme, Knochenbrüche, möglicherweise erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, erhöhtes Blasenkrebsrisiko) und der im Vergleich zu anderen Verbindungen geringen Wirksamkeit eingeschränkt¹⁷⁷. Jedoch ist das therapeutische Potenzial von PPAR γ bei Indikationen, wie nicht alkoholischer Steatohepatitis, neurodegenerativen Erkrankungen und Typ II Diabetes noch nicht ausgeschöpft^{5,178,179}. Es bedarf daher neuer Ansätze, um die pharmakologische Modulation des PPAR γ effizienter und sicherer nutzbar zu machen.

Bei den meisten PPAR γ -Liganden, einschließlich der bisher genannten Modulatoren, handelt es sich um Liganden, die die orthosterische Bindungstasche des PPAR γ -Rezeptors adressieren, über welche auch die natürlichen Liganden wirken. Sie bildete lange Zeit den Forschungsschwerpunkt bei der Entwicklung neuer PPAR γ -Liganden und soll daher im Folgenden näher betrachtet werden.



Schema 8: Selektive PPAR γ -Liganden.

1. Einleitung

PPAR γ zeigt einen ähnlichen Aufbau der Domänen wie sie generell bei NRs zu finden sind. Die LBD setzt sich hier aus den klassischen H1-H12 zusammen und enthält noch eine zusätzliche Helix (H2'). Die LBD von PPAR γ ist im Vergleich zu klassischen LBDs größer und enthält in ihrem Zentrum die LBP mit einer Größe von ca. 1200 Å³. Die LBP von PPAR γ , auch orthosterische Bindungstasche genannt, unterteilt sich in drei Bereiche, deren Form wie ein „T“ oder „Y“ beschrieben werden kann. Jeder Bereich zeigt dabei unterschiedliche Eigenschaften und Bindungspräferenzen. Der erste Bereich bildet sich aus H3, H5, H11 und H12, hat einen hydrophilen Charakter und beinhaltet die Interaktionsstelle für die saure Kopfgruppe von Liganden wie Rosiglitazon (**32**). Der zweite Bereich formt sich aus H2', H3, H6, H7 und der β -Schleifen-Region und hat hauptsächlich hydrophoben Charakter. Bereich drei ist von der β -Schleife umgeben befindet sich aber tiefer in der Tasche und wird zusätzlich noch von H2, H3 und H5 gebildet. In diesem Bereich befinden sich hydrophobe und hydrophile Regionen¹⁸⁰. Bei der Interaktion mit einem Liganden ist der größte Teil der hydrophoben Wechselwirkungen eher unspezifisch, wodurch sich die hohe Diversität der Liganden erklären lässt¹⁸¹.

Die Co-Kristallisation von **32** mit PPAR γ war eine der ersten PPAR-Kristallstrukturen, die gelöst wurde (PDB: 2PRG)¹⁸¹. **32** nimmt darin eine hufeisenförmige Konformation um H3 ein (Abbildung 5). Dabei bildet die Carbonylgruppe der TZD-Kopfgruppe von **32** Wasserstoffbrücken-

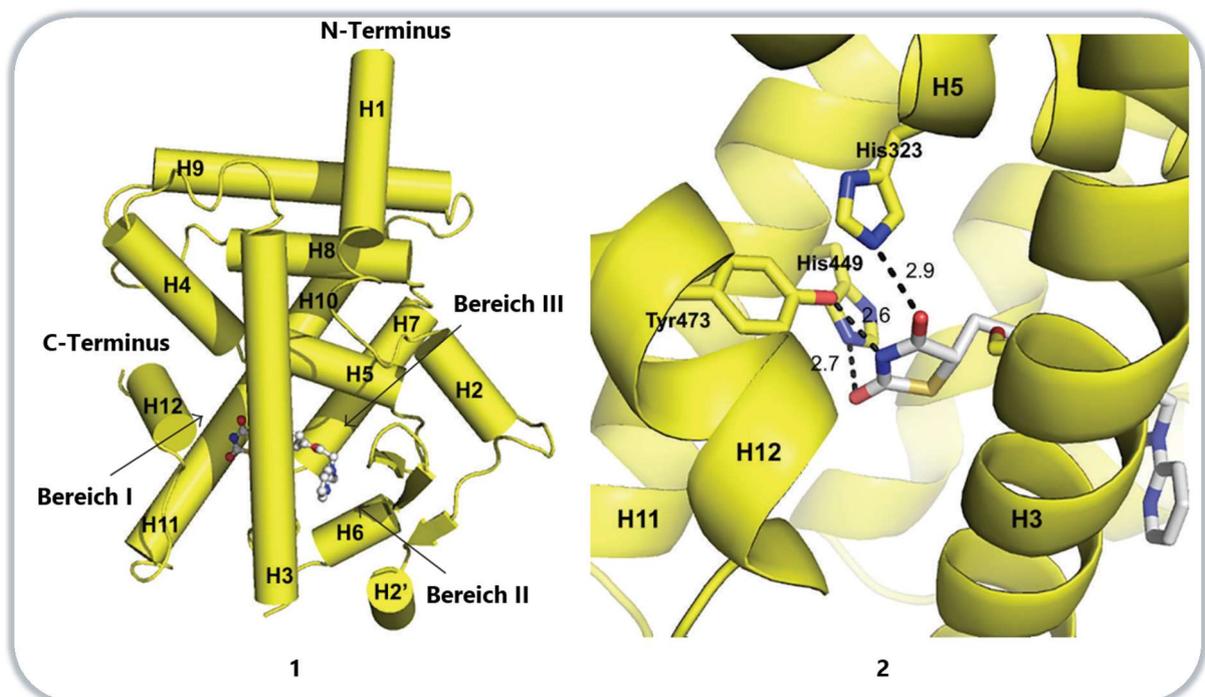


Abbildung 5: Kristallstruktur von **31** (weiß, mit farbigen Elementen) gebunden an die LBD von PPAR γ (gelb, PDB: 2PRG¹⁸¹). 1) **31** gebunden an die LBD von PPAR γ . 2) Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk der TZD-Kopfgruppe von **31** mit Resten der AF-2. Die Abbildung ist aus Publikation¹⁸¹ entnommen.

1. Einleitung

bindungen mit zwei Histidin-Resten (His323, His449). Die Aminosäure Tyr473 formt eine Wasserstoffbrückenbindung mit His323. Der zum Teil negativ geladene Stickstoff der TZD-Kopfgruppe ist in der Wasserstoffbrückenbindungsreichweite der Hydroxylgruppe der Seitenkette von Tyr473¹⁸¹. Tyr473 befindet sich in der AF-2, sodass diese Wasserstoffbrückenbindung von Tyr473 einen zentralen Bestandteil des Mechanismus ausmacht, in dem es zur Stärkung der Bindungsaffinität von Co-Aktivatoren/Schwächung der Bindung von Co-Repressoren kommt, durch die die Aktivierung des Rezeptors erfolgt. Am Rest His449 bildet ein Lysinrest (Lys367) eine weitere sekundäre Wasserstoffbrückenbindung mit dem Liganden. Durch die primären und sekundären Wasserstoffbrückenbindungen kommt es zu einer Fixierung der Kopfgruppe und den beteiligten Aminosäuren. In unmittelbarer Nähe zur Kopfgruppe befindet sich das Schwefel-Atom des TZD-Rings in einer hydrophoben Region die durch die Aminosäuren Phe363, Gln286, Phe282 und Leu469 geformt wird. Der zentrale Benzenring verhardt direkt hinter H3 und geht hydrophobe Kontakte mit dieser ein. Der überbrückende Sauerstoff zwischen Benzenring und Pyridinring führt zu einer wichtigen Geometrie für den Pyridinring, der die Tasche zwischen H3 und β -Schleife einnimmt. Beim bioisosterischen Austausch der Kopfgruppe gegen eine α -substituierte Carbonsäure bleibt die Affinität und die Rezeptoraktivität erhalten¹⁸¹. Diese ist insbesondere bei natürlichen Liganden zu finden die mit His323 und His449 Schlüsselinteraktionen eingehen^{181,182}.

Neben der großen Anzahl von PPAR γ -Agonisten, gibt es auch den potenten irreversiblen Antagonisten, GW9662 (**36**).

36 bildet eine kovalente Bindung zu Cys285 in H3 von PPAR γ (PDB: 3B03¹⁸³), führt dadurch zu einer physischen Blockade der Bindung eines Agonisten (z.B. Rosiglitazon (**32**), PDB: 7AWC¹⁸⁴) und somit zu ei-

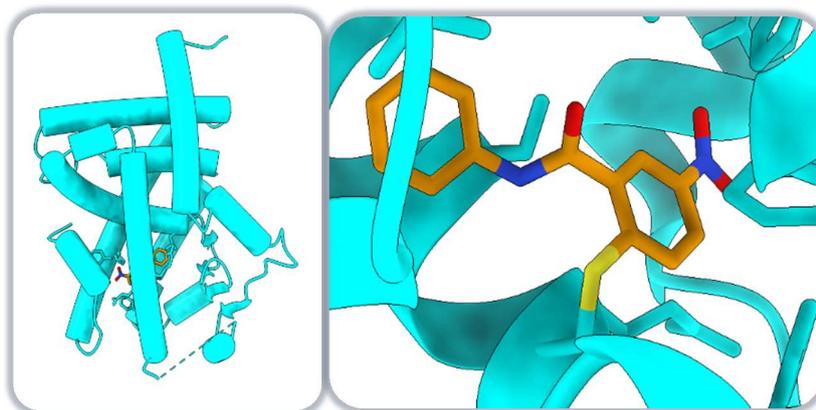


Abbildung 6: Co-Kristallisation von **36** mit der LBD von PPAR γ (PDB: 3B03¹⁸³).

ner Verhinderung der Aktivierung über die orthosterische Bindungsstelle (Abbildung 6, Abbildung 7)^{185,157}. Allerdings ist zu sehen, dass die aktive Konformation des Rezeptors von **36** nicht beeinträchtigt wird, so dass eine Aktivierung von **36**-gebundenem PPAR γ möglicherweise durch alternative Mechanismen erfolgen kann.

1. Einleitung

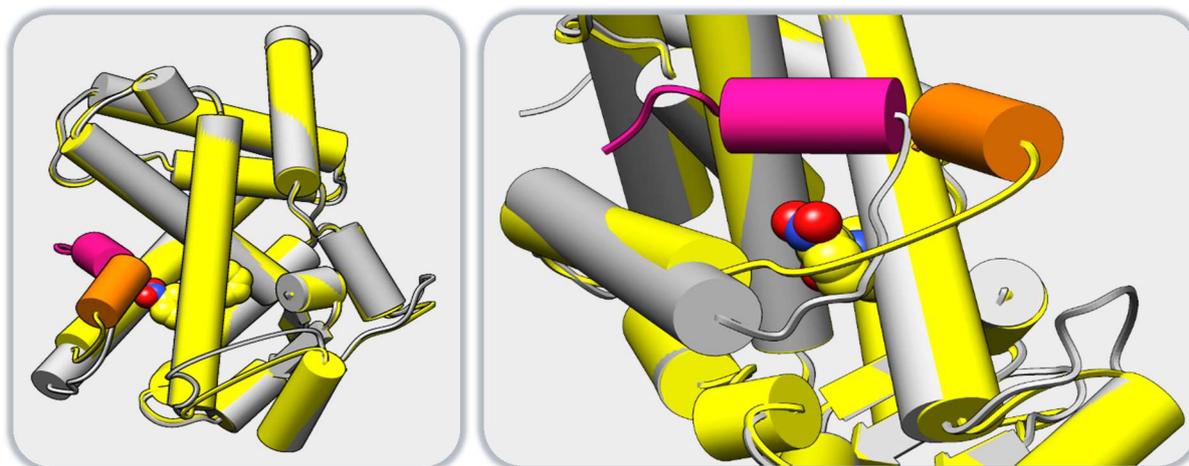
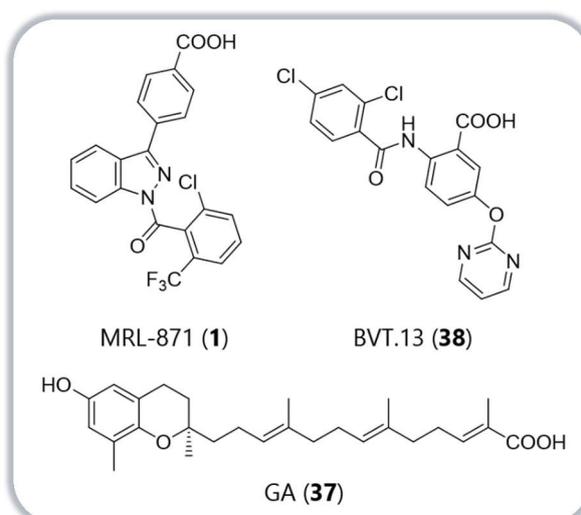


Abbildung 7: Struktureller Vergleich der PPAR γ -LBD mit dem Agonisten Rosiglitazon (PDB: 7AWC¹⁸⁴, Protein grau, Helix 12 pink, Ligand nicht gezeigt) oder seinem irreversiblen Antagonisten GW9662 (PDB: 3B0R¹⁸³, Protein gelb, H12 orange, Ligand gelb (**36**)). **36** bindet kovalent an die orthosterische Bindungsstelle von PPAR γ und induzierte eine verschobene Position von H12 verglichen zu der Konformation mit Agonisten. Der Ligand beeinträchtigte die aktive Konformation von H12 nicht, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung über alternative Mechanismen nicht durch **36** blockiert wird.

Neben der orthosterischen Bindung wurde in PPAR γ auch eine alternative, allosterische Ligandbindestelle identifiziert und beobachtet, dass einige Liganden gleichzeitig orthosterische und allosterische Bindung eingehen^{9,10,184,186–188}. Allosterische Modulation von PPAR γ könnte, wie in Kapitel 1.1.2.2 diskutiert, neue gezieltere Therapiemöglichkeiten mit einem möglicherweise geringeren Nebenwirkungsprofil erschließen. Durch die Verwendung selektiver allosterischer Liganden besteht gleichzeitig die Chance, das Verständnis sowohl bekannter als auch unbekannter Mechanismen des Rezeptors zu verbessern.

Das Vitamin E Mimetikum Garcinolsäure (GA, **37**) stellt einen besonderen PPAR γ -Liganden mit allosterischer Bindung dar (Schema 9). GA (**37**) vermochte PPAR γ *in vitro* sowohl allein als auch in der Kombination mit Pioglitazon (**33**) zu aktivieren. Bei einer Kombination von GA (**37**) und Pioglitazon (**33**) konnte eine Verstärkung der Transkriptionsaktivität beobachtet werden. Die Co-Kristallstruktur von PPAR γ im Komplex mit GA (PDB: 7AWD¹⁸⁴) zeigte, dass GA (**37**) in der Lage ist gleichzeitig die orthosterische und eine allosterische Bindungstasche zu besetzen. Neben GA (**37**)



Schema 9: Orthosterische und allosterische PPAR γ -Liganden.

wurden bereits MRL-871 (**1**) und BVT.13 (**38**) (Schema 9) als allosterische Liganden von PPAR γ

1. Einleitung

identifiziert, wobei an deren Bindung zum Teil auch die orthosterische Tasche eingenommen wurde^{9,10}. Die allosterische Bindung von **37** erklärt die Fähigkeit PPAR γ zusammen mit Pioglitazon zu aktivieren und deutet an, dass GA-Potenzial für eine PPAR γ -Modulation besitzt, die sich von klassischen Agonisten unterscheidet. Diese Annahme wird auch durch Untersuchungen zu Effekten auf das Co-Regulator-Interaktions-Profil und auf die Genexpression in HepG2-Zellen (humane Hepatozyten) unterstützt, die für GA (**37**) und Pioglitazon (**33**) deutlich unterschiedliche Effekte feststellten. Während **33** die Rekrutierung von CREB-Bindungsprotein (CBP), PPAR γ Co-Aktivator 1- α (PGC-1 α), Vitamin D Rezeptor-Interaktionsprotein (DRIP), NCoA6 und Steroid Rezeptor Co-Aktivator (SRC) erhöhte und SMRT verdrängte, führte die Behandlung mit **37** zur Verdrängung der gleichen Co-Aktivatoren und zur Rekrutierung der Co-Repressoren NCor1 und SMRT. Bei der Kombination von **33** und **37** dominierten die Effekte von **37** und wirkten den von **33** induzierten co-regulatorischen Effekten entgegen. Um festzustellen, ob sich die unterschiedlichen Effekte von **33** und **37** auch auf molekularer Ebene widerspiegeln wurden PPAR γ exprimierende HepG2-Zellen mit **37** (10 μ M), **33** (1 μ M), **37** (10 μ M) + **33** (1 μ M) oder **37** (10 μ M) + GW9662 (10 μ M, **36**) behandelt und die Genexpression mittels mRNA-Sequenzierung untersucht. Hierbei waren bemerkenswerte Unterschiede in der Auswertung der Genexpressionsprofile festzustellen. Während **33** nur 439 Gene regulierte, waren es bei **37** 5578 regulierte Gene, wovon circa ein Drittel, der von **33** regulierten Gene ebenso **37** beeinflusste. Dies bestätigte zum einen, dass beide an PPAR γ wirken und zum anderen eine unterschiedliche PPAR γ -Modulation aufweisen. Bei den von **33** regulierten Genen, handelte es sich hauptsächlich um Gene, die mit dem PPAR-Signalweg in Verbindung stehen und an der Regulation von Lipidspeicherung (PLINs), Gluconeogenese (PCK1) und Fettsäureoxidation (ACAA1, ACOX, CPT1A) beteiligt sind. Während **37** ebenfalls die Gluconeogenese (PCK1) beeinflusste, wurden noch mehr Gene der Fettsäureoxidation (ACOX1, ACOX3, ACADM; CPT1A, CPT2 und EHHADH) sowie Fettsäuretransportergene induziert (ACSLs, SLC27A4). Zudem beeinflusste **37** Schlüsselgene des Insulinsignalings (FOXO1, IRS1, PIK3s), Glucosemetabolismus, (G6PC, GDPGp1) und oxidativen Phosphorylierung (Cytochrom C Oxidase, NADH-Dehydrogenase), die keine Beeinflussung von **33** erfuhren. Bei der Kombination von **36** und **37** war zu beobachten, dass **36** 51% der Effekte von **37** wieder aufhob, wodurch eine PPAR γ vermittelte Regulation dieser Gene durch **37** naheliegend ist. Bei der Kombination von **33** und **37** zeigten sich unterschiedliche Effekte auf die von PPAR γ -regulierten Genen im Vergleich zu den einzelnen Wirkstoffen, was wiederum mit den unterschiedlichen Ergebnissen aus dem Co-Regulator-Interaktions-Profil

1. Einleitung

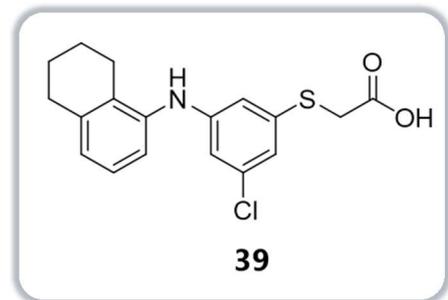
übereinstimmte. Beachtlich ist hierbei, dass die Kombination deutlich weniger Gene regulierte (740 Gene) als **37** (5578 Gene) allein¹⁸⁴. Die Auswertung von Pfaden nach der Kyoto-Enzyklopädie der Gene und Genome (KEGG)^{189,190} konnte ebenfalls bemerkenswerte Unterschiede in den Effekten von **33** und **37** auf das Genexpressionsprofil aufzeigen. Dabei zeigte sich für **33** lediglich eine selektive und signifikante Hochregulierung von PPAR-Signalwegen, während für **37** unter anderem eine Beeinflussung von mehreren KEGG-Signalwegen (Thermogenese, oxidative Phosphorylierung, Fettsäuremetabolismus, Insulin-Signaling) festgestellt wurde, die mit der Aktivierung von PPAR in Verbindung gebracht werden konnten. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass unterschiedliche Effekte von GA (**37**) und Pioglitazon (**33**) auf die Aktivität von PPAR γ in Zusammenhang mit der allosterischen Bindung von GA stehen und möglicherweise neue Wege in der PPAR γ -Modulation eröffnen¹⁸⁴.

Die allosterische Bindungstasche von PPAR γ und die damit verbundenen Effekte stellen ein bisher noch nicht erschlossenes Forschungsgebiet dar. Es bedarf daher neuartiger PPAR γ -Liganden, die eine selektive allosterische PPAR γ -Modulation ermöglichen, um die besonderen Effekte der allosterischen Bindung aufzuklären.

2. Motivation und Zielsetzung

Im Hinblick auf die Existenz einer allosterischen Bindungsstelle in der LBD von PPAR γ und die Tatsache, dass zwar eine Vielzahl an PPAR γ Liganden verfügbar sind, die die orthosterische Bindungstasche adressieren, aber kein selektiv allosterischer Binder bekannt ist, besteht ein hoher Bedarf an neuen chemischen Tools, die diese Lücke schließen. Im Fokus dieser Forschungsarbeit steht daher die Entwicklung einer neuen Tool-Verbindung, die selektiv allosterisch an PPAR γ bindet und die umfassende in vitro Charakterisierung der Effekte eines solchen neuartigen PPAR γ Liganden. Dabei basiert diese Arbeit auf der Entdeckung der ortho- und allosterischen Bindung von GA (**37**) an PPAR γ und einer gemeinsamen Bindung von GA (allosterisch, **37**) und Pioglitazon (orthosterisch, **33**)¹⁸⁴. Die limitierte synthetische Zugänglichkeit und mangelhafte Selektivität von GA (**37**) beschränken jedoch seine Anwendung als chemisches Tool zur Untersuchung der allosterischen Modulation. Eine weitere Verbindung mit ähnlichen ortho- und allosterischen Bindungseigenschaften wie **37** wurde mit **39** (Schema 10) von

Dr. Julius Pollinger identifiziert. **39** weist günstigere Eigenschaften und synthetische Zugänglichkeit als GA auf. Die Co-Kristallstruktur von PPAR γ im Komplex mit **39** (PDB: 8ATY¹⁹¹) zeigte, dass **39** PPAR γ ebenfalls in einem 2:1 Verhältnis bindet und sich in die ortho- und allosterische Bindungstasche einlagert¹⁷¹. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher basierend auf **39** ein selektiv allosterischer PPAR γ Ligand entwickelt, umfassend charakterisiert und als chemisches Tool verwendet



Schema 10: Chemische Struktur von **39**.

werden, um die Rolle und Effekte der allosterischen PPAR γ Modulation zu studieren. Die Ergebnisse wurden in der Publikation „Targeting the alternative vitamine E metabolite binding site enables non-canonical PPAR γ modulation“¹⁹¹ veröffentlicht und werden in Kapitel 3.2 ausführlich dargestellt und diskutiert.

Daneben befasste sich diese Forschungsarbeit mit den Waisenrezeptoren Nur77 und NOR-1 und verfolgte das Ziel, chemische Startmaterie zur Entwicklung neuer Modulatoren dieser Rezeptoren zu identifizieren. Dabei sollte der Fokus auf der Entwicklung von Leitstrukturen liegen, die im Vergleich zu den wenigen verfügbaren Nur77 und NOR-1 Liganden verbesserte Wirkstoffeigenschaften und insbesondere geringere Lipophilie aufweisen. Zur Identifikation von

2. Motivation und Zielsetzung

Nur77 und NOR-1 Modulatoren mit günstigen Eigenschaften sollte ein Fragment-basierter Ansatz verfolgt und daher ein Arzneistoff-Fragment-Screening durchgeführt werden. Dabei identifizierte Liganden sollten anschließend weiter charakterisiert und optimiert werden, um Leitstrukturen und frühe chemische Tools für Nur77 und NOR-1 zu entwickeln. Die Ergebnisse sind in den Publikationen „Fragment-based discovery of orphan nuclear receptor Nur77/NGFI-B ligands“¹⁹² und „Druggability Evaluation of the Neuron Derived Orphan Receptor (NOR-1) Reveals Inverse NOR-1 Agonists“¹⁹³ zu finden und werden in Kapitel 3.1 ausführlich aufgeführt und diskutiert.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 NR4A-Familie

Der NR4A-Familie fehlt es an potenten und selektiven Verbindungen, um das noch zum Teil schlummernde Potential dieser Rezeptoren zu entdecken (siehe Kapitel 1.2.1). Um einen wichtigen Schritt zum Schließen dieser Lücke zu nehmen, wurde für die Rezeptoren Nur77 und NOR-1 ein Arzneistoff-Fragment-Screening durchgeführt, das im Folgenden beschrieben wird.

3.1.1 Arzneistoff-Fragment-Screening

Das Arzneistoff-Fragment-Screening wurde mit einer Fragment-Bibliothek von Prestwick Chemical¹⁹⁴ in einem Gal4-Reporterassay (transient transfizierte HEK293T-Zellen) für Nur77 und NOR-1 zusammen mit Daniel Zaienne durchgeführt. Diese Bibliothek beinhaltet 480 Arzneistoff-Fragmente, die aus bekannten Strukturmotiven von zugelassenen Arzneistoffen stammen. Der zur Durchführung verwendete zelluläre Assay basierte auf einem konstitutiv exprimierten chimären Rezeptor, der aus der menschlichen Nur77-LBD oder NOR-1-LBD und der DBD des Hefeproteins Gal4 sowie aus dem Gal4-sensitiven Glühwürmchen-Luciferase-Reporter Konstrukt besteht. Dazu wurde eine konstitutiv exprimierte Renilla-Luciferase co-transfiziert, um die Transfektionseffizienz und die Toxizität des Wirkstoffs zu testen und zu überwachen (siehe Kapitel 5.4 Reporterassays).

Im ersten Screening erfolgte die Testung der Fragmente in Einzelmessungen bei einer Konzentration von 100 μ M in zwei biologisch unabhängigen Wiederholungen. Da es sich bei Nur77 und NOR-1, wie bereits erwähnt, um konstitutiv aktive Rezeptoren handelt, musste für die Auswahl von primären Hits Kriterien gewählt werden, die die Induktion und die Repression der Rezeptoraktivität berücksichtigten. Alle Fragmente die eine Induktion von $\geq 150\%$ (Agonisten) oder eine Repression auf $\leq 60\%$ (inverse Agonisten) der Rezeptoraktivität im Vergleich zu DMSO (0,1%)-behandelten Zellen verursachten, wurden als primäre Fragment-Hits ermittelt. Die Anwendung dieser Kriterien identifizierte für Nur77 neun und für NOR-1 16 Fragmente, die eine Induktion oder Repression des Rezeptors verursachten. Anschließend erfolgte eine erneute Testung der identifizierten Fragmente auf ihre Wechselwirkung mit Gal4-Nur77/NOR-1 in vier biologisch unabhängigen Wiederholungen. Unter den neun Fragmenten bei Nur77 befand sich auch der bereits bekannte NR4A-Aktivator Quinolin-4-amin, der auch in diesem As-

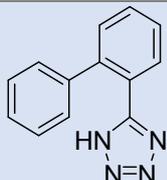
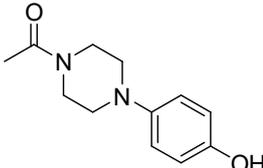
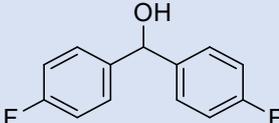
3. Ergebnisse und Diskussion

say System eine zufriedenstellende Aktivierung zeigte¹²⁸. Da bei diesem Screening die Identifizierung eines selektiven Nur77-Liganden im Fokus stand, fand 4-Quinolin-4-amin in der weiteren Auswertung keine Berücksichtigung¹²⁸. Für die identifizierten Fragmente von beiden Rezeptoren erfolgte anschließend ein Kontrollexperiment mit dem Liganden-unabhängigen Transkriptionsinduktor Gal4-VP16^{195,196} (n = 4), um unspezifische Auswirkungen auf die Reporteraktivität zu erfassen und dadurch falsch-positive Hits auszuschließen. Von den acht verbliebenen Hits bei Nur77 offenbarten fünf, im Kontrollexperiment mit Gal4-VP16, unspezifische Effekte und mussten aus diesem Grund ausgeschlossen werden. Die Verbindungen **40-42** wiesen signifikante Gal4-Nur77 abhängige Effekte auf und wurden für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Für **40** und **42** war eine leichte Herabsetzung der Gal4-VP16 Reporterogenaktivität festzustellen, während dieser Effekt für **41** nicht zu beobachten war. Bei NOR-1 blieben nach der erneuten Testung im Gal4-NOR-1 und Gal4-VP16-Kontrollexperimenten, von den anfangs 16-Fragment-Hits, ebenfalls drei übrig (**41, 43, 44**).

3.1.2 Charakterisierung der Screening-Hits

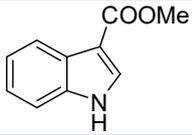
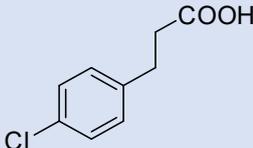
Die resultierenden Liganden beider Rezeptoren wurden anschließend auf ihre Aktivität an dem jeweiligen Rezeptor noch umfassender charakterisiert. Die Ergebnisse dafür sind in Tabelle 3 und 4 aufgeführt.

Tabelle 3: IC₅₀-Werte der drei Screening-Hits (**40, 41, 42**) von Nur77 im Gal4-Reporterassay, Nur77-Volllängenassay und Bindungsaffinitäten gemäß isothermer Titrationskalorimetrie.

ID	Struktur	Aktivität an Gal4-Nur77	Aktivität an NBRE	K _d
40		IC ₅₀ = 48 ± 8 μM	IC ₅₀ = 22 ± 3 μM	7,8 μM
41		IC ₅₀ = 52 ± 3 μM	IC ₅₀ = 35 ± 6 μM	10 μM
42		IC ₅₀ = 82 ± 5 μM	/	/

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4: IC₅₀- und EC₅₀-Werte der drei Screening-Hits (**41**, **43**, **44**) von NOR-1 im Gal4-Reportergenassay.

ID	Struktur	Aktivität an Gal4-NOR-1	Aktivierung/Rest Aktivierung bei 100 µM
41		IC ₅₀ = 73 ± 19 µM	64 ± 7%
43		IC ₅₀ = 47 ± 8 µM	47 ± 6%
44		EC ₅₀ = 44 ± 6 µM	132 ± 4%

Für Nur77 konnten **40** (IC₅₀ = 48 ± 8 µM) und **41** (IC₅₀ = 52 ± 3 µM) als moderate inverse Agonisten im Gal4-Reportergenassay (HEK293T-Zellen) identifiziert werden, **42** zeigte eine geringere Aktivität. Zudem war bei **40** (IC₅₀ = 22 ± 3 µM) und **41** (IC₅₀ = 35 ± 6 µM) ebenfalls eine Aktivität am Nur77 Vollängenrezeptor in einem Reportergenassay mit dem natürlichen humanen Response-Element (NBRE) zu beobachten. Der Nachweis der Bindung von **40** (7,8 µM) und **41** (10 µM) an die rekombinante LBD von Nur77 wurde zudem mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) bestätigt (Abbildung 8). Die Bindung von **42** war nur schwach zu sehen. **41** demonstrierte ebenfalls eine inverse Aktivität (IC₅₀ = 73 ± 19 µM) an NOR-1, die jedoch schwächer ausfiel als bei Nur77. Zudem konnten mit **43** (IC₅₀ = 47 ± 8 µM) ein inverser NOR-1 Agonist und mit **44** (EC₅₀ = 44 ± 6 µM) ein Agonist für NOR-1 identifiziert werden. Im Vergleich zu den Liganden-Hits von anderen Rezeptoren, die mit dieser Bibliothek untersucht wurden, ist die Anzahl der Hits

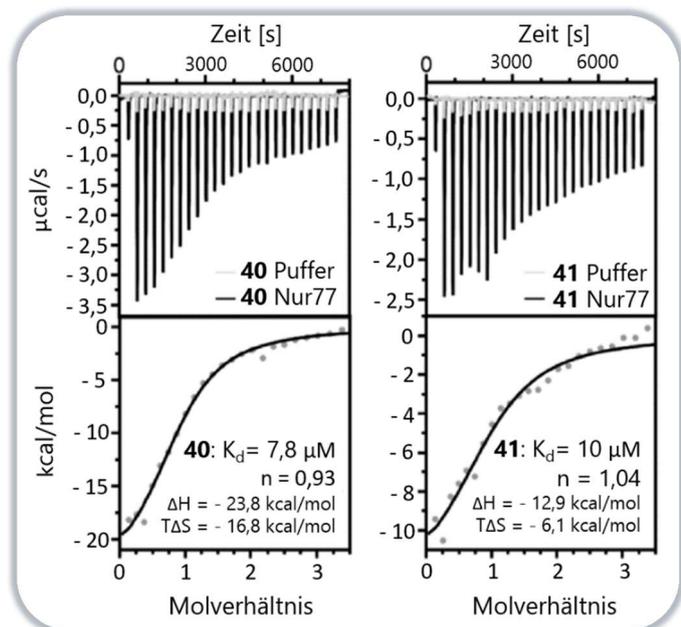


Abbildung 8: ITC-Ergebnisse bestätigen die Bindung von **40** und **41** an die rekombinante Nur77-LBD¹⁹².

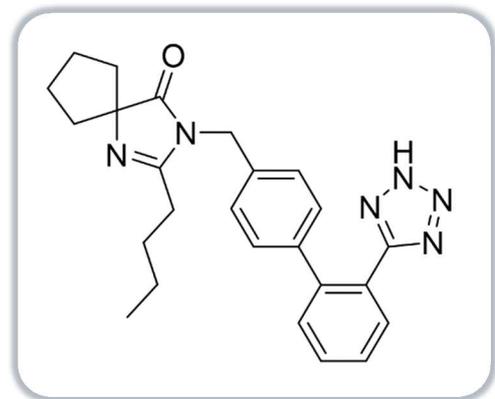
3. Ergebnisse und Diskussion

bei Nur77 und NOR-1 gering¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Dies könnte ein Hinweis auf die beschränkte Ligandenbindung an diesen Rezeptoren oder eine unzureichende Lipophilie der untersuchten Verbindungen im Vergleich zu bekannten Liganden sein.

3.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung der neu identifizierten Nur77-Liganden

Der folgende Teil beschränkt sich auf die weitere Charakterisierung der identifizierten Fragmente für den NR Nur77. Auf die weitere Charakterisierung der Fragmentliganden von NOR-1 wird am Ende dieses Kapitel (Kapitel 3.1.6) kurz eingegangen. Die ausführliche Darstellung der Daten und genauen Abläufe der Charakterisierung von NOR-1 ist Teil der Forschungsarbeit von Daniel Zaienne und wird in dieser beschrieben.

Für die weitere Charakterisierung der Screening-Hits wurde von den drei verbliebenen Hits die zwei vielversprechendsten (**40**, **41**) weiterverfolgt. Bei Verbindung **40** handelt es sich um ein Fragment aus einer prominenten Arzneistoffklasse, den Sartanen. Daher lag es nahe, die Wirkstoffe dieser Arzneistoffklasse hinsichtlich ihrer Aktivität auf Nur77 zu untersuchen. Für die Untersuchung erfolgte die Testung aller kommerziell verfügbaren Sartane (Azilsartan, Candesartan, Eprosartan, Fimasartan, Irbesartan, Losartan, Olmesartan, Telmisartan, Valsartan). Dabei zeigte nur Irbesartan (**45**, Schema 11) eine Aktivität, die sich in einem inversen Agonismus ($IC_{50} = 30 \mu M$) äußerte und auch durch das Kontrollexperiment mit Gal4-VP16 bestätigt wurde. Der Versuch eine Bindung in einem nicht zellulären System mittels ITC, nachzuweisen scheiterte jedoch. Angesichts der bis dahin nicht so



Schema 11: Struktur von Irbesartan (**45**).

vielversprechenden Ergebnisse bei **40** und **45**, lag der Fokus der weiteren Untersuchungen auf **41**. Bei der Charakterisierung von **41** wurde auf kommerziell verfügbare Verbindungen zurückgegriffen und ergänzend dazu vier Verbindungen (**47**, **49**, **50**, **51**) synthetisiert (siehe Kapitel 5.1.1). Bei der Selektion der kommerziell verfügbaren Verbindungen diente das *N*-Phenylpiperazin von **41** als Grundstruktur. Es wurden Verbindungen ausgewählt, die eine oder keine Acetyl-Gruppe im Bereich des Piperazin-N1 und variierende Reste am Phenyl-Ring aufwiesen und diese anschließend im Gal4-Assay getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: Aktivität von **47-57** an Nur77. Die Aktivität von Fragment-Hit **41** ist zum Vergleich angegeben.

ID	R ¹	R ²	Aktivität an Nur77 bei 100 μ M
41	Acetyl	4-OH	54 \pm 3% (IC ₅₀ = 52 \pm 3 μ M)
47	Acetyl	4-OCH ₃	106 \pm 3%
48	Acetyl	4-NH ₂	107 \pm 8%
49	Acetyl	4-NO ₂	82 \pm 38%
50	Acetyl	4-Cl	86 \pm 11%
51	Acetyl	2-F	108 \pm 10%
52	-H	4-OH	84 \pm 4%
53	-H	4-OCH ₃	122 \pm 7%
54	-H	4-NH ₂	117 \pm 7%
55	-H	4-NO ₂	158 \pm 10%
56	-H	4-Cl	154 \pm 7%
57	-H	2-F	182 \pm 23% (EC ₅₀ = 70 \pm 38 μ M)

Im ersten Schritt wurden die Auswirkungen auf den Austausch der 4-OH-Gruppe untersucht. Der Austausch führte in allen Verbindungen mit Acetylgruppe (**47-51**) zum Verlust der Aktivität auf Nur77 bei einer Konzentration von 100 μ M. Die Entfernung der Acetyl-Gruppe bei gleichzeitiger Beibehaltung der 4-OH-Gruppe (**52**) verursachte ebenfalls einen Verlust der Nur77-Aktivität. Interessanterweise führte das Fehlen der Acetyl-Gruppe bei **53, 54, 55, 56** und **57** zu einer Aktivierung von Nur77 bei 100 μ M. Abgesehen von **57** war die Aktivierung jedoch zu schwach, um EC₅₀-Werte für diese Verbindungen zu ermitteln. **57** wies durch die Einführung der Fluor-Gruppe an Position 2 eine verstärkten Nur77 Agonismus (EC₅₀ = 70 μ M) mit einer höheren Aktivierungseffizienz (182% maximale Aktivierung bei 100 μ M) im Vergleich zu den anderen Verbindungen auf. Bei genauerer Betrachtung ließ sich außerdem erkennen, dass die Einführung einer elektronenziehenden Gruppe die Aktivität am Rezeptor erhöhte (**55, 56, 57**). Die beiden aktivsten Verbindungen **41** und **57** wurden hinsichtlich ihrer Ligandeneffizienz (LE) und lipophile Ligandeneffizienz (LLE) mit Csn-B (**3**) verglichen (Tabelle 6). LE gibt die Bindungsenergie pro Atom zu seinem Bindungspartner (z.B. Rezeptor) an, während die LLE eine Verbin-

3. Ergebnisse und Diskussion

derung zwischen Potenz und Lipophilie herstellt. Beide Parameter werden verwendet um die Eignung von Verbindungen als Wirkstoffe abzuschätzen²⁰⁰. LE und LLE zeigten für **41** und **57** günstige Ergebnisse und entsprachen oder übertrafen den stärkeren Agonisten Csn-B (**3**). Zudem wiesen diese beiden Verbindungen im Vergleich zu bekannten Nur77-Modulatoren eine deutlich reduzierte Lipophilie auf (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ligandeneffizienz (LE) und lipophile Ligandeneffizienz (LLE) für **41** und **57** im Vergleich zu Cytosporon B (**3**)¹¹⁷.

ID	Potenz an Nur77	XlogP	Anzahl schwerer Atome	LE	LLE
3	pEC ₅₀ 6,9	4,79	23	0,41	2,1
41	pIC ₅₀ 4,3	1,38	16	0,37	2,9
57	pEC ₅₀ 4,2	1,92	13	0,44	2,2

Bei dieser ersten Untersuchung der SAR wurde festgestellt, dass der im Fragment-Screening identifizierte Chemotyp von **41** zu agonistischen und invers agonistischen Liganden für Nur77 entwickelt werden konnte. Dabei erschien die Acetyl- und die OH-Gruppe entscheidend für einen inversen Agonismus, während ein Agonismus durch das Fehlen der Acetyl-Gruppe und Einführung elektronenziehender Gruppen erreicht wurde. Diese vielversprechenden Ergebnisse bewogen dazu, das Potenzial des Chemotyps weiter zu studieren und dabei auf Computergestützte Verfahren zurückzugreifen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1.4 Docking-getriebene Fragmenterweiterung

Um das Potenzial der Erkenntnisse von **41** und **57** weiter auszuschöpfen, wurde mithilfe des molekularen Dockings die Interaktion von **41** mit der Nur77-LBD vorhergesagt. Bei diesem Experiment erfolgte die Untersuchung der potenziellen Bindung von **41** in allen vier bekannten Bindungstaschen der Nur77-LBD, wobei sich der höchste Docking-score für die Bindungsstelle von THPN (**16**, PDB: 4JGV¹²⁰) ergab (Abbildung 9). In der Literatur wurde **16** als neutraler Antagonist beschrieben^{120,130,201}. In dem für die hier erwähnte Studie verwendeten Gal4-

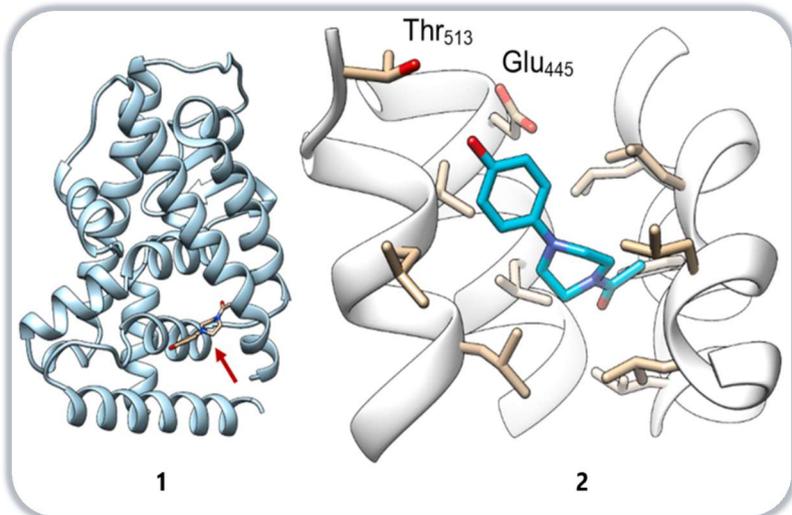


Abbildung 9: 1) Der wahrscheinlichste Bindungsmodus von **41** in der THPN-Bindungstasche. 2) Für **41** wurde vorhergesagt, dass es in einem stark hydrophoben Hohlraum zwischen H9 und H11 bindet, der einen Raum für die Erweiterung des Acetylsubstituenten bietet. Die Hydroxylgruppe war Lösungsmittel exponiert und zeigte eine schwache Interaktion mit Thr513¹⁹².

Reportergenassay war jedoch, eine schwache Aktivierung von Nur77 durch **16** zu beobachten,

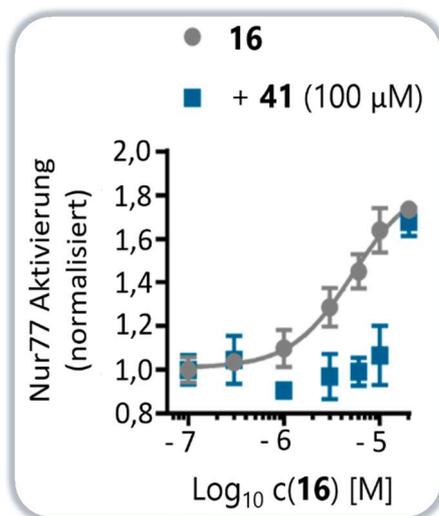


Abbildung 10: **41** (100 µM) wirkte der schwachen Nur77 Aktivierung durch **16** entgegen, was auf ein kompetitives Verhalten hindeutet¹⁹².

wodurch sich die Möglichkeit eines Konkurrenzexperiments mit **41** bot. Dieses Experiment demonstrierte, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit **41** (100 µM) und **16** der Gal4-Nur77-Aktivierung von **16** entgegenwirkte (Abbildung 10), was eine Konkurrenz zwischen **16** und **41** um die gleiche Bindungsstelle und damit die vorhergesagte Bindungsstelle von **41** bestätigte. Die Docking-Untersuchungen deuteten außerdem an, dass im Bereich des N-Acetyl-Substituenten noch Platz für eine Verlängerung von **41** gegeben sein könnte. Mit diesen Erkenntnissen wurde eine virtuelle Bibliothek von 25.021 kommerziell verfügbaren N2-substituierten N1-Phenyl-

piperazinen mittels Docking (durch Dr. Thomas Wein) an die vorhergesagte Bindungsstelle von **41** gescreent und die Verbindungen nach ihrem Docking-Score sortiert. 3.410 Verbindungen erreichten einen höheren Docking-Score als **41** (-7,68)¹⁹². Die 100 besten Verbindungen, mit

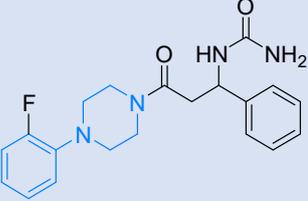
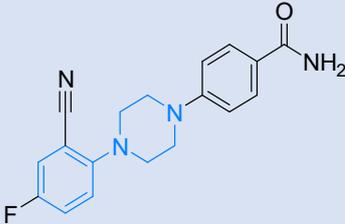
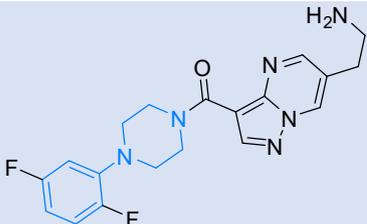
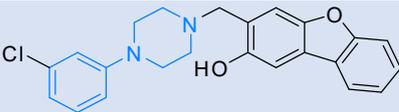
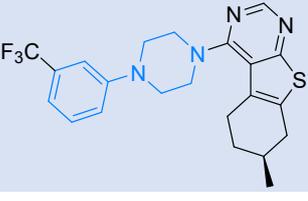
3. Ergebnisse und Diskussion

Docking-Scores von -9,88 bis -8,78, wurden nochmals aufgrund ihres Molekulargewichts (≤ 500 g/mol) und Entfernung von gleichen Strukturmotiven selektiert. Danach verblieben 17 chemisch diverse von **41** abgeleitete Verbindungen, die *in vitro* auf ihre Fähigkeit Nur77 zu modulieren getestet wurden (**58-74**, Tabelle 7).

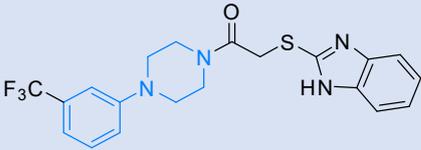
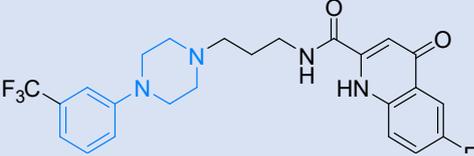
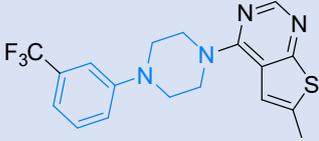
Tabelle 7: 17 chemische diverse Verbindungen, abgeleitet von **41**, mit Strukturformel geordnet nach ihrem Docking-Score und mit biologischer Charakterisierung. In blau ist das gemeinsame Strukturmotiv aller Verbindungen hervorgehoben.

ID	Reihenfolge (Score)	Aktivität an Gal4-Nur77	Aktivität an NBRE	K _d [μM]	XlogP
58	2 (-9,61)	inaktiv (100 μM)	n.b.	n.b.	3,19
59	3 (-9,56)	inaktiv (100 μM)	n.b.	n.b.	3,66
60	5 (-9,49)	EC ₅₀ = 17 ± 6 μM (131 ± 4% max. Akt.)	146 ± 20% (100 μM)	4,1	6,15
61	6 (-9,42)	130 ± 8% (30 μM) toxisch > 30 μM	n.b.	0,91	4,14
62	7 (-9,40)	126 ± 6% (100 μM)	n.b.	3,7	2,00
63	8 (-9,37)	toxisch (30 μM)	n.b.	3,7	4,41

3. Ergebnisse und Diskussion

64					
	10 (-9,35)	$IC_{50} = 81 \pm 13 \mu M$ (26 \pm 14% verb. Akt.)	$81 \pm 13\%$ (100 μM)	8,3	2,21
65					
	13 (-9,32)	inaktiv (100 μM)	n.b.	n.b.	3,05
66					
	15 (-9,27)	inaktiv (100 μM)	n.b.	n.b.	5,15
67					
	18 (-9,21)	$136 \pm 6\%$ (100 μM)	n.b.	12	1,54
68					
	19 (-9,20)	$EC_{50} = 23 \pm 2 \mu M$ (249 \pm 10% max. Akt.)	$EC_{50} = 2 \pm 1 \mu M$ (169 \pm 18% max. Akt.)	2,1	5,32
69					
	21 (-9,18)	$121 \pm 5\%$ (30 μM) toxisch > 30 μM	n.b.	6,6	1,52
70					
	28 (-9,12)	toxisch (30 μM)	n.b.	keine Bindung	5,62

3. Ergebnisse und Diskussion

71		32 (-9,09)	toxisch (30 µM)	n.b.	keine Bindung	3,92
72		43 (-9,05)	inaktiv (30 µM) toxisch (100 µM)	n.b.	n.b.	5,45
73		92 (-8,79)	toxisch (30 µM)	n.b.	1,6	6,07
74		96 (-8,78)	EC ₅₀ = 60 ± 8 µM (269 ± 27% max. Akt.)	163 ± 14% (100 µM)	un. ITC	5,23

n.b. = nicht bestimmt, max. Akt. = maximale Aktivität, verb. Akt. = verbleibende Aktivität, un = uneindeutiges

3.1.5 Charakterisierung der Docking-Hits

Bei der initialen Testung dieser 17 Verbindungen bei einer Konzentration von 30 und 100 µM, zeigten acht (**60**, **61**, **62**, **64**, **67**, **68**, **69**, **74**) eine Modulation von Nur77 im Gal4-Reportergen-Assay, fünf Verbindungen (**58**, **59**, **65**, **66**, **72**) wiesen keine Aktivität auf und vier Verbindungen (**63**, **70**, **71**, **73**) wurden aufgrund von toxischen Effekten ausgeschlossen (Tabelle 7). Durch die Auswertung von Dosis-Wirkungs-Kurven war es möglich **60**, **68** und **74** als neue Agonisten und **64** als neuer inverser Agonist für Nur77 mit mikromolarer Potenz zu identifizieren. Für **61**, **62**, **67** und **69** konnten keine EC₅₀-Werte aufgrund zu schwacher Aktivierung oder toxischen Effekten bestimmt werden. Die aktiven Verbindungen (**60**, **64**, **68**, **74**) wurden zusätzlich auf ihre Modulation des monomeren humanen Vollängen Nur77 am NBRE untersucht. Für diese Untersuchung diente ein Reporter, der eine einzelne NBRE-Kopie enthielt, um die Firefly-Luciferase zu kontrollieren¹²⁶. Auch im Vollängen-Assay waren **60** (146% Nur77 Aktivität bei 100 µM) und **74** (163% Nur77 Akt. bei 100 µM) imstande eine Aktivierung auszulösen. **64** (81%

3. Ergebnisse und Diskussion

verbleibende Aktivität bei 100 μM) setzte auch hier die Nur77-Aktivität herab. **68** ($\text{EC}_{50} = 2 \pm 1 \mu\text{M}$, $169 \pm 18\%$ max. Aktivität) wies auch im Vollängen-Assay, wie zuvor schon im Gal4-Assay die höchste Nur77-Aktivierung auf. Für die weitere Validierung dieser vier Verbindungen und ihre Bindung an die LBD von Nur77, erfolgten weitere Testung mittels ITC. Außer für **74** bestätigte sich für alle anderen eine niedrige mikromolare Interaktion mit der Nur77-LBD (Tabelle 7). Zusätzlich erfolgten auch ITC-Experimente von den Verbindungen (**63**, **70**, **71**, **73**), die im Zell-Assay aufgrund von toxischen Effekten ausgeschlossen wurden. Hierbei konnte bei zwei Verbindungen (**63**, **73**) eine Bindung identifiziert werden, während die anderen beiden Verbindungen (**70**, **71**) keine Bindung zeigten.

Bei der Betrachtung der strukturellen Merkmale ließ sich erkennen, dass durch die agonistische Aktivität von **60**, **68**, **74** und die Bindung von **73**, starre und planare Struktur motive favorisierte Substituenten für *N*-Phenylpiperazin-basierte Nur77-Agonisten darstellten. Die fehlende Aktivität von **65**, **66** und die fehlende Bindung von **71** könnte auf einen Einfluss der Ligandengeometrie hindeuten, mit einer Präferenz von gewinkelten gegenüber linearen Gerüsten. In Hinblick auf die Entwicklung von Agonisten, welche arzneimittelähnlichen Eigenschaften haben,

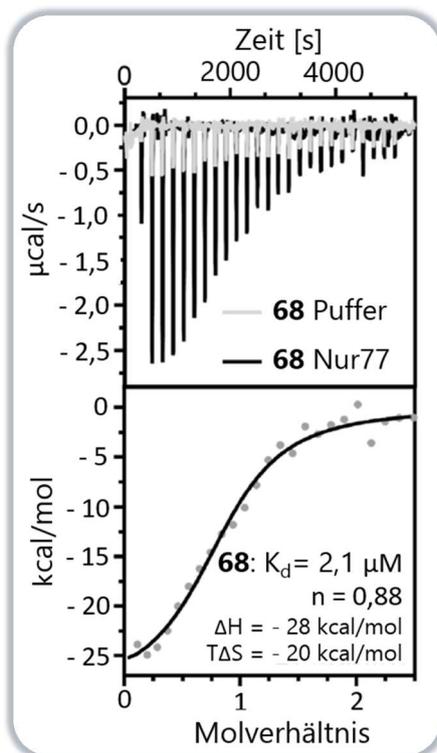


Abbildung 11: ITC-Ergebnisse bestätigten die Bindung von **68** an die rekombinante Nur77-LBD¹⁹².

könnten die deutlich hydrophileren Verbindungen **62**, **67**, **69** einen interessanten Ansatzpunkt liefern – insbesondere die Verbindungen **67** und **69** durch ihre polaren Substituenten. Unter den 17 getesteten Verbindungen stellten **68** und **74** die Verbindungen dar, die zur höchsten Nur77-Aktivierung führten. Im Gal4-Assay zeigten beide eine hohe maximale Aktivierung um die 250% und bieten eine vielversprechende Ansatzmöglichkeit für die Entwicklung von weiteren Liganden. Insbesondere mit der Entdeckung der Verbindung **68** konnte ein Agonist gefunden werden, der eine potente Aktivierung an Gal4-Nur77 und Vollängen-Nur77 bewirkte und eine Bindungsaffinität im unteren mikromolaren Bereich aufwies (Abbildung 11). Bei der Untersuchung der Selektivität von **68** gegenüber anderen NRs war lediglich eine leichte a-

gonistische Aktivität an Rezeptoren aus der gleichen NR4A-Familie (Nurr1, NOR-1) zu beobachten. Dies lässt sich durch die strukturelle Übereinstimmung dieser Rezeptoren erklären,

3. Ergebnisse und Diskussion

jedoch fiel die Aktivierung im Vergleich zur Aktivierung auf Nur77 gering aus, wodurch eine gewisse Präferenz von **68** für Nur77 besteht (Abbildung 12). Zudem demonstrierte ein Kompetitionsexperiment, dass THPN (**16**) die Bindung von **68** an Nur77 blockierte, wodurch die Bindung von **68** in die THPN-Bindungstasche, die auch vom molekularen Docking vorhergesagt wurde, bestätigt werden konnte (Abbildung 12). Darüber hinaus zeigte sich, dass **68** die mRNA-Expression des durch Nur77 regulierten Transkriptionsfaktor GATA-Bindungsfaktor 2 (GATA2) in HeLa-Zellen erhöhte, die auch bei Nur77-Überexpression induziert wurde. Im Vergleich dazu sorgte THPN (**16**) für einen gegenteiligen Effekt (Abbildung 12). Diese Ergebnisse bestätigten zusätzlich die Aktivierung von Nur77 durch **68** in nativen Zellen.

Zusammenfassend ergaben sich aus dem Fragment-Screening für Nur77 zwei Verbindungen (**40**, **41**) die sich von dem klassischen Gerüst der von lipophilen Naturstoffen abgeleiteten

Nur77-Liganden deutlich unterschieden. Insbesondere **41** zeigte eine geringere Lipophilie im Vergleich zu bekannten Nur77-Liganden. Durch die weitere Charakterisierung von **41** konnten unter anderem die schwach agonistischen Nur77-

Liganden **62**, **67** und **69** identifiziert werden, die durch ihre Hydrophilie einen interessanten Ansatz für arzneimittelähnliche Zielstrukturen liefern könnten. Schlussendlich wurde durch die Identifizierung des *N*-Phenylpiperazin-Derivats **68** eine Verbindung entdeckt, die eine hohe Potenz aufweist, zu einer beachtlichen Aktivierung von Nur77 führt sowie eine Präferenz für Nur77 gegenüber den anderen Rezeptoren der NR4A-Familie (Nurr1, NOR-1) zeigt und somit eine interessante Leitstruktur für die weitere Optimierung von noch potenteren Nur77-Liganden darstellt.

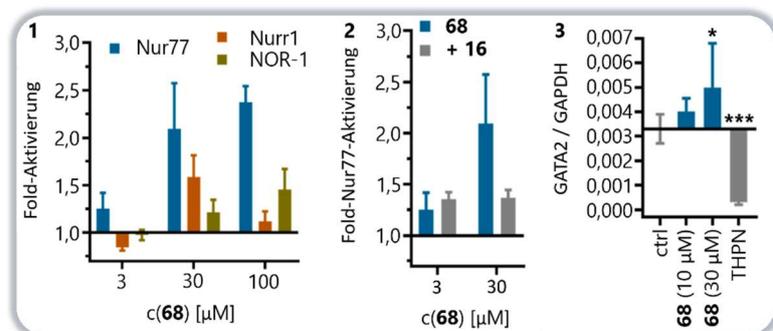


Abbildung 12: 1) **68** zeigt innerhalb der NR4A-Familie eine Präferenz für Nur77. 2) THPN (5 µM, **16**) wirkt der Bindung von **68** entgegen. 3) Effekte von **68** (10 µM, 30 µM) und **16** (20 µM) an der mRNA-Expression von GATA2 in HeLa-Zellen¹⁹².

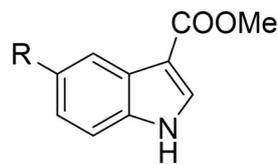
3.1.6 Charakterisierung neuer NOR-1 Modulatoren

Die für NOR-1 identifizierten Screening-Hits **41** und **43** (Tabelle 4) wurden ebenfalls (durch Daniel Zaienne) weiter charakterisiert. Bei der Untersuchung der SAR von **41** konnte festgestellt werden, dass das Fehlen der Acetyl- oder phenolischen Hydroxy-Gruppe, wie bei Nur77, zum Verlust des inversen Agonismus an NOR-1 führte. Zudem bewirkte das Fehlen der Acetyl-

3. Ergebnisse und Diskussion

Gruppe und die Variation der 4-Position (-NH₂, -NO₂, -Cl), dass sich bei diesen Verbindungen die inverse Aktivität in eine leicht agonistische umwandelte, wodurch sich die Möglichkeit für die Entwicklung von Agonisten für NOR-1 bietet. Bei der Untersuchung von **43** lieferte die strukturelle Erweiterung durch ein Chlor-Atom jeweils an den Positionen 2, 4, 5, 6 und 7 die Entdeckung einer Verbindung, die eine 3,5-fache Steigerung (**75**, IC₅₀ = 14 ± 2 μM) des inversen NOR-1 Agonismus ergab (Tabelle 8). Die Einführung an den anderen Positionen (2, 4, 6, 7) verursachte eine Verringerung der Aktivität.

Tabelle 8: Aktivität von **43** und Derivaten (**75-77**) an NOR-1.



ID	R ¹	IC ₅₀ (verb. Aktivität)
43	-H	47 ± 8 μM (47 ± 6%)
75	-Cl	14 ± 2 μM (12 ± 4%)
76	-Br	8 ± 1 μM (7 ± 3%)
77	-Phenyl	4 ± 2 μM (49 ± 5%)

verb. Akt. = verbleibende Aktivität

Bei der weiteren Optimierung durch voluminösere Reste zeigte sich, dass durch die Einführung eines Brom- (**76**, IC₅₀ = 8 ± 1 μM) oder Phenyl-Substituenten (**77**, IC₅₀ = 4 ± 2 μM) eine inverse agonistische Potenz im unteren mikromolaren Bereich erreicht werden konnte, wobei besonders das Bromderivat **76** aufgrund hoher invers agonistischer Effizienz (7% Restaktivität von NOR-1) überzeugte. Weitere Untersuchungen demonstrierten, dass **76** in der Lage war, die Interaktion von NOR-1 mit den Co-Regulatoren NCoR1 und SMRT mit vergleichbarer Potenz (NCoR1: IC₅₀ = 12 ± 3 μM, SMRT: IC₅₀ = 9 ± 2 μM) zu blockieren. Zudem wiesen **76** sowie **43** einen Einfluss auf die Genexpression von NOR-1 auf, indem sie als inverse NOR-1 Agonisten in der Lage waren, das c-MYC-Protoonkogen (MYC) in HeLa-Zellen zu induzieren, wobei **76** eine stärkere Induktion als **43** verursachte - bei geringeren Konzentrationen (Abbildung

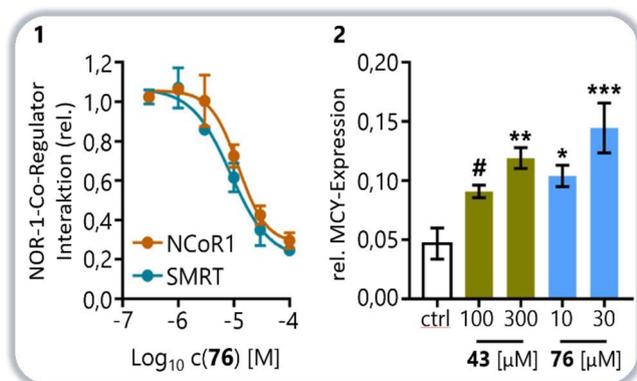


Abbildung 13: 1) **76** verhinderte die Interaktion von NOR-1 mit NCoR1 und SMRT. 2) **43** und **76** induzieren die Expression von MYC in HeLa Zellen¹⁹³.

3. Ergebnisse und Diskussion

13). In vorhergehenden Studien zeigte sich, dass die konstitutive NOR-1 Aktivität die Expression von MYC direkt unterdrückte^{202,203,204}.

Zusammenfassend ergaben sich aus dem Fragment-Screening für NOR-1 zwei vielversprechende Hits (**41**, **43**), die als Ausgangsverbindungen für die Entwicklung von neuen NOR-1-Liganden dienen können. Zudem hat die weitere Charakterisierung von **43** den inversen Agonisten **76** hervorgebracht, der ein frühes chemisches Tool zur Untersuchung der Effekte von NOR-1 darstellt.

3.2 Entwicklung und Charakterisierung eines selektiv allosterischen PPAR γ -Liganden

Die Forschung an PPAR γ -Liganden beschränkt sich seit vielen Jahren auf das Adressieren der orthosterischen Bindungstasche und die dadurch vermittelte Auslösung der klassischen PPAR-regulierten Gentranskription, die bereits sehr gut untersucht ist (siehe Kapitel 2). Trotz des Wissens, dass eine allosterische Bindungstasche existiert, sind im Vergleich dazu die Mechanismen und Effekte der selektiven allosterischen Modulation noch nahezu unbekannt. Dies ist zum Teil durch die schwierige Entdeckung von allosterischen Liganden zu begründen, da hier nicht auf die klassischen Methoden, wie das Hochdurchsatz-Screening, zur Entdeckung von allosterischen Liganden zurückgegriffen werden kann. Ungeachtet dieses Umstands finden sich Publikationen, in denen eine allosterische Bindung für einige Liganden beschrieben wurde. Diese Liganden weisen jedoch eine doppelte Bindung an die ortho- und allosterische Bindungstasche von PPAR γ auf oder sind in der Lage beide Taschen auszufüllen^{9,186,205,206}. Das steigende Interesse an der allosterischen Modulation begründet sich unter anderem in der höheren Selektivität und der feineren Kontrolle über die Aktivität von Proteinen in dieser Klasse, wodurch ein besseres Verständnis von Nebenwirkungsprofilen gewonnen werden könnte und die allosterische Modulation möglicherweise einen Weg eröffnet, um neuartige therapeutische Möglichkeiten zu erschließen²⁰⁷.

Schon die Entdeckung und Erforschung des Vitamin E Mimetikum GA (**37**) zeigte, dass sich durch die Adressierung der ortho- und allosterischen Bindungstasche die PPAR γ Modulation von den Effekten klassischer Agonisten, wie Pioglitazon (**33**) unterscheidet. **37** war nicht nur allein in der Lage PPAR γ zu aktivieren, sondern konnte durch die gemeinsame Bindung mit **33** zu einer synergistischen Aktivierung des Rezeptors führen. Darüber hinaus gab es deutlich unterschiedliche Effekte von **37** bei der Co-Regulator-Rekrutierung und der Genexpression im

3. Ergebnisse und Diskussion

Vergleich zu **33**, die nahelegen, dass diese Unterschiede durch die zusätzliche allosterische Bindung zustande kommen (siehe Kapitel 1.2.2.2 [Liganden des PPAR \$\gamma\$ -Rezeptors](#)). Diese Ergebnisse lieferten erste interessante Einblicke in das Potenzial der PPAR γ -Modulation durch eine allosterische Bindung. Allerdings benötigt es für die genaue Erforschung der allosterischen Effekte und Mechanismen, einen selektiven allosterischen Liganden. **37** eignete sich durch seine komplexen biologischen Effekte, die geringe synthetische Zugänglichkeit und den Umstand, dass die ortho- und allosterische Bindungstasche gleichzeitig adressiert werden, nicht als Ausgangspunkt für dieses Vorhaben. So musste dafür eine synthetische Verbindung gefunden werden, die die Bindung von **37** imitiert und zusätzlich verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu **37** aufweist.

3.2.1 Identifikation eines allosterischen Liganden

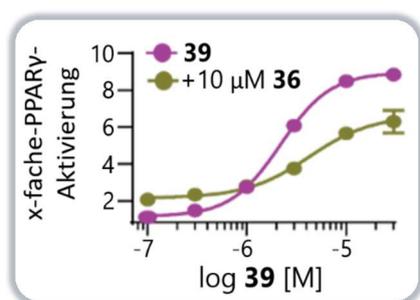


Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Kurve von **39** im Gal4-PPAR γ -Reporterassay in An- und Abwesenheit vom irreversiblen orthosterischen Antagonist GW9662 (**36**)¹⁹¹.

Die Identifikation allosterischer Liganden kann, wie bereits erwähnt durch *in vitro* Assays mittels Blockade der orthosterischen Bindungsstelle mit einem Antagonisten erfolgen. Für diesen Zweck wurde der irreversible Antagonist GW9662 (**36**) verwendet, der in der Lage ist, die orthosterische Bindungsstelle dauerhaft durch die kovalente Bindung zu Cys285 zu blockieren¹⁷⁴. Dadurch ist es möglich Verbindungen zu identifizieren, die über andere Bindungsstellen wirken. Auf der Suche nach einem allosterischen Liganden wurde eine hausinterne Sammlung von synthetischen PPAR γ -Modulatoren in einem Gal4-Hybrid-Reporterassay gegen ligandenfreies und an GW9662 (**36**) gebundenes PPAR γ getestet. Dieses Screening führte zur Identifizierung von Verbindung **39**, die in der Lage ist PPAR γ allein ($EC_{50} = 2,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$) und in Gegenwart von **36** ($EC_{50} = 4 \pm 1 \mu\text{M}$) zu aktivieren (Abbildung 14). Darüber hinaus wies **39** günstigere Eigenschaften und eine bessere synthetische Zugänglichkeit als **37** auf und erschien als vielversprechender Leitstrukturkandidat zur Entwicklung allosterischer PPAR γ -Modulatoren. Diese Ergebnisse verdeutlichten außerdem, dass PPAR γ trotz der antagonistischen Bindung von **36** durch die orthosterische Bindungsstelle aktiviert werden kann (siehe Kapitel 1.2.2.2, Abbildung 7). Da **39** imstande war PPAR γ in der

3. Ergebnisse und Diskussion

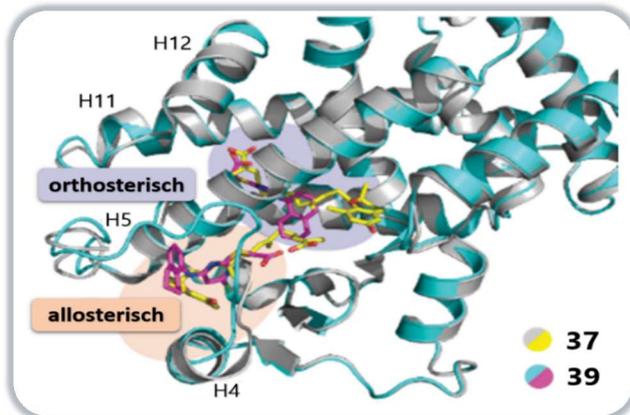


Abbildung 15: Die Kristallstruktur der PPAR γ -LBD im Komplex mit **39** (PDB: 8ATY)¹⁹¹ zeigte, dass zwei Moleküle von **39** an die LBD binden können und wies eine hohe Übereinstimmung mit dem PPAR γ -GA(**37**)-Komplex auf¹⁸⁴.

sche Bindungstasche, wie es ebenfalls für **37** zu beobachten war (Abbildung 15)¹⁸⁴. Die PPAR γ -LBD Strukturen im Komplex mit **37** und **39** wiesen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Konformation auf. In der orthosterischen Bindungstasche formte **39** Bindungen mit Ser289, His449 und Tyr473, die die den Bindungen der klassischen TZD und **37** entsprechen²⁰⁸. In der allosterischen Bindungstasche befand sich **39** in dem Hohlraum zwischen H4 und H5 und ging ionische Wechselwirkungen durch die Carboxylat-Gruppe mit Arg288 ein, die ebenfalls bei der Bindung von **37** beobachtet werden konnten (Abbildung 16). Zusätzliche Kontakte wie Wasserstoffbrücken zwischen dem Carboxylat von **39** und dem Rückgrat von Ser342 sowie zwischen dem sekundären Amin und der Seitenkette von Glu259 wurden ebenfalls ausgebildet. Die Analyse der PPAR γ -**39**-Kristallstruktur zeigte, dass die orthosterische Bindungstasche nur einen begrenzten Platz für eine räumliche Erweiterung des Moleküls bot (Abbildung 16, Abbildung 17), während die allosterische Bindungstasche nach der Bindung von **39**, im Bereich der 5- und 6-Position des Tetrahydronaphthalin, zum Lösungsmittel offen war. Dieser Bereich ließ somit Raum für eine Verlängerung des Moleküls

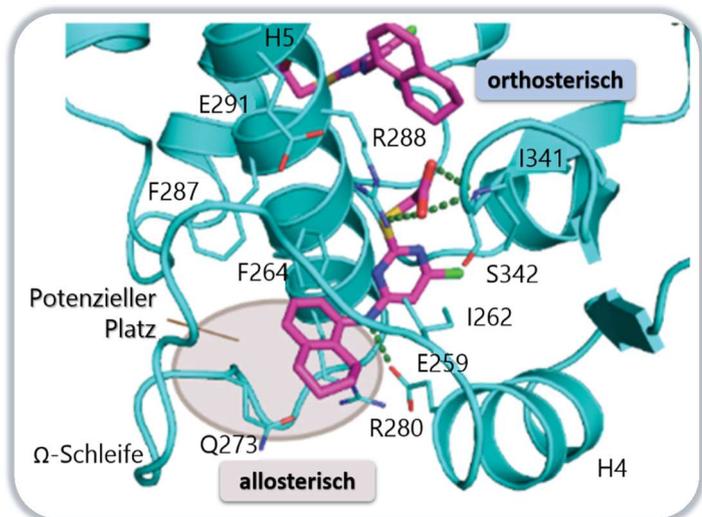


Abbildung 16: Allosterische Bindung von GA (**37**, PDB: 7AWD)¹⁸³ und **39** (PDB: 8ATY)¹⁹¹ an die PPAR γ -LBD zeigten eine Interaktion mit der Seitenkette von Arg288 und potenziellen Freiraum für eine Erweiterung von **39**¹⁹¹.

dem Rückgrat von Ser342 sowie zwischen dem sekundären Amin und der Seitenkette von Glu259 wurden ebenfalls ausgebildet. Die Analyse der PPAR γ -**39**-Kristallstruktur zeigte, dass die orthosterische Bindungstasche nur einen begrenzten Platz für eine räumliche Erweiterung des Moleküls bot (Abbildung 16, Abbildung 17), während die allosterische Bindungstasche nach der Bindung von **39**, im Bereich der 5- und 6-Position des Tetrahydronaphthalin, zum Lösungsmittel offen war. Dieser Bereich ließ somit Raum für eine Verlängerung des Moleküls

3. Ergebnisse und Diskussion

in diese Richtung, wodurch ein Teil des Moleküls aus der Tasche ragt (Abbildung 17). Die Annahme war daher, dass eine strukturelle Erweiterung in dieser Region die Bindung in die orthosterische Tasche verhindern würde, sodass nur noch eine Bindung in die allosterische Bindungstasche möglich ist.

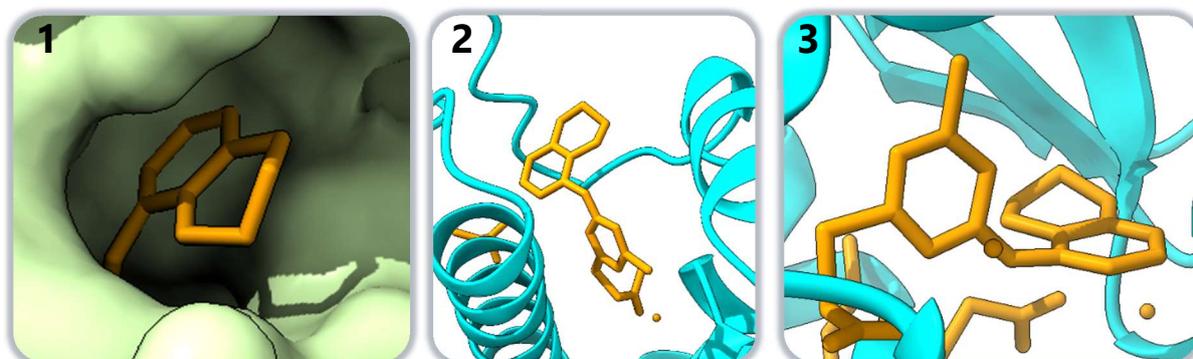
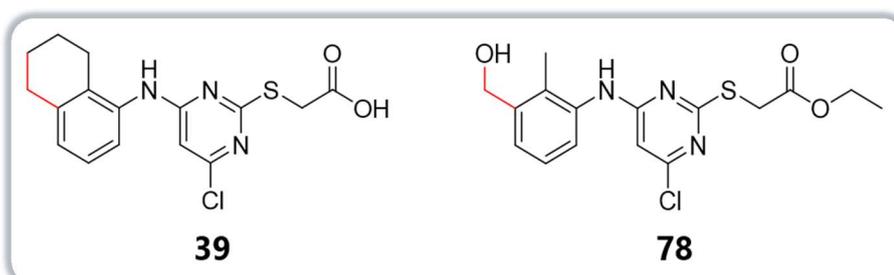


Abbildung 17: Allosterische und orthosterische Bindung von **39** mit der PPAR γ -LBD (PDB: 8ATY¹⁹¹). 1) Allosterische Bindung von **39**, Außenansicht auf die Tasche. 2) Allosterische Bindung von **39** zeigte potenziellen Platz für eine Erweiterung. 3) Orthosterische Bindung von **39**, zeigte keinen Platz für eine Erweiterung an 5- und 6-Position des Tetrahydronaphthalin¹⁹¹.

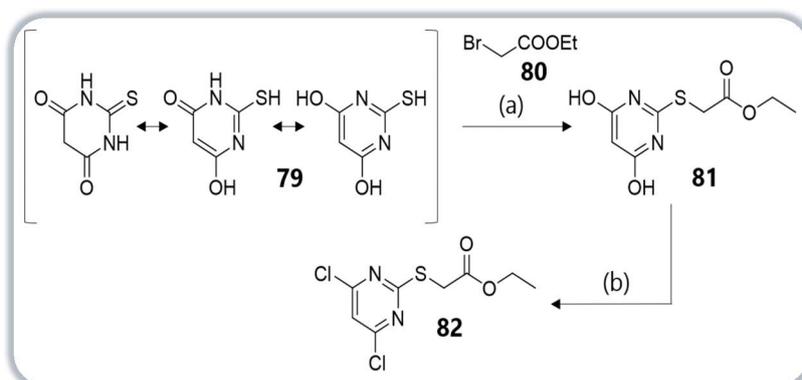
3.2.2 Struktur basiertes Design und Synthese

Da die Struktur von **39** keine einfache synthetische Zugänglichkeit für eine Erweiterung des Moleküls lieferte, wurde mit **39** als Vorlage eine neue



Schema 12: Vergleich der Struktur von Verbindung **39** und die Struktur der neu zu synthetisierende Verbindung **78**. In Rot wurden die gleichen Kohlenstoffatome im Bereich der strukturellen Erweiterung von beiden Verbindungen hervorgehoben.

Verbindung designt. Als Ausgangspunkt hierfür diente Verbindung **78** (Schema 12). Im Gegen-



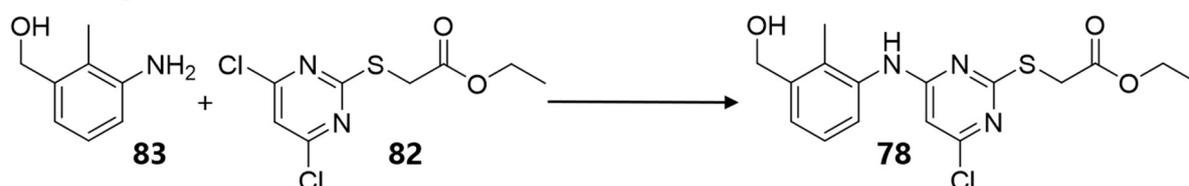
Schema 13: Synthese von Verbindung **82**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaOH, H₂O/Ethanol, 60 °C, 4,5 Std., 65%; (b) POCl₃, Diethylanilin, 90 °C, 5 Std., 75%.

satz zu **39** ist eine Verlängerung von **78** im Bereich des Benzylalkohols in Form eines Linkers möglich. Für die Synthese potenzieller allosterischer PPAR γ -Modulatoren wurde zunächst als Vorstufe das Chlorpyrimidin

3. Ergebnisse und Diskussion

82 durch nukleophile aromatische Substitution (S_NAr) und Chlorierung hergestellt. Hierfür dienten Synthesevorschriften, die Dr. Julius Pollinger in seiner Forschungsarbeit etablierte^{171,209} (Schema 13; Tabelle 9, Reaktions-Nr. 1). Für die S_NAr wurden beide Edukte (**82**, **83**) in Ethanol gelöst, Triethylamin (TEA) hinzugefügt und bei 120 °C vier Stunden gerührt (Tabelle 10). Bei der massenspektrometrischen Untersuchung anhand einer Dünnschichtchromatographie (DC) war festzustellen, dass das angestrebte Produkt sich nicht bildete. Darüber hinaus zeigte die gefundene Masse, dass anstelle einer Substitution von **83** an **82** eine Substitution von TEA erfolgte. Infolgedessen erfolgte der Ersatz von TEA durch Natriumcarbonat und die Reaktion wurde unter ansonsten identischen Bedingungen erneut durchgeführt (Tabelle 9, Reaktions-Nr. 2). Hier kam es hauptsächlich zu einer Substitution von Ethanol (EtOH) an **82** – das gewünschte Produkt bildete sich nicht. Daher wurde in der nächsten Synthese EtOH gegen Dimethylformamid (DMF) ausgetauscht und die Reaktion unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Diesmal mit dem Ergebnis, dass das gewünschte Produkt (**78**) mit einer Ausbeute (20%) entstand (Tabelle 9, Reaktions-Nr. 3).

Tabelle 9: Reagenzien und Bedingungen der nukleophilen Substitution von Verbindung **82** und **83** zu Verbindung **78**.



Reaktions-Nr.	Edukte	Reagenzien	Bedingungen	Produkt
1		TEA, EtOH		
2	82 83	Na ₂ CO ₃ , EtOH	120 °C 4 Stunden	
3		Na ₂ CO ₃ , DMF		

Wie in Kapitel 3.2.1 erwähnt, sollte durch eine strukturelle Erweiterung von Verbindung **39**, eine Bindung in die orthosterische Tasche verhindert und dadurch eine selektive allosterische Bin-

3. Ergebnisse und Diskussion

ung erreicht werden. Als Ausgangspunkt diente dafür **78**, aufgrund der besseren synthetischen Zugänglichkeit. Für diesen Zweck wurde als strukturelle Erweiterung ein 4-(2-Chloroethyl)morpholin-Linker (**84**) ausgewählt, der mittels einer Williamson-Ether-Synthese mit **78** verknüpft werden sollte (Tabelle 10). Die Williamson-Ether-Synthese stellt seit über 150 Jahren eine der Hauptmethoden zur Herstellung von Ethern dar²¹⁰. Es handelt sich bei dieser Reaktion, um eine typische S_N2-Reaktion. Aus diesem Grund ist sie empfindlich gegenüber einer Vielzahl von Parametern wie Lösungsmittel, Temperatur, Art der Abgangsgruppe, Nukleophil und Gegenkation²¹¹. Um die Reaktion zu fördern können Zusätze (z.B. Iodidsalze) zur Reaktionsmischung hinzugegeben werden²¹². Die Reaktion stellte sich jedoch als komplex heraus, da es zu keiner Reaktion der beiden Edukte (**78**, **84**) kam (Tabelle 10, Reaktions-Nr. 4). Aus diesem Grund wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Jedoch führte der Austausch von Kaliumcarbonat gegen Kalium-*tert*-butanolat oder Natriumhydrid, ebenfalls zu keiner Reaktion (Tabelle 10, Reaktions-Nr. 5 & 6).

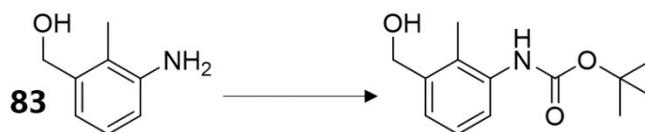
Tabelle 10: Reagenzien und Bedingung der Synthese von Verbindung **85** mittels Williamson-Ether-Synthese ausgehend von **78** mit 4-(2-Chloroethyl)morpholin (**84**) als Linker.

Reaktions-Nr.	Edukte	Reagenzien	Bedingungen	Produkt
4		K ₂ CO ₃ , DMF		
5	78	KO- <i>t</i> -butyl, DMF	80 °C	keine Reaktion
6	84	NaH, DMF	4-24 Stunden	

Daraufhin wurde die Syntheseabfolge geändert und angestrebt, die Williamson-Ether-Synthese vor der S_NAr durchzuführen. Für die Reaktion sollte zuerst das primäre Amin von **83** mithilfe einer *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-Schutzgruppe geschützt werden, um eine Reaktion von dieser auszuschließen (Tabelle 11).

3. Ergebnisse und Diskussion

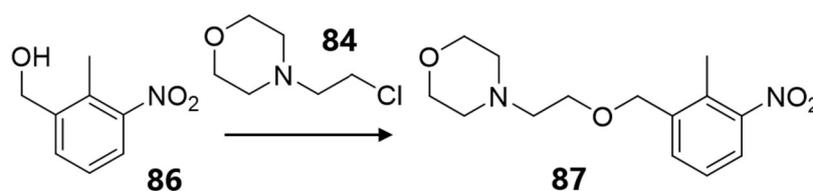
Tabelle 11: Reagenzien und Bedingungen für die Schützung von **83** mit einer *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe.



Reaktions-Nr.	Edukte	Reagenzien	Bedingungen	Produkt
7	83	Boc2O, NaHCO ₃ THF, MeOH	RT (24 Std.) – 50 °C (24 Std.)	keine Reaktion

Die sonst so einfach durchzuführende Boc-Schützung verlief jedoch ohne Erfolg, trotz Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur auf 50 °C und weiteren 24 Stunden Reaktionszeit, verblieb weiterhin nur **83** in der Reaktionsmischung (Tabelle 11). Aus diesem Grund wurde statt **83** 2-Methyl-3-nitrobenzylalkohol (**86**) verwendet, wodurch die Schützung des primären Amins nicht mehr nötig war. **86** sollte mit **84** mittels einer Williamson-Ether-Synthese nach Finkelstein verknüpft werden (Tabelle 12, Reaktions-Nr. 8). Diese Synthese funktionierte ebenfalls nicht, beide Edukte verblieben in der Reaktionsmischung, ohne miteinander zu reagieren, woraufhin weitere Reaktionsbedingungen, wie der Austausch der Base, Lösungsmittel, Reaktionsdauer und Temperatur variiert wurden, was jedoch auch nicht zum erwünschten Ergebnis führte (Tabelle 12, Reaktions-Nr. 9-13).

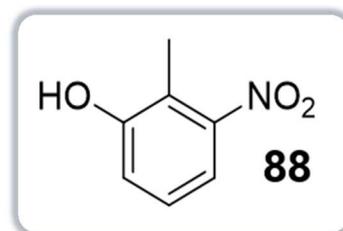
Tabelle 12: Reagenzien und Bedingungen der Williamson-Ether-Synthese von Verbindung **84** und **86** zu Verbindung **87**.



Reaktions-Nr.	Edukte	Reagenzien	Bedingungen	Produkt
8	84 86	K ₂ CO ₃ , Aceton, KI	80 °C, 24 Std.	keine Reaktion
9			100 °C, 24 Std.	
10		K ₂ CO ₃ , DMF	80 °C, 24 Std.	
11		KO- <i>t</i> -butyl, DMF	RT ⁹ , 24 Std.	
12		NaH, DMF	RT, 24 Std.	
13		NaH, THF	RT, 24 Std.	
13		K ₂ CO ₃ , DMF, KI	80 °C 24 Std. 100 °C 24 Std.	

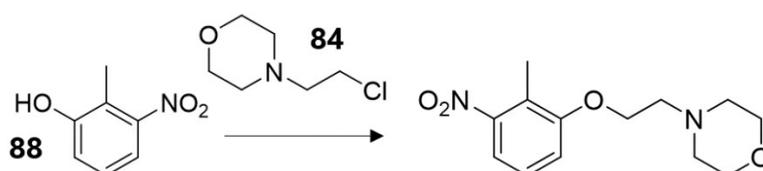
3. Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der Hypothese, dass die vorherigen Syntheseveruche aufgrund mangelnder Nukleophilie des Benzylalkohols gescheitert waren, wurde **86** gegen das Phenol **88** ausgetauscht, um die Reaktivität zu steigern und die erforderliche Deprotonierung zu vereinfachen (Schema 14). Jedoch zeigte sich auch hier, dass die verschiedensten Reaktionsbedingungen (Base, Lösungsmittel, Temperatur, Reaktionsdauer), zu keiner Reaktion der beiden Edukte (**84**, **88**) führte und diese in der Reaktionsmischung ohne Reaktion verblieben (Tabelle 13, Reaktions-Nr. 14-17).



Schema 14: Struktur von Verbindung **88**.

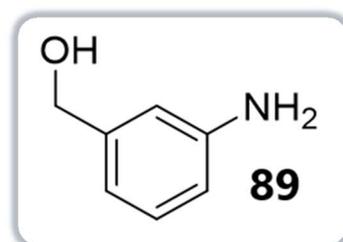
Tabelle 13: Reagenzien und Bedingungen der Williamson-Ether-Synthese von Verbindung **84** und **88**.



Reaktions-Nr.	Edukte	Reagenzien	Bedingungen	Produkt
14	84 88	K ₂ CO ₃ , DMF, KI	80 °C, 24 Std. 100 °C, 24 Std.	keine Reaktion
15		K ₂ CO ₃ , DMF	80 °C, 24 Std.	
16		KO-t-butyl, DMF	RT ⁹ , 24 Std.	
17		NaH, DMF	RT, 24 Std.	

Da die Steigerung der Reaktivität, Variation der Edukte und die Veränderung der Reaktionsbedingungen nicht zielführend waren, wurde die zusätzliche Hypothese aufgestellt, dass die Methyl-Gruppe in Position 2 durch sterische Hinderung das Einführen von voluminösen Edukten verhinderte. Dies würde die Substitution von kleinen Resten wie EtOH und TEA, die bei der S_NAr zuvor durch ESI-MS nachgewiesen werden konnten und die Verhinderung der Substitution der deutlich größeren Edukte (**83**, **86** & **88**) erklären.

Die genauere Betrachtung der Kristallstruktur von PPAR_γ im Komplex mit **39** deutete an, dass durch das Fehlen der Methyl-Gruppe im designten potenziellen allosterischen Liganden keine entscheidenden Interaktionen mit der Bindungstasche verloren gehen sollten. Aus diesem Grund wurde (3-Aminophenyl)methanol (**89**) als nächster Startpunkt gewählt, das keine Methyl-Gruppe in Position 2 enthielt (Schema 15). Hier galt es wieder das primäre Amin mithilfe von



Schema 15: Struktur von Verbindung **89**.

3. Ergebnisse und Diskussion

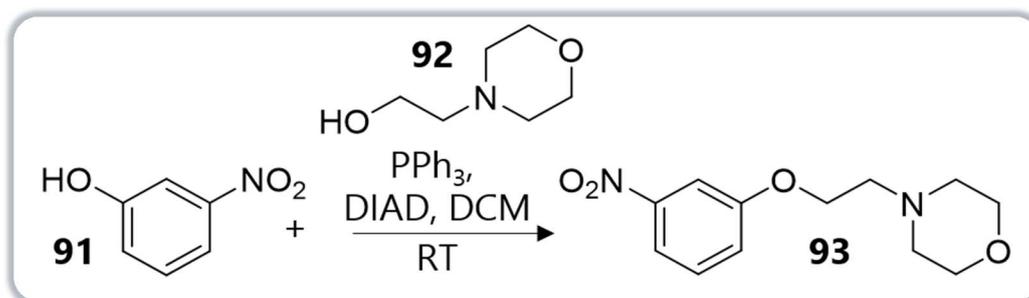
einer Boc-Schutzgruppe zu schützen, wobei dieses Mal die Reaktion gelang (**90**), was die Hypothese der sterischen Hinderung durch die Methyl-Gruppe ebenfalls bestätigte. Nach der Boc-Schätzung sollte wiederum eine Williamson-Ethersynthese durchgeführt werden, um **90** und den Morpholin-Linker (**84**) zu verknüpfen. Allerdings war es auch mit **90** und unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen nicht möglich die Reaktion in Gang zu bringen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Reagenzien und Bedingungen der Williamson-Ether-Synthese von Verbindung **84** und **90**.

Reaktions-Nr.	Edukte	Reagenzien	Bedingungen	Produkt
18	84 90	KO-t-butyl, DMF	rt	keine Reaktion
19		NaH, DMF	80 °C	
20		NaH, THF	80 °C	
21		NaH, DMF, KI	rt	
22		K ₂ CO ₃ , MeCN, KI	rt	

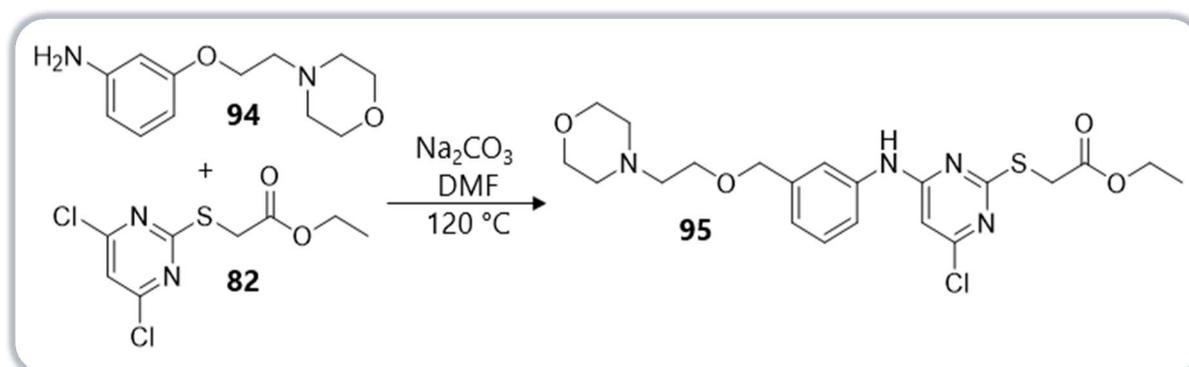
Daraufhin wurde als neues Edukt 3-Nitrophenol (**91**) ausgewählt, das statt eines Benzylalkohols das reaktivere Phenol und statt dem Amin eine Nitro-Gruppe enthielt (Schema 16). Auch beim 3-Nitrophenol (**91**) sollte zuerst der Linker eingeführt werden, diesmal mithilfe einer Mitsunobu-Reaktion (Schema 16). Die Mitsunobu-Reaktion ist eine Kondensationsreaktion bei der ein Hydroxy-beinhaltenendes-Substrat, oft ein primärer oder sekundärer Alkohol mit einem aciden pro-nukleophil substituiert wird. Sie wird durch ein Phosphin (z.B. Triphenylphosphin) und Azodicarboxylat (z.B. Diethylazodicarboxylat (DEAD), Diisopropylazodicarboxylat (DIAD)) vermittelt. Dabei erfolgt die Aktivierung des Alkohols über ein Betain-Intermediat, dass durch die *in situ* Reaktion des Phosphins und einem Azodicarboxylat-Reagenz geformt wird und ein Alkoxyphosphonium-Salz liefert. Dieses reagiert mit dem Sauerstoff des Alkohols, aktiviert diesen als Abgangsgruppe und ebnet so den Weg für die Substitution durch das Nukleophil²¹³. Für diese Reaktion musste der 4-(2-Chlorethyl)morpholin-Linker (**84**) gegen einen 4-(2-Hydroxy)morpholin-Linker (**92**) ausgetauscht werden, da für die Einführung des Ethers bei dieser Reaktion eine Hydroxy-Gruppe, statt des Chlors, benötigt wurde. Die Reaktion erfolgte mit guter Ausbeute (96%) und lieferte Verbindung **93** als Produkt (Schema 16).

3. Ergebnisse und Diskussion



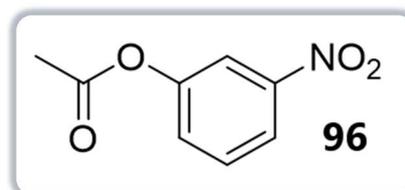
Schema 16: Mitsunobu-Reaktion von Verbindung **91** und **92** zu Verbindung **93**.

Nach anschließender Reduktion mit Wasserstoff und Palladium (10%) auf Aktivkohle wurde Verbindung **94** erhalten. Mit **82** und **94** erfolgte anschließend wieder die Durchführung der S_NAr, die **95** als Produkt lieferte (Schema 17). Als problematisch stellte sich die Aufreinigung



Schema 17: Nukleophile aromatische Substitution von Verbindung **82** und **94** zu Verbindung **95**.

des Produkts heraus, da kein sauberes Produkt erhalten werden konnte. Um die Optimierung der S_NAr zu vereinfachen und eine einfache Variation von verschiedenen Linkern zu ermöglichen wurde parallel zu dieser Reaktion versucht ein Edukt zu identifizieren, mit dem es möglich ist die S_NAr vor der Williamson-Ether-Synthese durchzuführen. Als Startpunkt dafür diene 3-Nitrophenol (**91**), wobei das Phenol durch die deutlich höhere Reaktivität gegenüber dem Benzylalkohol für die anschließende S_NAr geschützt werden musste, um eine selektive Reaktion nur am Amin zu gewährleisten. Für die Auswahl der Schutzgruppe musste berücksichtigt werden, dass diese eine Stabilität im basischen Bereich aufzeigen musste, um eine Spaltung bei den basischen Reaktionsbedingungen der S_NAr zu verhindern. Hierfür wurde eine Acetyl-Schutzgruppe gewählt, die eine ausreichende Stabilität im basischen Bereich zeigte. **91** wurde mit Natriumacetat in Essigsäureanhydrid acetyliert (**96**, Schema 18), die Nitro-Gruppe mit Wasserstoff und Palladium (10%) auf Aktivkohle reduziert (**97**) und anschließend als Edukt für die S_NAr

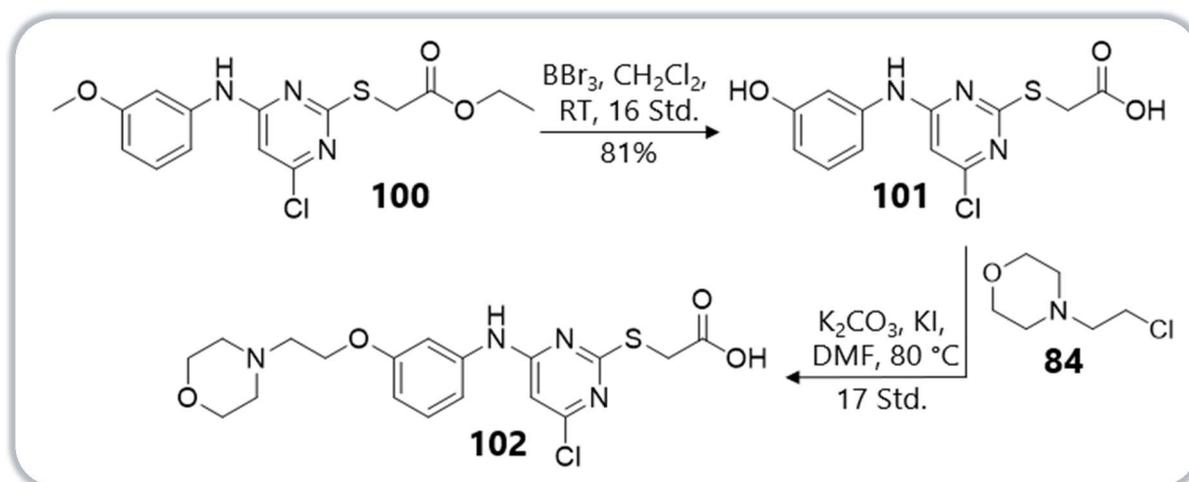


Schema 18: Struktur von Verbindung **96**.

verwendet. Während der Reaktion stellte sich heraus, dass die Schutzgruppe gespalten wurde

3. Ergebnisse und Diskussion

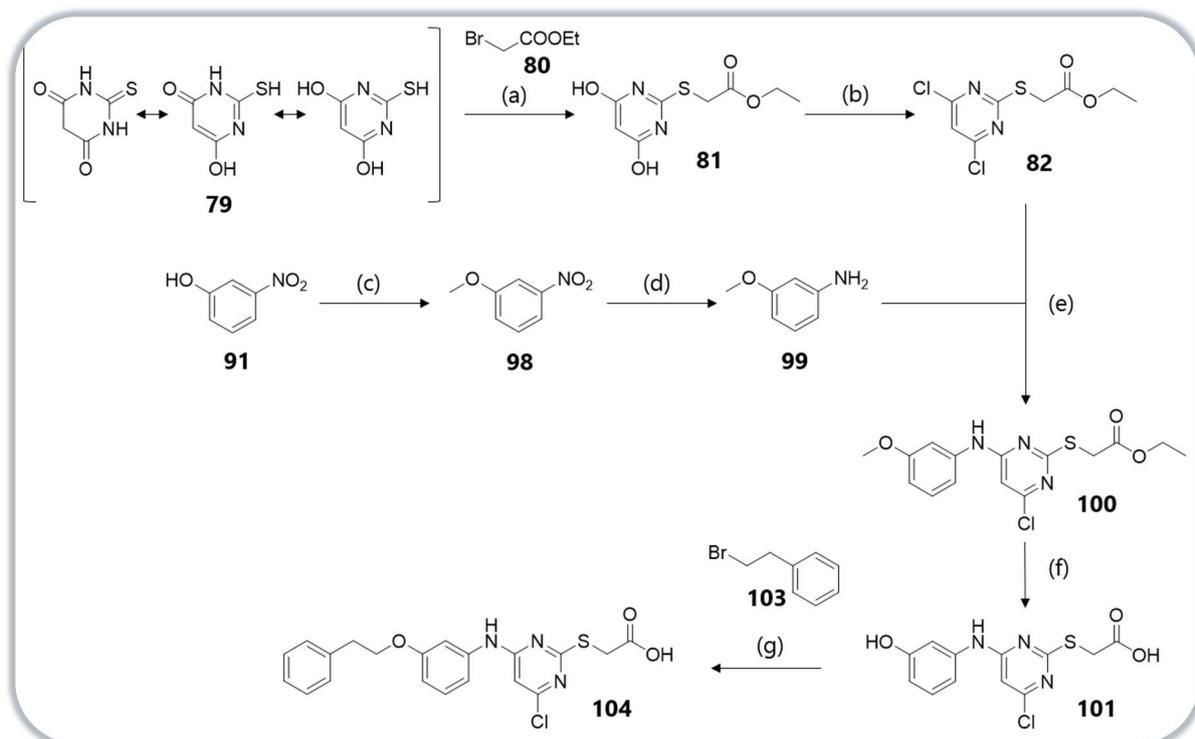
und sich das gewünschte Produkt nicht gebildet hatte. Eine Vermutung war, dass die Schutzgruppe die hohen Temperaturen von 120 °C nicht ausgehalten hat und es daraufhin zu einer Spaltung kam. Als neuer Ansatz erfolgte daraufhin eine Methylierung der OH-Gruppe des 3-Nitrophenols (**91**) durch Iodmethan zum 3-Nitroanisol (**98**) und anschließender Reduktion der Nitro-Gruppe zum *m*-Anisidin (**99**). Das Chloropyrimidin (**82**) und das *m*-Anisidin (**99**) wurden mittels S_NAr zu **100** gekoppelt (Schema 19). Bei dieser Reaktion wurde zur Ausbeutesteigerung



Schema 19: Demethylierung und Esterhydrolyse von **100** mittels Bortribromid (BBr₃) ergibt Verbindung **101** die mittels einer Williamson-Ether-Synthese und dem Morpholin-Linker (**84**) zu **102** umgesetzt wurde.

die sterisch gehinderte Base Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünig-Base) verwendet. Durch Demethylierung der Methoxy-Gruppe und gleichzeitige Esterhydrolyse durch Bortribromid von **100** wurde **101** erhalten und mittels einer Williamson-Ether-Synthese mit dem Morpholin-Linker (**84**) zu **102** umgesetzt (Schema 19). Die Aufreinigung von **102** stellte sich als schwierig heraus, da es sich bei der Verbindung um ein Zwitterion handelte, mit einem basischen Stickstoff im Morpholin-Ringsystem und der endständigen Carbonsäure. **102** befand sich nach Aufarbeitung mit Ethylacetat und Wasser zum größten Teil in der wässrigen Phase, wobei die Identifizierung des isoelektrischen Punkt sich als nicht trivial herausstellte. Da dieses Projekt darauf abzielte festzustellen, ob eine Verlängerung von **78**, zu einer selektiven allosterischen Bindung führte, spielt für die Bestätigung dieser Hypothese zunächst die Art des Linkers noch eine untergeordnete Rolle. Deshalb wurde, zur Vereinfachung der Aufreinigung, der Morpholin-Linker (**84**) gegen ein 2-Bromoethylbenzen-Linker (**103**) ausgetauscht und in einer Williamson-Ether-Synthese mit **101** verknüpft. Die Reaktion lieferte **104** mit einer moderaten Gesamtausbeute von 12%. Die vollständige Synthese von **104** kann Schema 20 entnommen werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

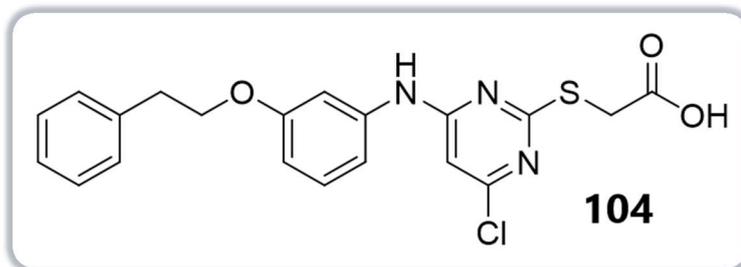


Schema 20: Vollständige Synthese von **104**. Reagenzien und Bedingungen: (a) NaOH, H₂O/Ethanol, 60 °C, 4,5 Std., 65%; (b) POCl₃, Diethylanilin, 90 °C, 5 Std., 75%; (c) CH₃I, NaH, DMF, RT, 24 Std., 82%; (d) H₂, Pd(C), EtOAc, RT, 15 Std., 92%; (e) Hünig-Base, DMF, 120 °C, 20 Std., 63%; (f) BBr₃, CH₂Cl₂, RT, 16 Std., 81%; (g) K₂CO₃, KI, DMF, 80 °C, 23 Std., 47%.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.3 Molekulare Modellierung

Durch die in Kapitel 3.2.2 beschriebene Synthese, konnte die neue Verbindung **104** als potenzieller allosterischer Ligand entdeckt werden. Hierfür wurde ausgehend von **39** das Tetrahydronaphthalin-Ringsystem entfernt und durch ein Phenylethoxybenzen-Motiv ersetzt,



Schema 21: Struktur der neuen Verbindung **104**, abgeleitet von **39**.

welches eine deutliche Verlängerung des Moleküls bedeutete (**104**, Schema 21). Um Verbindung **104** als potenziellen Kandidaten für das Vorhaben zu bestätigen, erfolgte eine Überprüfung seiner Eignung mittels molekularen Dockings im Vergleich zu **39**. Dafür wurden die zwei Verbindungen (**39**, **104**) in beide Bindungstaschen gedockt und die vorhergesagten Bindungsmodi ausgewertet (Abbildung 18).

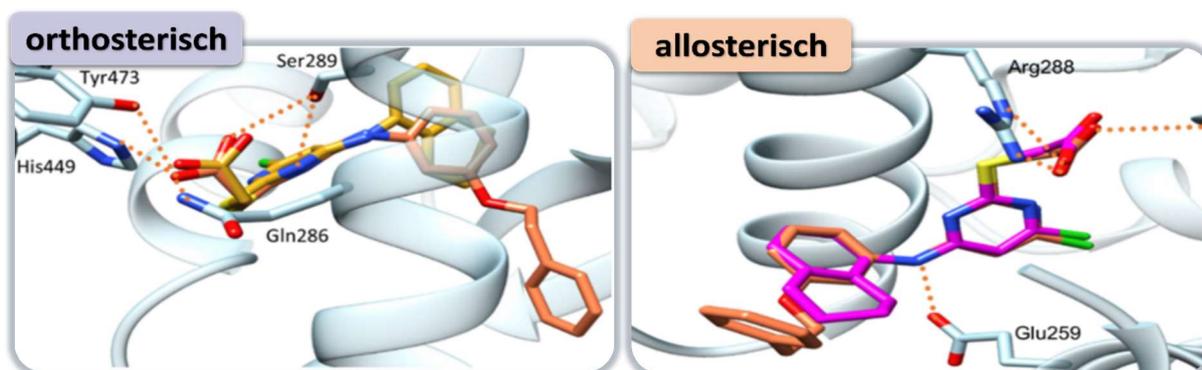


Abbildung 18: Docking von **104** in die Kristallstruktur von **39** in Komplex mit der PPAR γ -LBD (PDB: 8ATY¹⁹¹). Gezeigt ist die Bindung von **39** in die orthosterische (gelb) und allosterische (magenta) Tasche sowie die vorhergesagte Bindung von **104** (orange) in beide Taschen der PPAR γ -LBD.

In der orthosterischen Bindungstasche bestätigte das Docking, dass die Tasche keinen Platz für die verlängerte Kette bot. Im Vergleich dazu zeigten die Bindungsmodi von **39** und **104** in der allosterischen Bindungstasche eine hohe Übereinstimmung, wobei die verlängerte Kette von **104** deutlich aus der allosterischen Bindungstasche zum Lösungsmittel herausragte. Somit lieferte das molekulare Docking einen ersten Hinweis, dass die Verlängerung der Kette von **104** voraussichtlich eine Bindung in der orthosterischen Tasche verhindert, ohne die allosterische Wechselwirkung einzuschränken.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.4 Charakterisierung des allosterischen PPAR γ -Liganden

Um die Ergebnisse aus dem molekularen Docking zu überprüfen und den neu synthetisierten PPAR γ -Liganden zu charakterisieren, wurde **104** anschließend in zellulären und nicht zellulären Settings getestet, die im Folgenden beschrieben werden.

3.2.4.1 Zelluläre Tests

Die initiale zelluläre Testung von **104** erfolgte in einem Gal4-Hybrid-Reporterassay. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von **104** in An- und Abwesenheit von Pioglitazon (**33**, 3 μ M) behandelt. Dabei zeigte **104** an PPAR γ allein nur eine sehr schwache Aktivierung (Abbildung

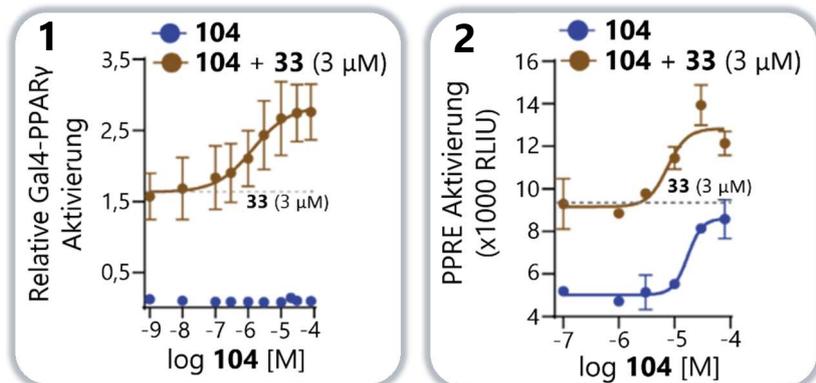


Abbildung 19: Aktivität von **104** an Gal4-PPAR γ (1) und PPRE (2) in An- und Abwesenheit von Pioglitazon (**33**, 3 μ M)¹⁹¹.

19), war aber in der Lage die Aktivität von **33** in einer dosisabhängigen Weise ($EC_{50} = 1,4 \pm 0,5$ μ M in Anwesenheit von **33**) deutlich zu steigern. Zudem induzierte **104** die Transkriptionsaktivität über das menschliche PPAR-RE (PPRE) und verstärkte die **33**-vermittelte PPRE-Aktivierung

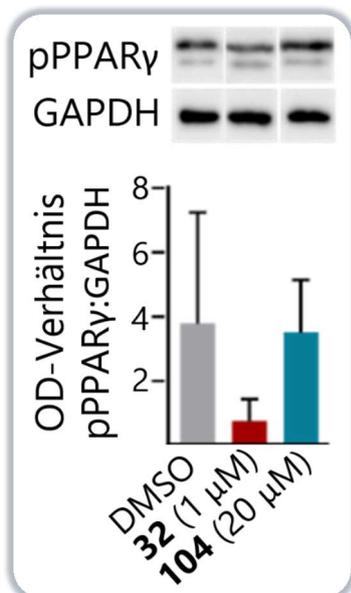


Abbildung 20: Effekte von **104** an der Ser273 Phosphorylierung von PPAR γ . Rosiglitazon (**32**) dient als positiv Kontrolle¹⁹¹.

(Abbildung 19). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass trotz der Bindung von **104** eine Bindung von **33** in die orthosterische Bindungstasche immer noch möglich war. Zudem führte die Bindung von **104** in die allosterische Bindungstasche zu einer Verstärkung der Aktivität von **33** an PPAR γ .

Neben diesen Studien zur PPAR-abhängigen Reporteraktivierung wurde die Fähigkeit von **104** untersucht, die PPAR γ Phosphorylierung von Ser273 in HEK293T-Zellen zu blockieren. Dieser Effekt steht im Zusammenhang mit der antidiabetischen Aktivität und kann bei klassischen TZD beobachtet werden²¹⁴. Die Zellen wurden mit Rosiglitazon (**32**, 1 μ M, Positivkontrolle), **104** (20 μ M) oder DMSO behandelt, anschließend das Protein extrahiert, mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Western Blotting ausgewertet (siehe Kapitel 5.8). Im Gegensatz zu

3. Ergebnisse und Diskussion

den TZD zeigte sich **104** nicht imstande eine Phosphorylierung von Ser273 an PPAR γ zu verhindern (Abbildung 20). Dies könnte andeuten, dass die Blockade der Phosphorylierung von

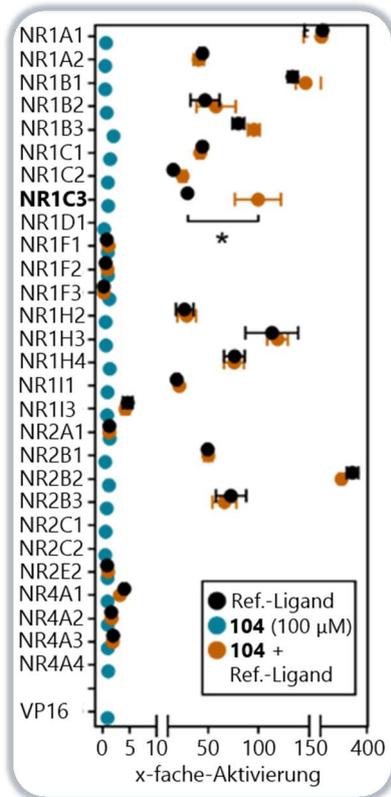


Abbildung 21: Selektivitätsprofil von **104** an verschiedenen NRs. Ref.-Ligand = Referenz-Ligand¹⁹¹.

Ser273 in Zusammenhang mit der orthosterischen Bindung steht und eine alleinige allosterische Bindung nicht ausreicht. Für eine spätere Anwendung als chemisches Tool in zellulären Experimenten wurde die Selektivität von **104** an anderen NRs ebenfalls in Gal4-Hybrid-Reporterassays untersucht (Abbildung 21). Dafür erfolgte die Testung von HEK293T-Zellen mit **104** (100 µM) auf den entsprechenden NRs in An- und Abwesenheit des jeweiligen Referenz-Liganden (1 µM). **104** zeigte hier weder agonistische noch antagonistische Effekte auf die jeweiligen Referenz-Liganden. Insbesondere die fehlende Aktivität von **104** auf den anderen Mitgliedern der PPAR-Familie (NR1C1, NR1C2) wies auf eine Subtypen Selektivität von **104** hin. Ebenso wurden außer der potenzierenden Wirkung auf die PPAR γ -Aktivierung durch Pioglitazon (**33**) keine ago-positiven Effekte entdeckt. Allerdings kann basierend auf diesem Assay nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer „stillen“ Bindung an eine alternative Stelle eines anderen

Rezeptors kommen kann, ohne dass diese detektiert wurde.

Neben der Selektivität erfolgte die Bestimmung der Toxizität von **104** in COS7-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen (1 µM, 10 µM, 100 µM). Dafür wurde die Anzahl der apoptotischen/nekrotischen Zellen im Vergleich zu den Positivkontrollen Doxorubicin/Flavopiridol erfasst (siehe Kapitel 5.9, Abbildung 22). **104** zeigte bis hin zu 100 µM keine toxischen Effekte und be-

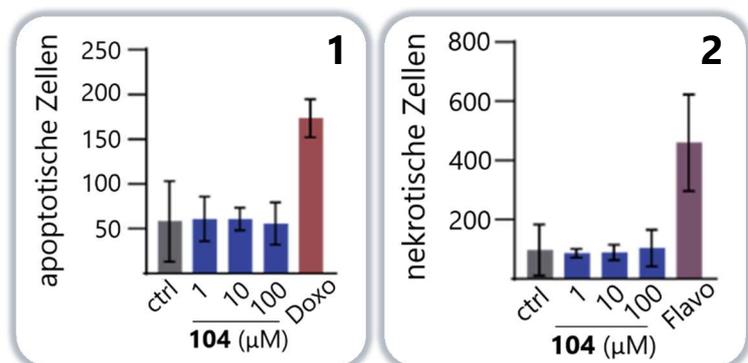


Abbildung 22: Effekte von **104** auf die Apoptose (1) und Nekrose (2) in COS7-Zellen nach 24 Stunden. Doxorubicin (Doxo, 100 µM) und Flavopiridol (Flavo, 100 µM) dienen als Positivkontrolle¹⁹¹.

fund sich auf einem vergleichbaren Niveau wie die unbehandelte Kontrolle.

3. Ergebnisse und Diskussion

Diese Ergebnisse aus zellulären Experimenten lieferten die ersten Hinweise auf das Potenzial, das **104** in Bezug auf die Charakterisierung und Erforschung der allosterischen Bindungstasche von PPAR γ besitzt. Insbesondere die vielversprechenden Ergebnisse aus dem Gal4-Assay wiesen darauf hin, dass **33** und **104** in der Lage sind gemeinsam zu binden und **104** somit die allosterische Bindungsstelle adressiert. Jedoch müssen sich, neben den zellulären Betrachtungen, diese Ergebnisse auch in zellfreien Systemen reproduzieren lassen. Aus diesem Grund wurde die möglicherweise selektive allosterische Bindung von **104** in zellfreien Experimenten begutachtet, die im Folgenden beschrieben werden.

3.2.4.2 Differentielle Scanning Fluorometrie

Zunächst wurde die thermische Stabilität der rekombinanten PPAR γ -LBD und die Stabilisierung durch die Testverbindungen (**33**, **104**) in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen untersucht. Hierfür wurde das Protein (2 μ M) mit dem Farbstoff SYPRO Orange (Verdünnung 1:1000), DMSO (5%) und den jeweiligen Testverbindungen gemischt und die Stabilität über einen breiten Temperaturbereich (71 Zyklen, jeweils 1 $^{\circ}$ C/Zyklus) beobachtet. Parallel dazu erfolgte die Durchführung des Experiments ohne Verwendung der PPAR γ -LBD, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Testverbindungen und dem Farbstoff die zu einem falsch-positiven Ergebnis führen könnten, auszuschließen (siehe Kapitel 5.3.1). Die Auswertung ergab,

dass **104** allein keine Auswirkung auf die Schmelztemperatur des Proteins zeigte. Allerdings war bei der Kombination mit **33** eine additive thermische Stabilisierung der PPAR γ -LBD zu beobachten (Abbildung 23). Die differentielle

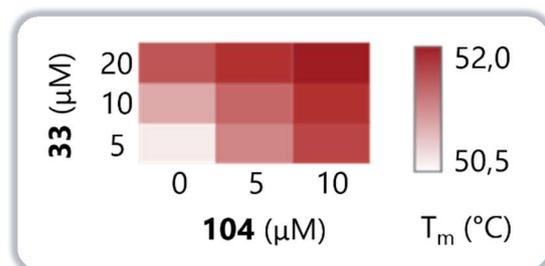


Abbildung 23: Thermische Stabilität der PPAR γ -LBD in der Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von **104** und Pioglitazon (**33**)¹⁹¹.

Scanning Fluorometrie (DSF) lieferte somit einen weiteren Hinweis auf eine gleichzeitige Bindung beider Verbindungen, wobei **104** die allosterische Bindungsstelle besetzte und zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Proteins beitrug. Somit konnten durch dieses Experiment die Effekte, die bereits in den zellulären Systemen beobachtet wurden, bestätigt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.4.2 Kristallisierung

Für einen sicheren Nachweis der direkten Bindung und zur Untersuchung des exakten Bindungsmodus, wurde **104** mit der PPAR γ -LBD (durch **Dr. Apirat Chaikuad**) co-kristallisiert. Die Induzierung des Kristallisationsprozesses erfolgte mit einer Dampfdiffusions-Methode (*Vapour Diffusion*). In dieser Methode kam es zu einem kontinuierlichen Ausgleich zwischen dem Konzentrationsgradienten, der sich zwischen einem „sitzenden Tropfen“ (*sitting drop*) des Protein-**104**-Gemisches und einer **104**-Reagenzienlösung befand, dieser Ausgleich lief so lange ab, bis die Kristallisation einsetzte (siehe Kapitel 5.2). Die Aufklärung der Kristallstruktur zeigte, dass **104** tatsächlich imstande war, selektiv an die allosterische Bindungsstelle zu binden (PDB: 8ATZ¹⁹¹) (Abbildung 24). Dabei bildete die Carbonsäure von **104** eine Wasserstoffbrückenbindung zu Arg288 sowie einen Kontakt zum Rückgrat von Ser342. Die verlängerte Phenylethyl-Gruppe befand sich wie vorhergesagt in der lösungsmittel-exponierten Region, während der Ether-Linker einen Kontakt zu Glu259 bildete. **104** wies keinen Kontakt mit der AF-2 in H12 auf,

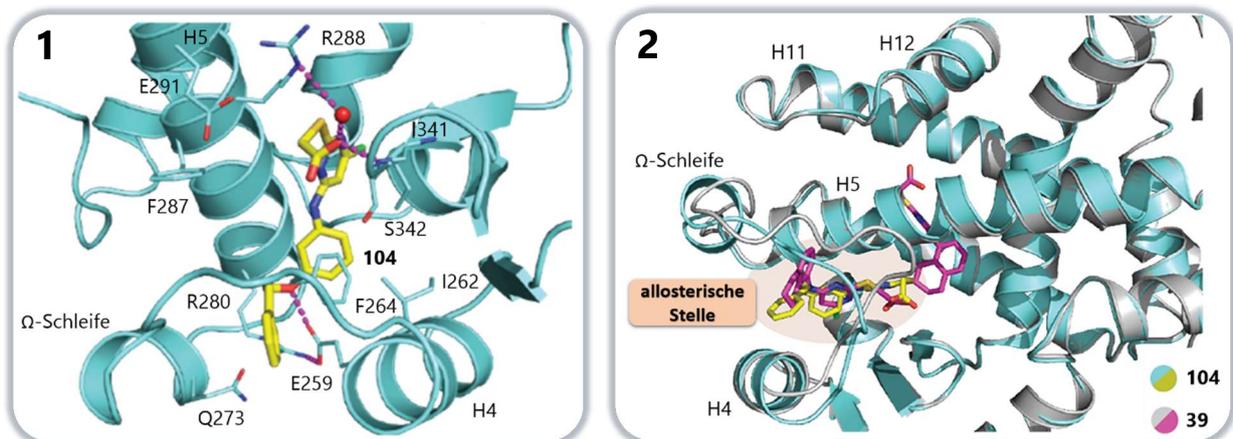


Abbildung 24: Die Co-Kristallstruktur von PPAR γ -LBD 1) im Komplex mit **104** (PDB: 8ATZ¹⁹¹) sowie 2) im Komplex mit **39** (magenta, PDB: 8ATY¹⁹¹) und **104** (gelb, PDB: 8ATZ¹⁹¹). Die Überlagerung von **104** und **39** (2) zeigte eine ähnliche aktive Konformation, aber eine selektive Bindung von **104** an die allosterische Bindungsstelle¹⁹¹.

war aber dennoch in der Lage eine aktive Konformation der PPAR γ -LBD zu induzieren, in der die AF2 stabilisiert und an den Kern der LBD gebunden vorlag. Wichtig anzumerken ist dabei, dass der PPAR γ -**104**-Komplex ohne ein Co-Aktivator-Peptid kristallisiert wurde, durch den diese aktive Konformation hätte induziert werden können²¹⁵. Daher war es wahrscheinlich, dass die beobachtete Konformation der PPAR γ -LBD an der allosterischen Stelle durch die Ligandenbindung von **104** verursacht wurde. Eine Erklärung dafür könnte die geordnete Ω -Schleife sein, die dafür sorgte, dass sich H4 und H5 verbanden und im Vergleich zur **39**-gebundenen Struktur eine etwas andere Konformation aufwies und zur allgemeinen Stabilisierung der PPAR γ -LBD und AF-2 einen Beitrag leistete²⁰⁶.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Bindung an eine alternative Stelle bei PPAR ist wie oben schon erwähnt nicht neuartig und es wurden bereits Liganden wie MRL-871 (**1**) und BVT.13 (**38**) identifiziert. Diese Liganden induzierten zusätzlich zu ihren verschiedenen Bindungsmodi unterschiedliche Proteinkonformationen, die zu einer unterschiedlichen Aktivierung des Rezeptors führten und entscheidend von der N-terminalen Helix 12 abhängen^{216,217,218}. Um diese verschiedenen Bindungsmodi besser zu verstehen und miteinander vergleichen zu können, galt es als nächstes die strukturellen Folgen der Bindung von **104** und diesen Liganden die ähnliche Epitope adressieren, zu untersuchen. Für den direkten Vergleich wurde zunächst eine inaktive apo-PPAR γ -Struktur und zwei Komplexe mit Pirinixinsäure (**31**) gelöst. Erstaunlicherweise zeigten die zwei Komplexe, von **31** zwei unterschiedliche Bindungsmodi. Ein Komplex befand sich in einer aktiven Konformation mit Ligandenbindung an die ortho- und allosterische Stelle, wie es bei **39** zu beobachten war. Der zweite Pirinixinsäure-Komplex dagegen befand sich in einer inaktiven Konformation, mit einer ungewöhnlichen Einzelbindung, die teilweise die ortho- und auch die allosterische Stelle einnahm, ähnlich wie es bei MRL-871 (**1**) zu beobachten war (Abbildung 25).

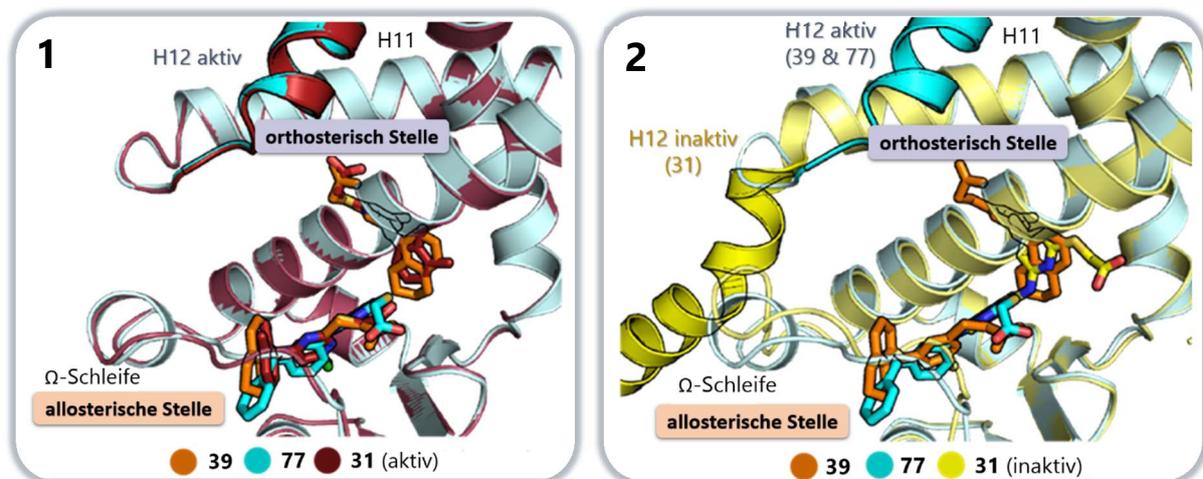


Abbildung 25: Pirinixinsäure (**31**) wies zwei verschiedene Bindungsmodi für die Bindung an PPAR γ auf. 1) Die gleichzeitige Bindung von zwei Molekülen von **31** in die ortho- und allosterische Bindungstasche, die der Bindung von **39** ähnelte und zu einer aktiven Konformation von H12 führte. 2) Einzelbindung von **31**, zeigte ein ähnliches Bindungsprofil wie bei MRL-871 (**1**), zwischen der ortho- und allosterischen Stelle und resultierte in einer inaktiven Konformation von H12. Zum Vergleich ist die Bindung von **39** (orange, PDB: 8ATY¹⁹¹) und **104** (türkis, PDB: 8ATZ¹⁹¹) an die PPAR γ -LBD dargestellt¹⁹¹.

Die beiden Komplexe von **31** entsprachen den Ergebnissen aus kürzlichen Publikationen die demonstrierten, dass die Bindung von typischen PPAR γ -Agonisten einem zweistufigen Mechanismus folgt²¹⁹. Bei einem strukturellen Vergleich von **1**, **31**, **38** (PDB: 2Q6S¹⁸⁸), **39** und **104** zeigte sich, dass sich durch deren Bindung unterschiedliche strukturelle Änderungen der PPAR γ -LBD ergaben, welche sich in drei unterschiedlichen Konformationen von H12 äußerten (Abbildung 26).

3. Ergebnisse und Diskussion

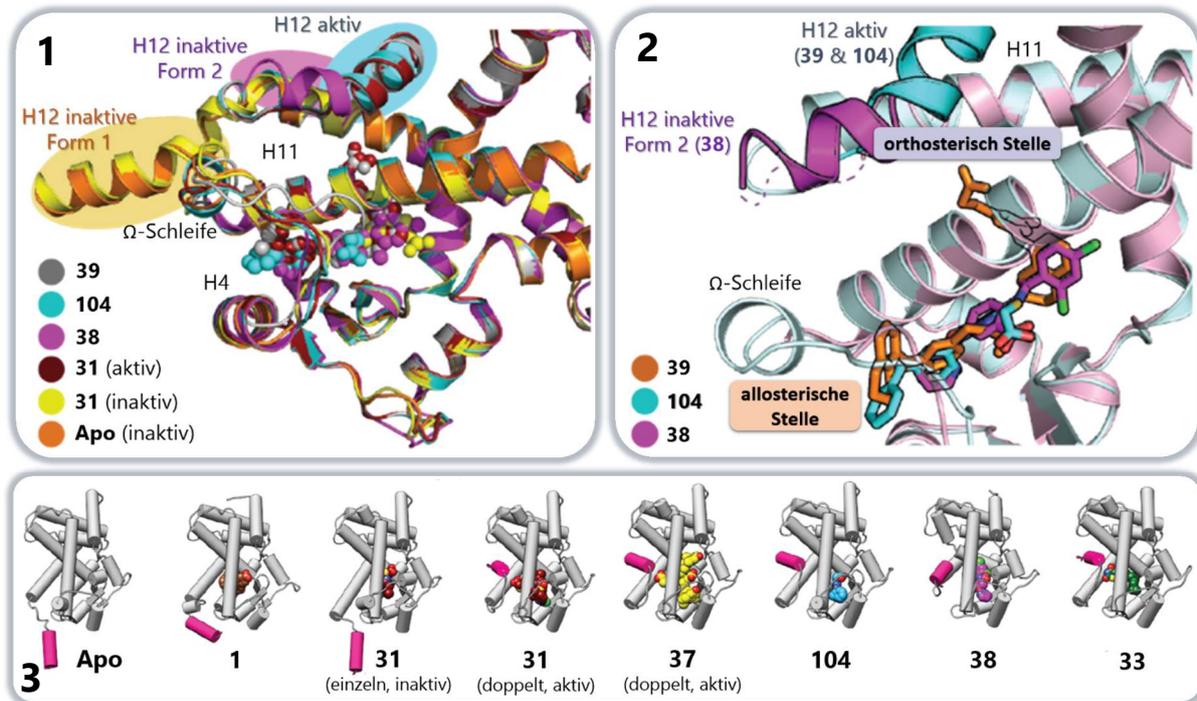


Abbildung 26: 1) Die PPAR γ -Liganden **31**, BVT.13 (**38**, PDB: 2Q6S¹⁸⁷), **39** und **104** induzierten verschiedene Konformationen von H12. 2) Im Vergleich zu **38** war die Bindung von **104** aus dem orthosterischen Bereich nach außen verschoben. 3) Vergleich der PPAR γ -LBD Strukturen im Komplex mit verschiedenen allosterischen und orthosterischen Liganden zeigte Unterschiede in der LBD und Konformation. Zum Vergleich der inaktiven und aktiven Form sind die inaktive Apostruktur und der Pioglitazon (**33**)-Komplex mit der PPAR γ -LBD abgebildet¹⁹¹.

Die Bindung von **1** und die Einzelbindung von **31** zwischen der orthosterischen und allosterischen Tasche waren nicht in der Lage die aktive Konformation von H12 im Kristall zu stabilisieren. H12 befand sich entweder in einem ungeordneten Zustand oder war vom LBD-Kern nach außen verlängert. Die Konformation ähnelte dabei der inaktiven Apo-Form, bei der eine vergleichbare Konformation aufgrund von Kristallkontakten beobachtet wurde^{219,220}. Im Gegensatz dazu verursachten die anderen allosterischen Liganden eine nach innen gedrehte Bewegung der H12, die zu deren Stabilisierung führte. Bemerkenswert war allerdings, dass nur die gleichzeitige Bindung von **31** oder GA (**37**) an die ortho- und allosterische Stelle sowie die Bindung von **104** an die allosterische Stelle allein, eine aktive Konformation der PPAR γ -LBD induzierte und stabilisierte – **38** war dazu nicht in der Lage. Die aktive Konformation ist durch die vollständige „in“-Konformation von H12 gekennzeichnet und erinnert an die für **33** (PDB: 5Y2O²²¹) beobachtete Konformation.

Aus der genauen Untersuchung der Überlagerung der gebundenen Zustände der oben genannten Liganden zeigte sich, dass diese unterschiedlichen Effekte mit den unterschiedlichen Ligandenbindungsmodi korrelieren könnten (Abbildung 27).

3. Ergebnisse und Diskussion

Dabei stellte sich heraus, dass **104** keine Bindung in der orthosterischen Tasche aufwies, während **1** und **38** Teile dieser Tasche besetzten, die typischerweise von orthosterischen Liganden wie **37** eingenommen werden. Dieser strukturelle Vergleich offenbarte einen außergewöhnlichen Bindungsmodus von **104**, da diese Verbindung im Vergleich zu anderen Liganden die orthosterische Bindungstasche weder teilweise noch vollständig besetzte (Abbildung 27). Um diesen einzigartigen Bindungsmodus weiter zu studieren, wurden Bindungsstudien in An- und Abwesenheit eines orthosterischen Liganden unter Verwendung von ITC und Massenspektrometrie (MS) durchgeführt.

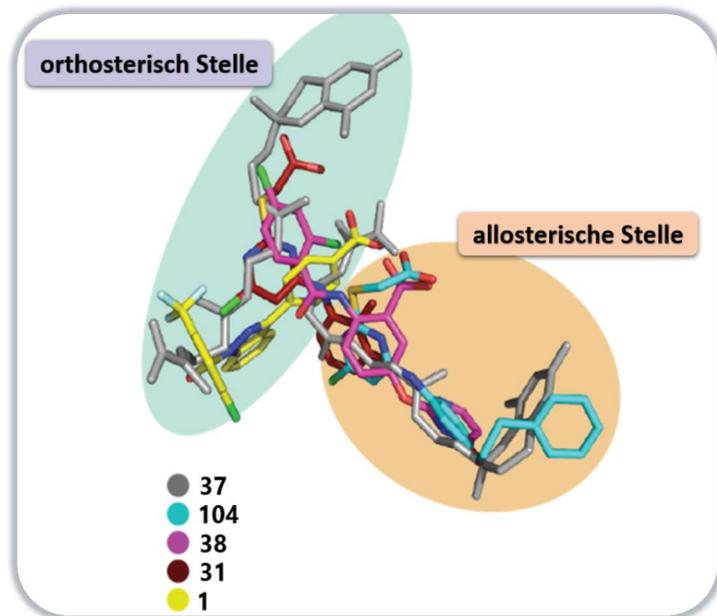


Abbildung 27: Die Überlagerung der gebundenen Liganden MRL-871 (**1**), Pirinixinsäure (**31**), GA (**37**), BVT.13 (**38**) und **104** innerhalb der ortho- und allosterischen Bindungsregion zeigte unterschiedliche Bindungsmodi¹⁹¹.

3.2.4.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Für die isotherme Titrationskalorimetrie wurde das PPAR γ -LBD-Protein (20 μ M) in einem entsprechenden Puffer mit 5% DMSO verdünnt und mit **39** (100 μ M) oder **104** (100 μ M) titriert. Außerdem wurde an GW9662 (**36**) gebundenes PPAR γ -Protein verwendet, das 24 Stunden vor dem Experiment durch Inkubation mit 250 μ M (**36**) bei 4 °C hergestellt und anschließend ebenfalls mit **39** (100 μ M) oder **104** (100 μ M) titriert wurde. Die Kontrolle der Bindung von **36** an die PPAR γ -LBD erfolgte durch eine Titration mit Pioglitazon (**33**), die keine Bindung von **33** zeigte. Zudem erfolgten Kontrollexperimente, um unspezifische Wärmeeffekte (Verdünnungswärme etc.) die eine falsch-positive Bindung vortäuschen könnten, ausschließen zu können (siehe Kapitel 5.3.2).

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse zeigten eine 1:2 (Rezeptor:Ligand)-Stöchiometrie für **39**, während **104** eine 1:1 Interaktion mit der PPAR γ -LBD aufwies (Abbildung 28). Bei der Verwendung der an **36**-gebun-

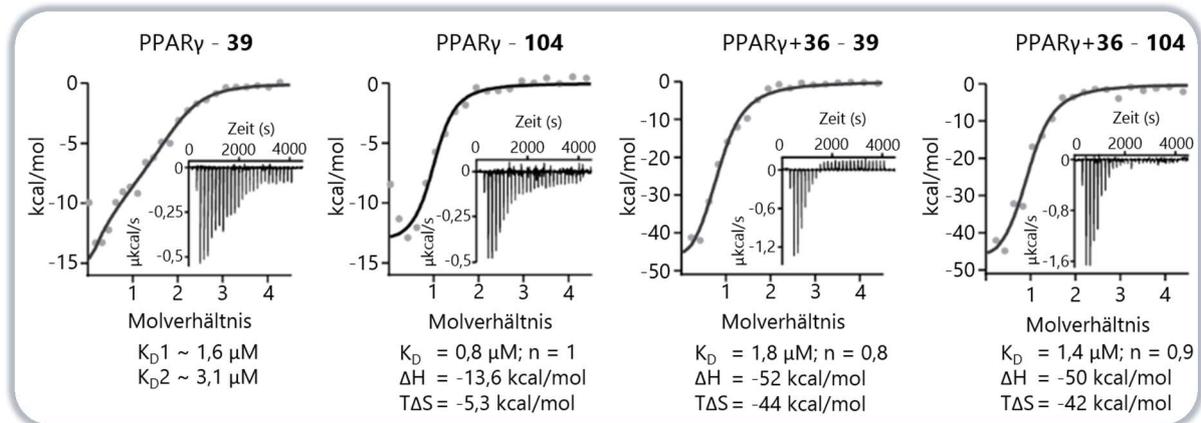


Abbildung 28: Ergebnisse der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) für die Bindung von **39** und **104** zur ligandenfreien und an GW9662(**36**)-gebundene PPAR γ -LBD. Die Anpassung der Bindungswärme ist mit den Isothermen als Einblendung dargestellt¹⁹¹.

denen PPAR γ -LBD, in der die orthosterische Bindungsstelle durch den kovalent gebundenen Antagonisten **36** besetzt war, demonstrierten bemerkenswerterweise sowohl **39** als auch **104** eine Bindungsstöchiometrie von 1:1 ohne Änderung in den Affinitäten, wodurch dieses Experiment ein weiteres starkes Indiz für die selektive allosterische Bindung von **104** lieferte.

3.2.4.4 MS-basierter-PPAR γ -Ligandenbindungs-Assay

Beim MS-basierten-Ligandenbindungs-Assay wurde PPAR γ -LBD-Protein (0,2 oder 1 μM) eine Stunde mit dem jeweiligen Liganden (**33** oder **104**) bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde der Protein-Ligand-Komplex von ungebundenem Liganden durch Ultrafiltration getrennt, der gebundene Ligand durch Denaturierung freigesetzt und mittels LC-ESI-MS (durch **Dr. Georg Höfner** und **Lennart Obeser**) quantifiziert (siehe Kapitel 5.3.3).

Die Ergebnisse zeigten, dass **104** in einer dosisabhängigen Weise mit dem PPAR γ -LBD-Protein interagierte, unabhängig von der An- oder Abwesenheit des orthosterischen Agonisten **33** (Abbildung 29). Hierdurch wurde abermals auf eine selektive Bindung von **104** in die allosterische Stelle hingedeutet, da die Anwesenheit von **36** (ITC) und **33** (MS) die Bindung von **104** in keiner Weise beeinflusste. Dies wies daraufhin, dass eine Bindung von ortho- und allosterischen Liganden ohne eine Konkurrenz zwischen diesen erfolgen kann. Andersherum offenbarte sich, dass die Bindung von **33** unabhängig von der Anwesenheit von **104** war, wodurch bestätigt wurde, dass **104** die Bindung des orthosterischen Agonisten ermöglichte (Abbildung 29). Dies

3. Ergebnisse und Diskussion

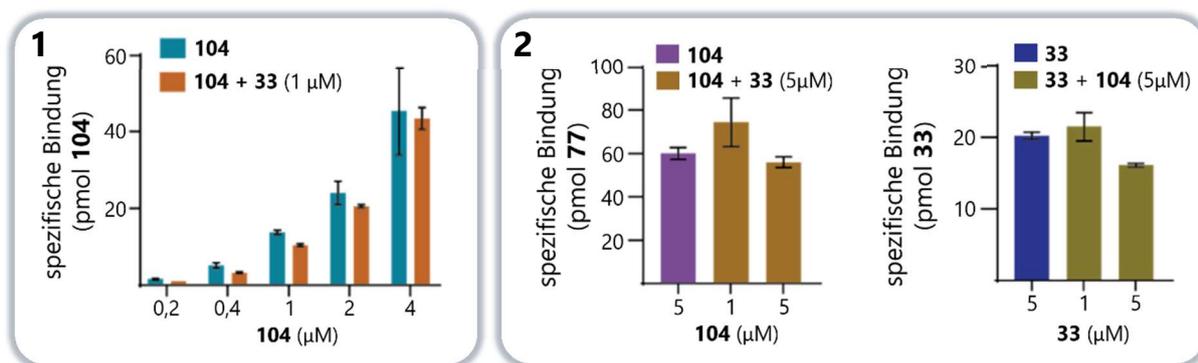


Abbildung 29: LC-ESI-MS-basiertes Ligandenbindungs-Experiment zeigte, 1) eine konzentrationsabhängige spezifische Bindung von **104** (0,2 – 4 μ M) an die PPAR γ -LBD in An- und Abwesenheit von Pioglitazon (**33**) 2) sowie eine spezifische Bindung von **104** und **33** in An- und Abwesenheit des jeweiligen anderen Liganden¹⁹¹.

konnte ebenfalls im Molekularen Docking von **33** und **104** veranschaulicht und bestätigt werden (Abbildung 30).

Zusammenfassend zeigten die bisher beschriebenen Ergebnisse, dass es gelungen ist mit **104** einen selektiven allosterischen Liganden zu entwerfen, der eine Untersuchung der selektiven allosterischen Modulation ermöglicht. Dabei wies schon das Molekulare Docking auf den wahrscheinlichsten Bindungsmodus für **104** in der allosterischen Bindungstasche hin, was die zellulären Untersuchungen bestätigte sowie die Beobachtung eines synergistischen Effekts bei der gleichzeitigen Bindung von Pioglitazon (**33**) und **104**. Die Co-Kristallisation von **104** mit der PPAR γ -LBD lieferte eine eindeutige Bestätigung der selektiven allosterischen Bindung und demonstrierte gerade im strukturellen Vergleich von **104** mit anderen Verbindungen, die auch in der Lage sind an die PPAR γ -LBD zu binden, seinen außergewöhnlichen Bindungsmodus. Dieser zeichnet sich darin aus selektiv die allosterische Bindungstasche zu adressieren und damit zu einer Aktivierung zu führen. Zudem zeigte **104** keine teilweise oder vollständige Besetzung der orthosterischen Bindungstasche wie sie bei anderen Liganden zu beobachten war. Auch in zellfreien Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass nach der Bindung von **104** eine Bindung an die orthosterische Bindungstasche durch einen Agonisten (ITC) oder Antagonisten (MS) immer noch möglich war, womit dies eine zusätzliche Bestätigung der unbesetzten orthosterischen Tasche lieferte.

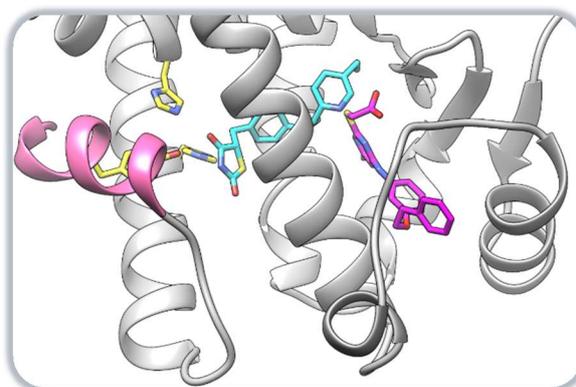


Abbildung 30: Molekulares Docking unterstützt die Annahme der gemeinsamen Bindung von Pioglitazon (**33**, türkis) und **104** (magenta) an die PPAR γ -LBD. **33** wurde in die unbesetzte orthosterische Stelle des **104**-PPAR γ -Komplexes (PDB: 8ATZ¹⁹¹) gedockt¹⁹¹.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.4.5 Molekulare Effekte – Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay

Um die molekularen Effekte von **104** auf die PPAR γ -Aktivität zu studieren, wurde der Einfluss von Pioglitazon (**33**), GW9662 (**36**) und **104** auf die Rekrutierung von Co-Regulatoren an die PPAR γ -LBD mittels zeitaufgelösten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (HTRF)-Assay verglichen (Durchführung und Auswertung erfolgte durch **Dr. Jan Heering**). Dafür wurde die PPAR γ -LBD mit Terbiumkryptat gelabelt und diente dadurch als FRET(Fluoreszenzresonanz-Energietransfer)-Donor. An Fluoreszein gekoppelte Peptide mit den Interaktionsmotiven bekannter Co-Regulatoren dienten als FRET-Akzeptor (siehe Kapitel 5.5).

Bei der Untersuchung von 29 kanonischen NR Co-Regulatoren induzierte **33** im Wesentlichen die Bindung von CBP-1, PGC-1 α , NCoA6 und DRIP2 und verdrängte SMRT und NCOR (Abbildung 31). Der Antagonist **36** hingegen verstärkte die Bindung von NCOR und SMRT an PPAR γ ,

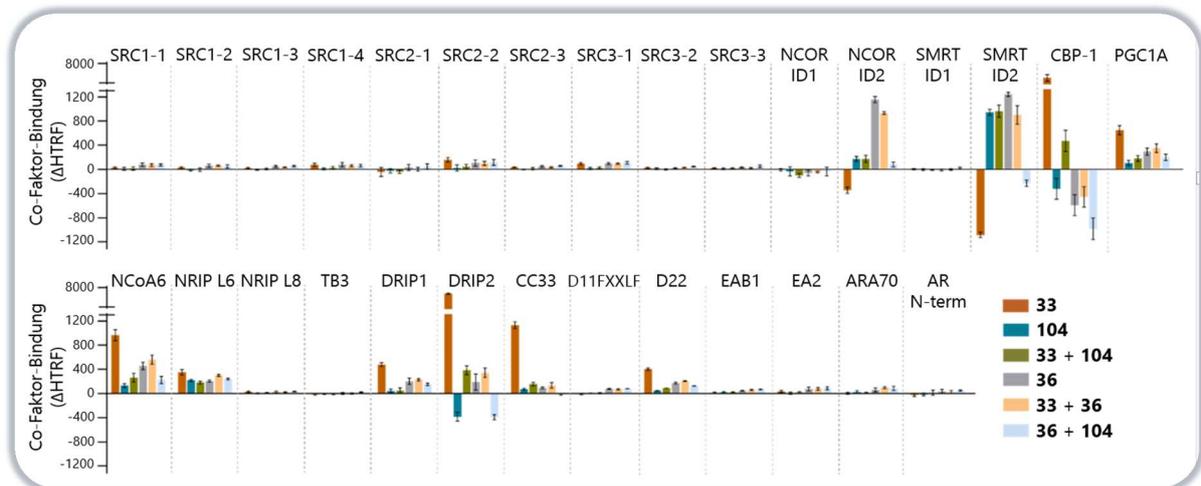


Abbildung 31: Pioglitazon (**33**, 3 μ M), GW9662 (**36**, 10 μ M) und **104** (30 μ M) verursachten unterschiedliche Auswirkungen auf die Rekrutierung von Co-Regulatoren durch PPAR γ ¹⁹¹.

verdrängte CBP-1 und zeigte bei der Co-Inkubation mit **33** eine Umkehrung der Effekte von **33**. Dazu waren noch eine geringfügige Verstärkung der Bindung der Co-Aktivatoren PGC-1 α , NCoA6 und DRIP2 zu beobachten, die auf einen schwach aktivierenden Stabilisierungseffekt von **36** hindeuteten, was sich durch seine schwach partiell agonistische Aktivität erklären ließ. Die Untersuchung von **104** enthüllte eine schwächere Rekrutierung von PGC-1 α und NCoA6. Jedoch war **104** im Gegensatz zu **33** in der Lage CBP-1 und DRIP2 zu verdrängen und die Bindung von SMRT und NCOR zu verstärken. Im Gegensatz zum Agonisten **33** und Antagonisten **36** demonstrierte **104** ein außergewöhnliches Modulationsprofil von PPAR γ mit aktivierenden (PGC-1 α , NCoA6) und inaktivierenden (CBP-1, DRIP2, SMRT, NCOR) Modulationen. Da in den bereits aufgeführten Experimenten gezeigt werden konnte, dass **33** gleichzeitig mit **104**

3. Ergebnisse und Diskussion

binden konnte, sollte der Effekt dieser gemeinsamen Bindung auch hinsichtlich auf die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Rekrutierung von Co-Regulatoren untersucht werden. In der Tat ergab sich, dass das Co-Faktor-Rekrutierungsprofil gemeinsame Effekte von beiden Liganden beinhaltete. **104** überwog bei den Effekten an der Co-Repressor Bindung (SMRT, NCOR), war aber nicht in der Lage die von **33** induzierte Co-Aktivator Rekrutierung (CBP-1 und DRIP2) umzukehren. Dies konnte auch in Kreuztitrationsexperimenten beobachtet werden (Abbildung 31). Dafür wurden Biotin-gelabeltes CBP oder SMRT-ID2 Peptid stabil an 12 nM Terbiumkryptat als Streptavidin Konjugat (Tb-SA) gekoppelt und bei 100 nM (für CBP) oder 24 nM (für SMRT-ID2) präsentiert (siehe Kapitel 5.6). Die durch **33** stimulierte Rekrutierung von CBP wurde durch **104** in einer dosisabhängigen Weise verringert, während **104** die Rekrutierung von SMRT-ID2 förderte. Bei der gleichzeitigen Testung von **104** und **36** zeigte sich eine zusätzliche Verdrängung von CBP-1, wohingegen die Rekrutierung von NCOR- und SMRT-Co-Repressoren aufgehoben wurde. Dies könnte auf kooperative Effekte auf die PPAR γ -LBD hindeuten. Die Unterschiede in den Rekrutierungsmustern stehen in Zusammenhang mit den unterschiedlichen ligandeninduzierten PPAR γ -LBD-Konformationen (siehe Kapitel 3.2.4.2). **104** war imstande einen aktiven Zustand, ähnlich dem des orthosterischen Agonisten **33** zu induzieren. Das wies darauf hin, dass die Bindung dieses allosterischen Liganden eine ausreichende Stabilisierung vermitteln kann, die zu einer teilweisen Aktivierung führte. Außerdem war **104** in der Lage, **36**-gebundenes PPAR γ zu aktivieren, was mit der Beobachtung der gleichzeitigen Bindung von **104** und **36** im ITC übereinstimmte. Dies deutete auf eine kooperative Stabilisierung durch ortho- und allosterischen Liganden hin.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.4.6 PPAR γ -RXR α -Heterodimerisierungs-Assay

Neben der Co-Regulator-Bindung spielt bei der Aktivierung von PPAR γ die Heterodimerisierung mit RXR eine wichtige Rolle, weshalb auch der Einfluss von **104** auf diese untersucht wurde. Für die Messung der Bildung des PPAR γ -RXR α -Heterodimers diente sGFP-RXR α -LBD als FRET-Akzeptor, dass in der Anwesenheit von biotinylierten PPAR γ -LBD und Tb-SA titriert wurde (siehe Kapitel 5.7). **33** und der RXR-Agonist SR11237 erhöhten die Heterodimerisierung von PPAR γ mit RXR²²². Bemerkenswerterweise konnte **104** (50 μ M) die Bildung des Heterodimers verringern und darüber hinaus die Stabilisierung des Dimers durch Pioglitazon (**33**) aufheben (Abbildung 32). Ähnliches war auch bei der Kombination von **104** und SR11237 zu beobachten.

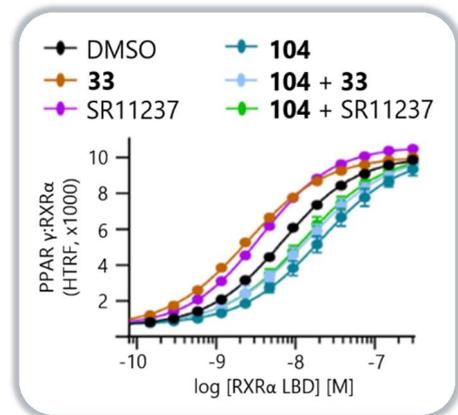


Abbildung 32: **104** (50 μ M) verringerte und Pioglitazon (**33**) sowie der RXR-Agonist SR11237 erhöhten die Heterodimerisierung von PPAR γ mit RXR. **104** war dazu in der Lage die Dimerstabilisierungseffekte von **33** und SR11237 zu blockieren¹⁹¹.

Dies deutet daraufhin, dass die Destabilisierung des Heterodimers nicht aus einer Konkurrenz mit **33** resultierte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Effekte von **104** auf die Co-Regulator-Bindung und Dimerisierung von PPAR γ deutlich von denen orthosterischer PPAR γ -Agonisten abweichen und unterschiedliche Auswirkungen zeigten, die durch die ortho- oder allosterischen PPAR γ -Modulation zustande kamen und einen vielschichtigen Crosstalk zwischen den Liganden beider Bindungsregionen vermuten lässt.

3.2.4.7 Adipozyten-getriebene mesenchymale Stammzellendifferenzierung

Gemäß der zellulären, biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung erschien **104** als geeignetes Tool um die biologischen Effekte selektiver Liganden der allosterischen Bindungsstelle zu erforschen. Hierfür sollte zunächst untersucht werden, ob **104**

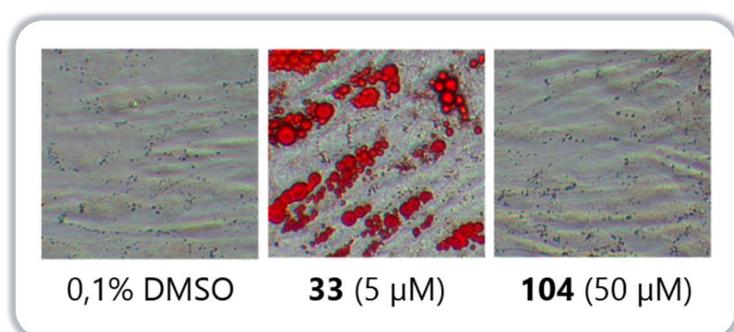


Abbildung 33: Bilder des ASC-Differenzierungsexperiments von Pioglitazon (**33**) und **104**. DMSO diente als Negativkontrolle¹⁹¹.

eine Förderung der Differenzierung von menschlichen adipozytären Stammzellen (ASC,

3. Ergebnisse und Diskussion

ASC52telo hTERT) in Adipozyten verursachte. Dieser Prozess wird normalerweise durch PPAR γ reguliert²²³. Hierfür wurden die Zellen ausgesät und einem Differenzierungsprozess unterzogen, bei dem die ersten 13 Tage der Austausch des Differenzierungsmedium alle 48-72

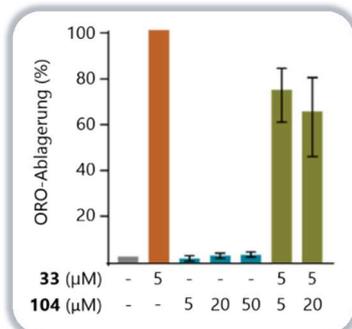


Abbildung 34: **104** war im Vergleich zu Pioglitazon (**33**) nicht in der Lage eine Differenzierung von humanen adipozytären Stammzellen (ASC) auszulösen¹⁹¹.

Stunden in sechs Zyklen erfolgte, wobei die Testverbindung jedes Mal frisch hinzugefügt wurde. Die letzten neun Tage erhielten die Zellen eine Behandlung mit einem Erhaltungsmedium, das ebenso alle 48-72 Stunden in vier Zyklen ausgetauscht wurde. Nach 21-tägiger Behandlung wurden die Zellen fixiert, anschließend mit Oil Red O (ORO) angefärbt, Bilder in entsprechender Vergrößerung aufgenommen und die Daten mit ImageJ ausgewertet (siehe Kapitel 5.11). Bei der Auswertung des Experiments stellte sich heraus, dass **104** im Gegensatz zu **33** selbst bei hohen Konzentrationen von 50 µM keine Adipogenese induzierte. **104** war sogar fähig die von **33**-induzierte Adipogenese leicht zu verringern (Abbildung 33, Abbildung 34). Das ASC-Differenzierungsexperiment zeigte, dass die Bindung von **104** in die allosterische Bindungsstelle kein klassisches, pro-adipogenes PPAR γ -Signaling auslöste.

Stunden in sechs Zyklen erfolgte, wobei die Testverbindung jedes Mal frisch hinzugefügt wurde. Die letzten neun Tage erhielten die Zellen eine Behandlung mit einem Erhaltungsmedium, das ebenso alle 48-72 Stunden in vier Zyklen ausgetauscht wurde. Nach 21-tägiger Behandlung wurden die Zellen fixiert, anschließend mit Oil Red O (ORO) angefärbt, Bilder in entsprechender Vergrößerung aufgenommen und die Daten mit ImageJ ausgewertet (siehe Kapitel 5.11). Bei der Auswertung des Experiments stellte sich heraus, dass **104** im Gegensatz zu **33** selbst bei hohen Konzentrationen von 50 µM keine Adipogenese induzierte. **104** war sogar fähig die von **33**-induzierte Adipogenese leicht zu verringern (Abbildung 33, Abbildung 34). Das ASC-Differenzierungsexperiment zeigte, dass die Bindung von **104** in die allosterische Bindungsstelle kein klassisches, pro-adipogenes PPAR γ -Signaling auslöste.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.4.8 Differentielle Genexpressionsanalyse von Hepatozyten

Zur näheren Betrachtung der nicht-kanonischen PPAR γ -Modulation, erfolgte als nächstes die Untersuchung des Einflusses von **104** auf die Genexpression in Hepatozyten (HepG2) mittels RNA-Sequenzierung. Dafür wurden HepG2-Zellen ausgesät und mit **104** (+0,1% DMSO) oder nur 0,1% DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden wurden die Zellen geerntet, entsprechend aufbereitet und die RNA extrahiert. Die Sequenzierung der RNA erfolgte durch das Unternehmen Novogene auf Honorarbasis (siehe Kapitel 5.12).

Nach Auswertung der Daten war festzustellen, dass **104** eine signifikante Veränderung von 1750 proteinkodierenden Genen verursachte. Allerdings konnte bei **104** keine Induktion der kanonischen PPAR-Signalgebung beobachtet werden (Abbildung 35) im Gegensatz zu Pioglitazon (**33**) und GA (**37**) (Abbildung 36, Abbildung 37)¹⁸⁴.

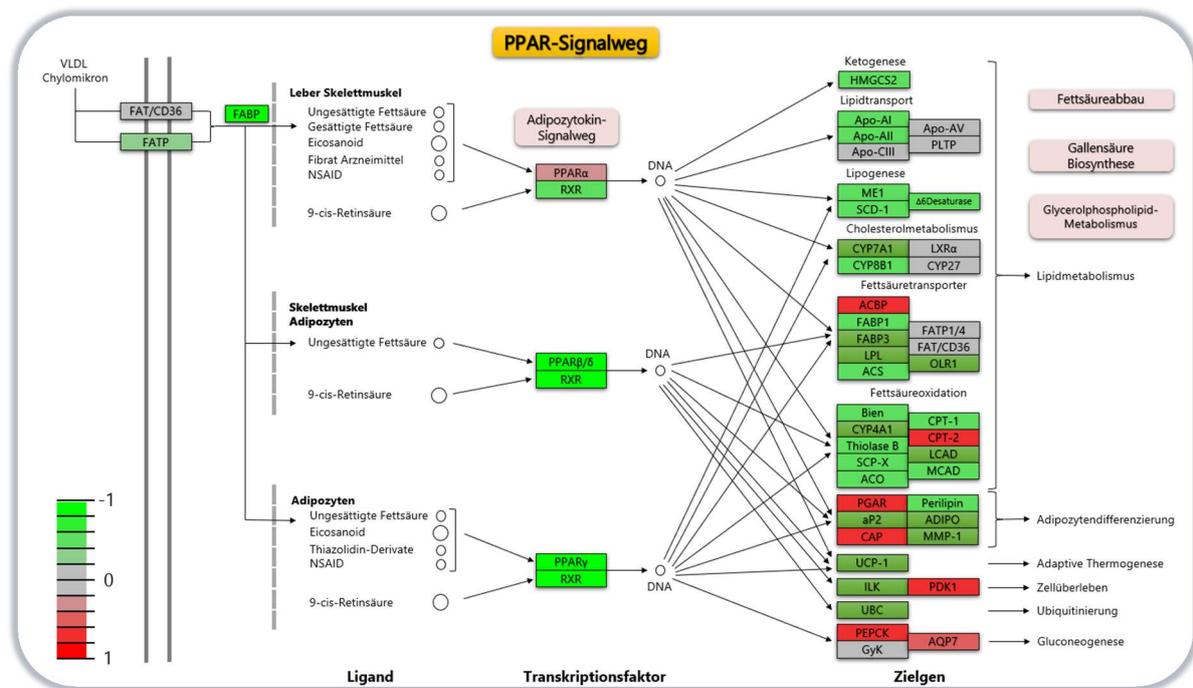


Abbildung 35: Effekte von **104** auf den PPAR-Signalweg in HepG2-Zellen. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert¹⁹¹.

3. Ergebnisse und Diskussion

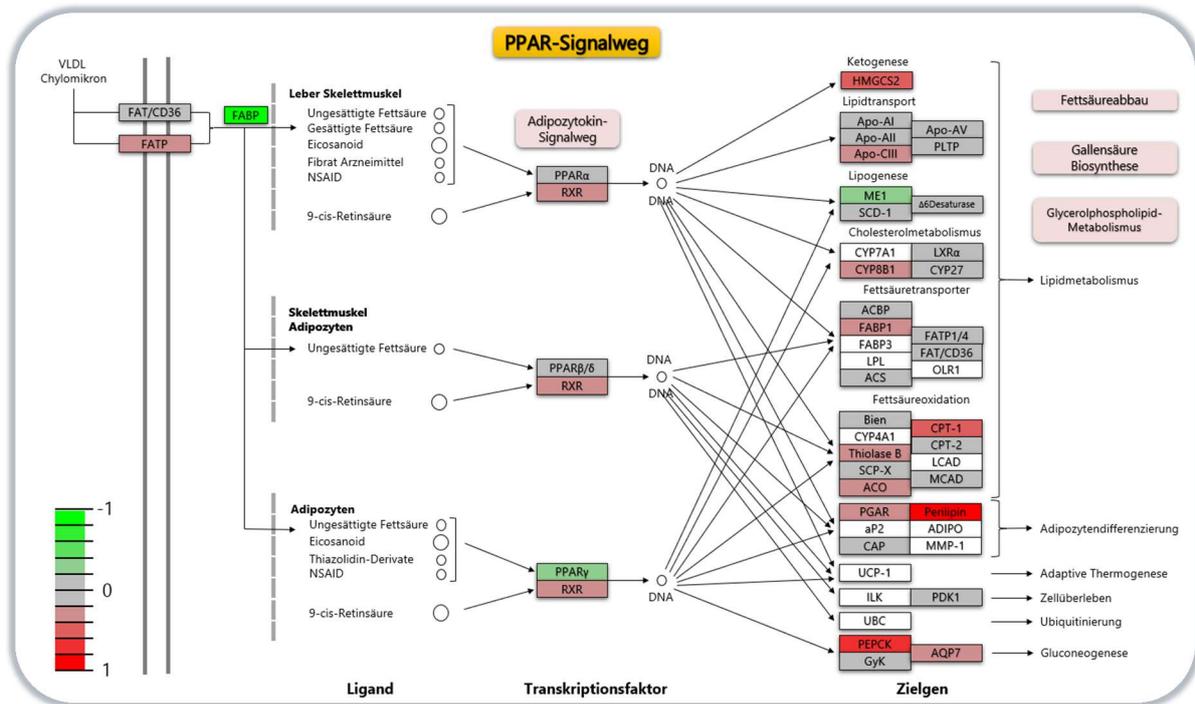


Abbildung 36: Effekte von Pioglitazon (33) auf den Signalweg von PPAR-Signalweg in HepG2-Zellen¹⁸³. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert¹⁸⁴.

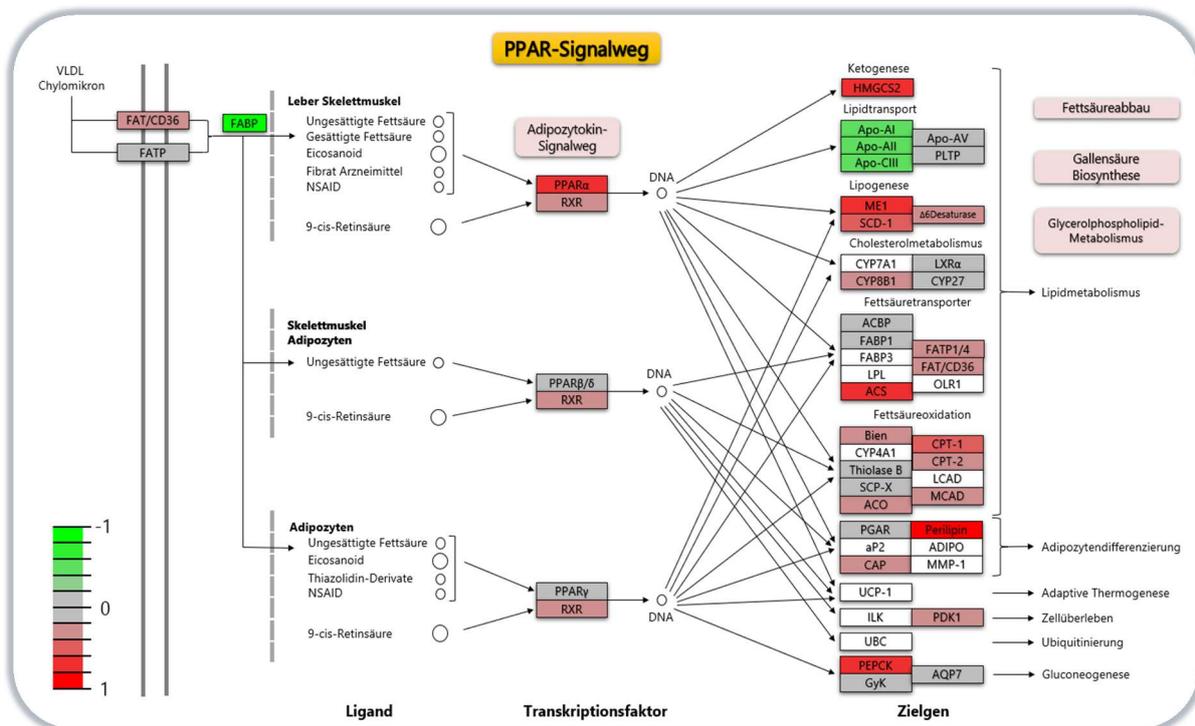


Abbildung 37: Effekte von Garcinolsäure (37) auf den Signalweg von PPAR-Signalweg in HepG2-Zellen¹⁸³. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert¹⁸⁴.

Tatsächlich bewirkte **104** eine Senkung der Expression mehrerer PPAR_γ-regulierter Gene, die an der Adipogenese, dem Fettstoffwechsel und -transport beteiligt sind (z.B. CPT-1, Perilipin,

3. Ergebnisse und Diskussion

FABP1, SCD-1)²²⁴. Dies stimmte mit den fehlenden pro-adipogenen Wirkungen bei der ASC-Differenzierung überein. Genauere Untersuchungen der 1750 von **104** regulierten Genen zeigten bei 230 Genen experimentell bestätigte oder vorhergesagte PPAR-REs in der Promoterregion, die zusätzlich auf PPAR-vermittelte Effekte von **104** hinwiesen²²⁵. Beim Vergleich von **104** und GA (**37**) konnten gemeinsame Auswirkungen identifiziert werden, wobei **104** eine höhere Selektivität zeigte (Abbildung 38)¹⁸⁴. Durch eine differenzierte Genexpressionsanalyse konnte

eine Herunterregulierung der Signalübertragung des Forkhead-Box O (FOXO) Signalwegs, anti-apoptotische und anti-proliferative Aktivität sowie eine verringerte Lipogenese als bemerkenswerte Auswirkungen von **104** festgestellt werden (Abbildung 39-43)²²⁴.



Abbildung 38 : Gegenüberstellung der Effekte von **104** und GA (**37**) bei der Genexpression¹⁸³. Die Heatmap zeigt hochregulierte (blau), runterregulierte (rot) und nicht regulierte (schwarz) Gene¹⁹¹.

Durch die Herabregulierung der FOXO-Signalübertragung kommt es zu einer Förderung von antioxidativen und zytoprotektiven Genen und zu einer Verringerung der Expression von negativen Zellzyklusregulatoren. Eine Hochregulierung führt zur Stimulation von pro-apoptotischen Genen (Bim, TRAIL, FasL)²²⁶. Darüber hinaus spielt FOXO eine Rolle bei der Insulin-Signalübertragung und der Glukose-Homöostase (G6Pase, PEPCK). Eine Herunterregulierung von FOXO kann ebenfalls zu einer Umkehrung von Hyperglykämie und Insulinresistenz führen^{227,228}. Die Aktivität von FOXO wird durch Acetylierung und Phosphorylierung bestimmt²²⁹. Dabei führt die Deacetylierung (z.B. durch SIRT1) und Phosphorylierung, die durch oxidativen (JNK, MST1) und nährstoffbedingten Stress (AMPK) oder externe Stimuli (STAT3) ausgelöst werden kann, zu einer Aktivierung und infolgedessen gelangt FOXO (wieder) in den Zellkern²²⁹⁻²³¹. Acetylierung (z.B. durch CBP) und Phosphorylierung, die durch Wachstumsfaktoren oder Insulin-induziertes Zellwachstum ausgelöst werden, führen hingegen zu einer Inaktivierung und damit zum Export aus dem Kern sowie anschließendem Abbau von FOXO^{229,231,232}.

Die differenzierte Untersuchung der Genexpression von **104** zeigte, dass **104** eine Herunterregulierung von FOXO3 und Aktivatoren der FOXO-Signalübertragung (z.B. SIRT1, MAPK8,

3. Ergebnisse und Diskussion

TMFSF10) verursachte sowie eine Hochregulation von hemmenden Regulatoren (z.B. SGK1) zu beobachten war (Abbildung 39, Abbildung 40). Demgegenüber veränderte Pioglitazon (**33**) die

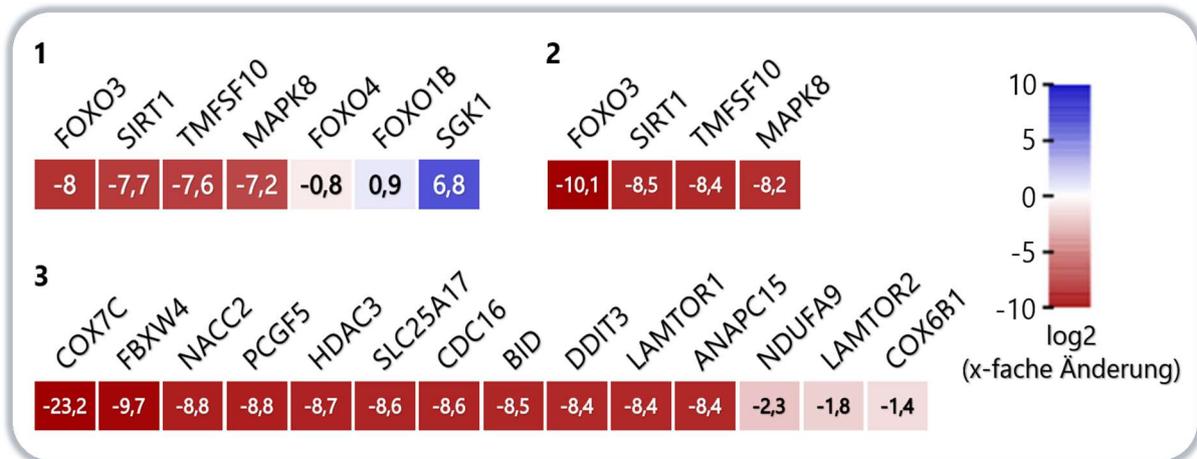


Abbildung 39: Eine Auswahl von Genen die durch die Behandlung mit **104** (20 μ M) reguliert wurden und mit dem FOXO-Signaling (1), Adipo-/Lipogenese (2), TOR-Signaling (3), Apoptose (3) und ATP-Erzeugung (3) in Verbindung stehen. Die Heatmap zeigt die \log_2 (x-fache Veränderung) der Genexpression von signifikant (p -Wert < 0,05) regulierten Genen¹⁹¹.

FOXO-Signalgebung nicht (Abbildung 41)¹⁸⁴. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die PPAR γ -Modulation von **104** auf die allosterische Bindungsstelle zurückzuführen ist. Die Hemmung der FOXO-Signalübertragung durch **104** führte außerdem zu einer Herunterregulierung von Genen, die in Verbindung zur Lipogenese (z.B. LDLRAP1, SERPINA3, ATP10A), der TOR-Signalübertragung (z. B. LAMTOR1, 2, mTORC1, PIP4K), der Zellzyklusprogression (z. B., ANAPC15, CDC16), Apoptose (z. B. DDIT3, BID) und ATP-Erzeugung (z. B. SLC25A17,

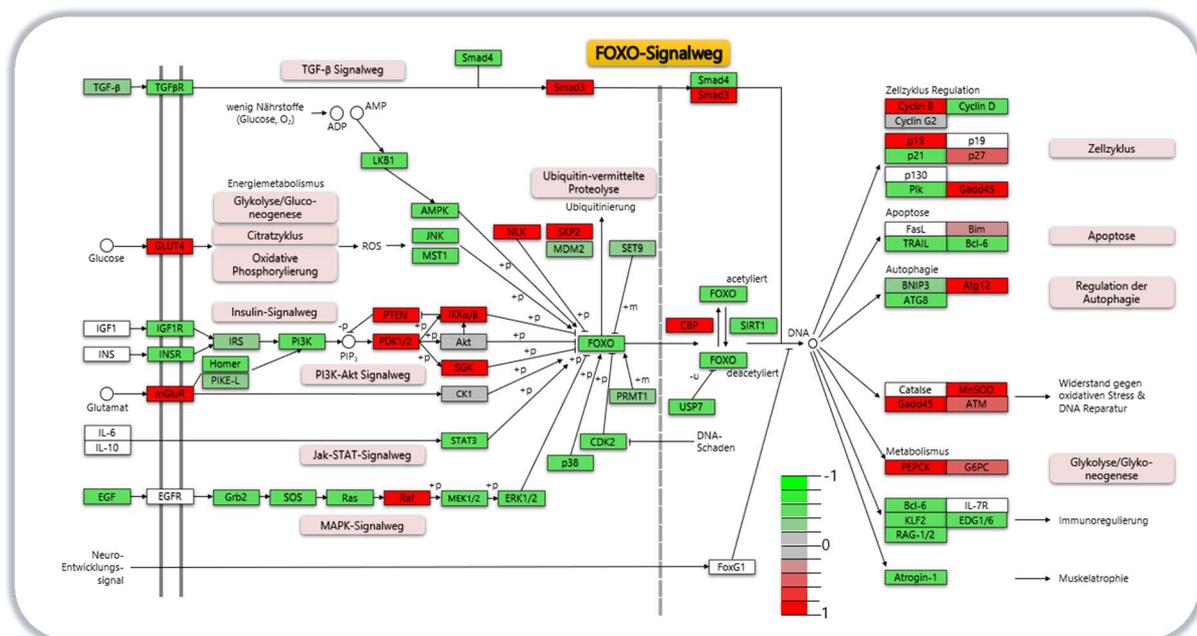


Abbildung 40: Effekte von **104** auf den FOXO-Signalweg in HepG2-Zellen. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als \log_2 (fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert¹⁹¹.

3. Ergebnisse und Diskussion

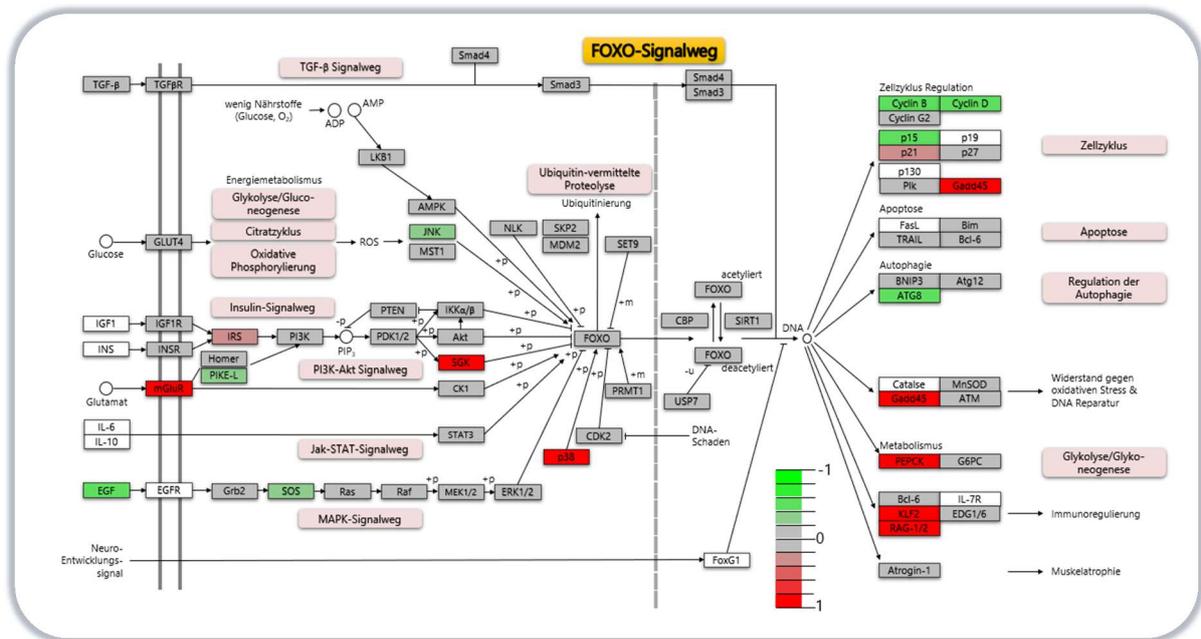


Abbildung 41: Effekte von Pioglitazon (33) auf den FOXO-Signalweg in HepG2-Zellen¹⁸³. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert¹⁸⁴.

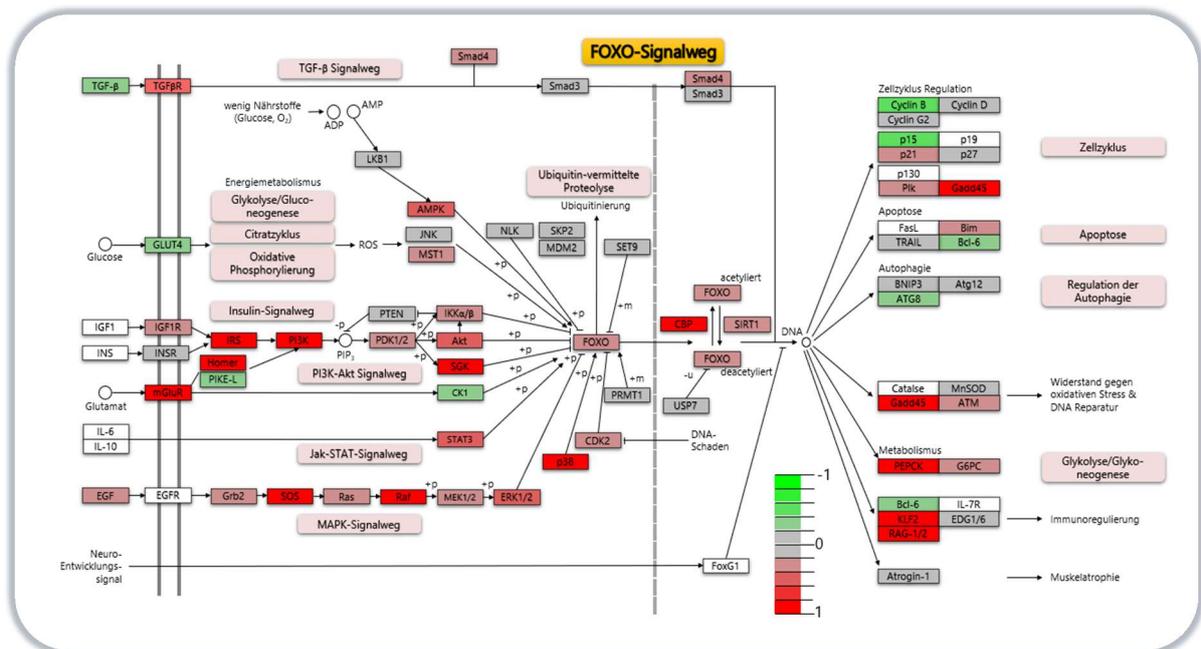


Abbildung 42: Effekte von Garcinolsäure (37, GA) auf den FOXO-Signalweg in HepG2-Zellen¹⁸³. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert¹⁸⁴.

NDUFA9)²²⁴ stehen. Die Gesamtheit dieser Effekte, die durch 104 ausgelöst wurden, deutet auf einen verringerte Stoffwechselaktivität und den Eintritt der Zellen in einen Ruhezustand hin. Eine Erklärung hierfür könnte die verringerte FOXO-Aktivität liefern.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.2.4.9 Beobachtung von FOXO-Phosphorylierung und Aktivität

Für ein genauere Untersuchung der beobachteten unterdrückenden Wirkung von **104** auf

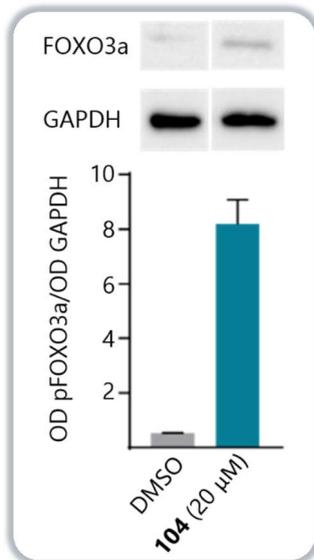


Abbildung 43: **104** (20 μM, 16 Std.) erhöht die inaktivierende Phosphorylierung von FOXO3a an Ser253¹⁹¹.

FOXO, erfolgte eine Betrachtung in orthogonalen Zellexperimenten. Hierfür wurden zum einen HEK293T-Zellen ausgesät und mit **104** (20 μM) oder DMSO (Negativkontrolle) inkubiert. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, das Protein extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blotting ausgewertet (siehe Kapitel 5.13). Die Auswertung zeigte, dass die Behandlung mit **104** zu einer Förderung der Phosphorylierung von FOXO3a an Ser253 führte, was den Export von FOXO aus dem Zellkern steigerte (Abbildung

43)²³³. Zudem konnte in einem weiteren Experiment an transfizierten HepG2-Zellen gezeigt werden, dass Pioglitazon (**33**) die Transkriptionsaktivität von FOXO in einer zeitabhängigen Weise erhöhte, während die Behandlung mit **104** die Transkriptionsaktivität verringerte. Für diese Steuerung könnte, in Anbetracht der Zeit, ein genomischer Mechanismus verantwortlich sein, der die Unterdrückung von FOXO bewirkte²³³ (Abbildung 44).

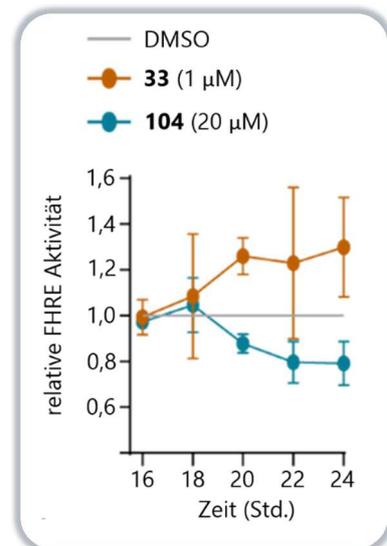


Abbildung 44: Pioglitazon (**33**) führt zu einer zeitabhängigen Erhöhung der FOXO-Aktivität in HepG2-Zellen, während **104** eine zeitabhängige Verringerung verursacht¹⁹¹.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Nukleäre Rezeptoren (NRs) sind ligandengesteuerte Transkriptionsfaktoren, die sich aus einer Superfamilie von 48 humanen Mitgliedern zusammensetzt. Seit vielen Jahrzehnten stellen sie ein attraktives Forschungsgebiet für die Arzneistoffentwicklung dar, da sie eine bedeutende Rolle in zahlreichen physiologischen (Metabolismus, Immunantwort, Zelldifferenzierung) und pathologischen (Krebs, metabolisches Syndrom, Asthma) Prozessen unseres Körpers spielen¹. In den letzten Jahren hat die Entdeckung von alternativen Liganden, die nicht die viel beforschte orthosterische Bindungstasche, sondern alternative Epitope adressieren, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Identifizierung und Erforschung solcher allosterischer Liganden könnte in der Zukunft zu einem vertieften Verständnis sowohl bekannter als auch noch unbekannter Wirkmechanismen führen und Ausgangspunkt für neue therapeutische Möglichkeiten bieten^{8,9,10}. Neben der Entwicklung von Liganden für klassische NRs ist insbesondere die Forschung an neuen Liganden für sogenannte Waisenrezeptoren, wie Nur77 oder NOR-1, von großer Bedeutung. Diese Rezeptoren weisen keinen bekannten endogenen Liganden auf und stellen daher eine besondere Herausforderung dar^{6,7}.

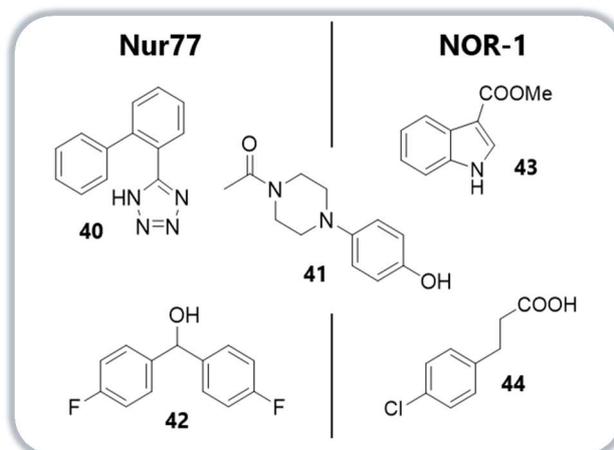
Das Ziel dieser Forschungsarbeit bestand darin, neue innovative Liganden für den Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor γ (PPAR γ) sowie für die Waisenrezeptoren Nervenwachstumsfaktor induzierter Klon B (Nur77) und Neuronen-abgeleiteter Waisenrezeptor (NOR-1) zu identifizieren.

Bei den Rezeptoren Nur77 und NOR-1 handelt es sich um noch unzureichend erforschte NRs der NR4A-Familie. Es fehlt insbesondere an Modulatoren dieser Rezeptoren als Werkzeuge, um ihr zum Teil noch unentdecktes Potential zu erforschen. Um diese Lücke zu schließen, wurde ein *in vitro* Screening (Gal4-Hybrid-Reporterassay) durchgeführt und eine Bibliothek von 480 Arzneistoff-Fragmenten, die aus bekannten strukturellen Motiven zugelassener Arzneimittel stammen, mittels Einzelmessungen (100 μ M) auf ihre modulatorische Aktivität an Nur77 und NOR-1 gescreent. Durch das Screening konnten für Nur77 neun und für NOR-1 16 primäre Treffer identifiziert werden, die eine Induktion (Rezeptoraktivität > 150% für Agonisten) oder Repression (Rezeptoraktivität < 60% für inverse Agonisten) des jeweiligen Rezeptors verursachten. Nach erneuter Testung dieser Verbindungen in vier unabhängigen biologischen Wiederholungen und einem Kontrolleexperiment mit dem Liganden-unabhängigen Transkriptionsinduktor VP16^{195,196}, um unspezifische Auswirkungen auf die Reporteraktivität zu erfassen und

4. Zusammenfassung und Ausblick

falsch positive Hits auszuschließen, blieben für Nur77 (**40-42**) und NOR-1 (**41, 43, 44**) jeweils drei Verbindungen als validierte Liganden übrig (Schema 22).

40 ($IC_{50} = 48 \pm 8 \mu M$) und **41** ($IC_{50} = 52 \pm 3 \mu M$) vermittelten moderate invers agonistische Aktivität an Nur77, **42** zeigte eine geringere Aktivität. **40** ($IC_{50} = 22 \pm 3 \mu M$) und **41** ($IC_{50} = 35 \pm 6 \mu M$) modulierten zudem den humanen Nur77 Vollängen-Rezeptor in einem Reportgen-Assay mit dem natürlichen humanen Response-Element (NBRE). Die Bindung an die rekombinante Ligandenbindungsdomäne (LBD) von Nur77 konnte ebenfalls mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC, **40** – $K_d = 7,8 \mu M$, **41** – $K_d = 10 \mu M$) nachgewiesen werden. Da sich das Strukturmotiv von **40** von einer prominenten Arzneistoffklasse, den Sartanen, ableitete wurden alle kommerziell verfügbaren Sartane hinsichtlich ihrer Wirkung auf Nur77 im Gal4-Assay untersucht - dabei zeigte nur Irbesartan (**45**) eine potenziell invers agonistische Aktivität ($IC_{50} = 30 \mu M$). Der Nachweis einer Bindung mittels ITC scheiterte jedoch. Die weitere Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von **41** demonstrierte, dass von diesem Chemotyp eine Optimierung von agonistischen und invers agonistischen Liganden für Nur77 möglich war. Dabei stellte sich heraus, dass die Anwesenheit, der Acetyl- und der OH-Gruppe für den inversen Agonismus notwendig war, während das Fehlen der Acetyl-Gruppe und Einführung von elektronenziehenden Gruppen am Phenylsubstituenten zu Agonismus führte. Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde der Chemotyp mithilfe Computer-gestützte Verfahren weiter optimiert. Dies geschah durch die Durchführung von Docking-Studien, um die Interaktion zwischen **41** und der Nur77-LBD vorherzusagen. Dabei konnte unter den vier bekannten Bindungstaschen von Nur77 die THPN (**16**) Bindungstasche (PDB: 4JGV¹²⁰) als die Tasche mit dem höchsten Docking-Score identifiziert werden. Bei genauer Untersuchung dieser Bindungstasche stellte sich heraus, dass im Bereich des *N*-Acetyl-Substituenten noch Raum für eine Verlängerung von **41** zur Verfügung stehen könnte. Mit dieser Erkenntnis wurden 25.021 kommerziell verfügbare N2-substituierte N1-Phenylpiperazine mittels molekularen Dockings an die vorhergesagte Bindungsstelle von **41** gescreent und die Verbindungen nach ihrem Docking-Score sortiert. Aus den 100 Verbindungen mit dem höchsten Score wurden nach Filtern für das



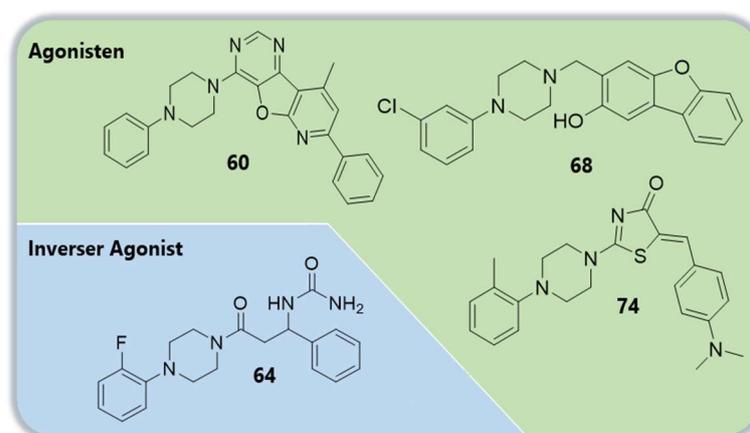
Schema 22: Screening-Hits für Nur77 und NOR-1.

Schema 22: Screening-Hits für Nur77 und NOR-1.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Molekulargewicht (< 500 g/mol) und Entfernen von gleichen Scaffolds 17 chemisch diverse von **41** abgeleitete Verbindungen als Hits identifiziert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit Nur77 zu modulieren *in vitro* getestet. In der primären Testung im Gal4-Reportergen-Assay (Konzentration: 30 μ M, 100 μ M) zeigten acht Verbindungen (**60**, **61**, **62**, **64**, **67**, **68**, **69**, **74**) eine Modulation von Nur77, wohingegen bei fünf Verbindungen (**58**, **59**, **65**, **66**, **72**) keine Aktivität festzustellen war. Die restlichen vier Verbindungen (**63**, **70**, **71**, **73**) mussten aufgrund von toxischen Effekten ausgeschlossen werden. Unter den acht Verbindungen, die eine Modulation von Nur77 aufwiesen, konnten durch Auswertung von Dosis-Wirkungs-Kurven drei Verbindungen (**60**, **68**, **74**) als neue Agonisten und eine Verbindung (**64**) als neuer inverser Agonist identifiziert werden (Schema 23). Auch am monomeren humanen Vollängen Nur77 am NBRE

demonstrierte **60** (146% Nur77 Aktivierung bei 100 μ M) und **74** (163% Nur77 Aktivierung bei 100 μ M) eine Nur77 Aktivierung beziehungsweise **64** (81% verbleibende Aktivierung bei 100 μ M) eine Repression von Nur77. Die höchste Nur77 Aktivierung in beiden Assays wurde durch **68** ($EC_{50} = 2 \pm 1 \mu$ M, $169 \pm 18\%$



Schema 23: Aktive Verbindungen aus dem molekularen Docking. Grün = agonistische Verbindungen (**60**, **68**, **74**), blau = invers agonistische Verbindung (**64**).

maximale Aktivierung) ausgelöst. Zusätzlich zu den Ergebnissen aus den Assays war es möglich die Bindung von allen aktiven Verbindungen, ausgenommen **74**, mittels ITC zu bestätigen. Zudem wurden die Verbindungen, die in den zellulären Tests wegen toxischen Effekten nicht charakterisiert werden konnten, ebenfalls hinsichtlich ihrer Bindung an das Nur77-Protein im ITC untersucht. Dadurch gelang es für **63** und **73** eine Bindung nachzuweisen, während **70** und **71** keine Bindung zeigten. Zusammengefasst wies die Auswertung der strukturellen Merkmale daraufhin, dass starre und planare Strukturmerkmale favorisierte Substituenten für *N*-Phenylpiperazin-basierte Nur77 Agonisten darstellten. Zusätzlich gab die fehlende Aktivität von **65**, **66** und **71** Hinweise auf einen Einfluss auf die Ligandengeometrie, wobei sich eine Tendenz für gewinkelte gegenüber linearen Gerüsten offenbarte. In Hinblick auf die Entwicklung von potenteren Nur77 Liganden wiesen die Verbindungen **68** und **74** (~ 250% maximale Aktivierung

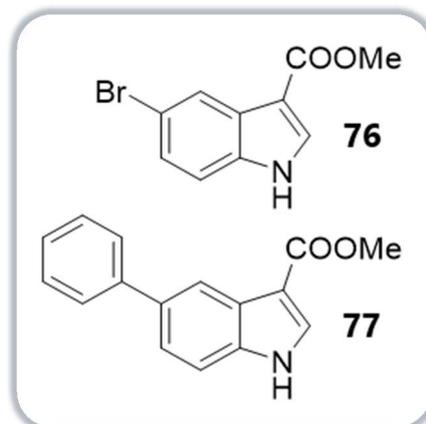
4. Zusammenfassung und Ausblick

im Gal4-Assay) die höchste Nur77-Aktivierung auf und bieten dadurch einen vielversprechenden Startpunkt für die Entwicklung von Nur77-Agonisten. Darüber hinaus demonstrierte insbesondere **68** eine potente Aktivierung von Gal4-Nur77 und Vollängen-Nur77 und wies eine Bindungsaffinität im unteren mikromolaren Bereich auf. Bei der Untersuchung der Selektivität ergab sich lediglich eine leichte agonistische Aktivität an Rezeptoren aus der gleichen NR4A-Familie (Nurr1, NOR-1), was sich durch die strukturelle Ähnlichkeit der Rezeptoren erklären lässt. Nichtsdestotrotz konnte beim Vergleich der Aktivitäten innerhalb der NR4A-Familie eine deutlich höhere Aktivität auf Nur77 beobachtet werden, was auf eine gewisse Präferenz für Nur77 hinwies. Daneben zeigten weitere Testungen, dass **68** in die vorhergesagte THPN-Bindungstasche band und die mRNA-Expression des durch Nur77 regulierten Transkriptionsfaktor GATA-Bindungsfaktor 2 (GATA2) in HeLA-Zellen erhöhte. Abschließend kann festgestellt werden, dass die Identifizierung des *N*-Phenylpiperazin-Derivates **68** eine Verbindung offenbarte, die sich durch ihre hohe Potenz, ihre beachtenswerte Aktivierung von Nur77 und ihre gewissen Selektivität gegenüber den anderen Vertretern der NR4A-Familie, die eine seltene Eigenschaft darstellt²³⁴, auszeichnet. Dies macht **68** zu einer vielversprechenden Leitstruktur für die zukünftige Erforschung von noch potenteren Nur77-Liganden, insbesondere im Hinblick auf ihre potenzielle Wirkung bei neurodegenerativen Erkrankungen.

Neben der Bindung an Nur77 wies Verbindung **41** ($IC_{50} = 73 \pm 19 \mu M$) ebenfalls eine inverse Modulation von NOR-1 auf. Zudem konnte bei **43** ($IC_{50} = 47 \pm 8 \mu M$) ein inverser Agonismus und **44** ($EC_{50} = 44 \pm 6 \mu M$) ein Agonismus an NOR-1 identifiziert werden. Die weitere Charakterisierung der Screening-Hits **41** und **43** für die Modulation von NOR-1 wurden durch Daniel Zaienne durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung sind in ausführlicher Form in seiner Forschungsarbeit zu finden und werden in der vorliegenden nur zusammenfassend dargestellt. Bei der strukturellen Untersuchung von **41** stellte sich heraus, dass das Fehlen der Acetyl- oder phenolischen Hydroxy-Gruppe, wie schon bei Nur77, zum Verlust des inversen Agonismus führte. Die inverse Aktivität wandelte sich durch das Fehlen der Acetylgruppe und die Variation der 4-Position ($-NH_2$, $-NO_2$, $-Cl$) in eine leicht agonistische Aktivität, was eine Möglichkeit zur Entwicklung von Agonisten für NOR-1 bietet. Durch die Untersuchung der strukturellen Erweiterung von **43** mit einem Chlor-Atom (Position 2, 4, 5, 6, und 7) kam es zur Entdeckung von **75**, die eine 3,5-fache Steigerung ($IC_{50} = 14 \pm 2 \mu M$) des inversen Agonismus zeigte. Diese Entdeckung ermöglichte den Rückschluss, dass das Einführen von voluminöseren Resten, wie Brom (**76**, $IC_{50} = 8 \pm 1 \mu M$) oder Phenyl (**77**, $IC_{50} = 4 \pm 2 \mu M$) eine invers agonistische

4. Zusammenfassung und Ausblick

Potenz im unteren mikromolaren Bereich bewirkte. Besonders das Brom-Derivat (**76**) zeichnete sich durch eine hohe inverse agonistische Aktivität aus und überzeugte mit einer 7%igen Restaktivität von NOR-1 (Schema 24). **76** war zu dem imstande, die Interaktion von NOR-1 mit den Co-Regulatoren NCoR1 und SMRT mit einer vergleichbaren Potenz (NCoR1: $IC_{50} = 12 \pm 3 \mu M$, SMRT: $IC_{50} = 90 \pm 2 \mu M$) zu blockieren. Außerdem wurde ein Einfluss von **43** und **76** auf die von NOR-1 regulierten Genexpression beobachtet. Beide waren in der Lage als inverse Agonisten, das c-MYC Protoonkogen (MYC) in HeLa-Zellen zu induzieren, was mit Ergebnissen aus vorherigen Studien übereinstimmte, dass eine Expression von MYC durch eine konstitutive NOR-1 Aktivität unterdrückt werden kann^{202,203,204}.



Schema 24: Struktur von Verbindung **76** und **77**.

Insgesamt lieferten die Ergebnisse des Arzneistofffragment-Screenings und die anschließende Charakterisierung wertvolle Einblicke in die Entwicklung von neuen potenteren Liganden für die NR4A-Rezeptoren Nur77 und NOR-1. Die Identifizierung der Verbindungen **41** und **68** für Nur77 sowie **43** und **76** für NOR-1 können dazu beitragen, ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen hinter der Aktivierung von Nur77 und NOR-1 zu erlangen. Dies könnte einen vielversprechenden chemischen Ausgangspunkt für die Entwicklung von noch wirksameren und selektiveren Liganden bieten, die das Potenzial haben zu zukünftigen Wirkstoffen zu werden und zudem ein besseres Verständnis vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen zu erlangen.

Viele Jahre lang konzentrierte sich die Forschung zu PPAR γ -Liganden auf das Adressieren der orthosterischen Bindungstasche und die klassische PPAR-regulierte Gentranskription, die durch Bindung an diese Tasche moduliert werden kann. Obwohl die Existenz einer allosterischen Bindungstasche von PPAR γ seit mehreren Jahren bekannt ist, liegt der Fokus immer noch auf der Entwicklung von orthosterischen Liganden. Dies ist zum Teil auf die Schwierigkeit der Entdeckung von allosterischen Liganden im Vergleich zu orthosterischen Liganden zurückzuführen, da herkömmliche Methoden wie das Hochdurchsatz-Screening kaum geeignet sind, da

4. Zusammenfassung und Ausblick

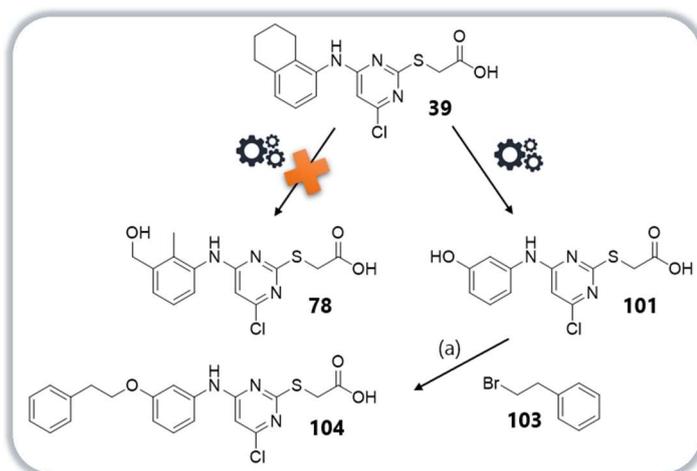
sie vornehmlich orthosterische Binder hervorbringen. Nichtsdestotrotz sind Publikationen vorhanden, die von allosterischen Liganden an PPAR γ berichten. Die bisher veröffentlichten Liganden zeigten bisher jedoch keine selektive Bindung in die allosterische Tasche, sondern entweder eine (zweiseitige) Bindung in beide Taschen oder eine Bindung, die sich von der orthosterischen in die allosterische Tasche erstreckte^{9,186,205,206}. Das zunehmende Interesse an der allosterischen Modulation rührt unter anderem von ihrem Potenzial für eine höhere Selektivität und eine feinere Kontrolle der Proteinaktivität in dieser Klasse her, um dadurch womöglich neuartige therapeutische Perspektiven zu erschließen²⁰⁷. Durch die Entdeckung der Bindung des Vitamin E Mimetikum Garcinolsäure (**37**, GA) an PPAR γ wurde außerdem ein natürlicher Ligand gefunden, der in der Lage ist, PPAR γ ortho- und allosterisch zu adressieren. Die Erforschung dieser zweiseitigen Modulation zeigte eine Abweichung gegenüber der orthosterischen Modulation durch klassische Agonisten wie Pioglitazon (**33**) und lieferte durch den direkten Vergleich erste Hinweise auf den Einfluss und das Potenzial, die die allosterische Modulation bewirken könnte¹⁸⁴.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher einen selektiven allosterischen PPAR γ Liganden zu synthetisieren und mit diesem die allosterische Modulation von PPAR γ zu charakterisieren. Aufgrund seiner komplexen biologischen Effekte und seiner geringen synthetischen Zugänglichkeit konnte **37** nicht als Ausgangspunkt für dieses Vorhaben dienen. Um eine geeignete Ausgangsverbindung zu finden, erfolgte die Durchführung eines *in vitro* Screening mit einer hauseigenen Sammlung von synthetisierten PPAR γ -Modulatoren mittels Gal4-Hybrid-Assay, bei dem die orthosterische Bindungsstelle von PPAR γ durch den irreversiblen Antagonisten GW9662 (**36**) blockiert wurde. Dieses Screening führte zur Identifizierung von **39** (Schema 25), das obgleich der Bindung von **36** an die orthosterische Bindungsstelle eine Aktivierung von PPAR γ verursachte ($EC_{50} = 2,1 \pm 0,2 \mu M$), was auf einen möglichen allosterischen Mechanismus hindeutete. Darüber hinaus wies **39** im Vergleich zu **37** günstige Eigenschaften und eine bessere synthetische Zugänglichkeit auf. Die Co-Kristallisation von **39** mit der PPAR γ -LBD bestätigte, dass **39** genauso wie **37** in der Lage war an die ortho- und allosterische Bindungstasche von PPAR γ zu binden. Durch die genaue Analyse der Kristallstruktur insbesondere der beiden Bindungstaschen, offenbarte sich, dass die orthosterische Bindungstasche nach der Bindung von **39** nur begrenzten Raum für eine räumliche Molekülerweiterung bot. Die allosterische Bindungstasche hingegen war im Bereich der 5- und 6-Position des Tetrahydronaphthalin Lösungsmittellexpониert, was eine Ausdehnung des Moleküls in diese Richtung ermöglichte. Mit der Hypothese,

4. Zusammenfassung und Ausblick

dass eine Verlängerung der Molekülstruktur von **39** die Bindung in die orthosterische Bindungstasche verhindern würde, wurde mit **39** als Vorlage Verbindung **78** als Ausgangspunkt designt. **78** lieferte im Bereich des Benzylalkohols eine Möglichkeit einer Molekülverlängerung in Form eines Linkers. Die Synthese von **78** verlief über eine nukleophile aromatische Substitution (S_NAr) mit Chloropyrimidin (**82**) und (3-Amino-2-methylphenyl)methanol (**83**). Für die Molekülerweiterung wurde ein 4-(2-Chloroethyl)morpholin-Linker (**84**), der durch eine Williamson-Ether-Synthese mit **78** verbunden werden sollte, ausgewählt.

Die Synthese stellte sich als komplex heraus und zeichnete sich durch eine zahlreiche Variation der Edukte, Veränderung der Reaktionsbedingungen, Steigerung der Reaktivität sowie Umstellung der Synthesereihenfolge aus. Schlussendlich führten die Anpassungen und Herausforderungen zu einem veränderten Startmolekül (**101**), dass die Variation von verschiedenen Linkern mittels Williamson-Ether-Synthese ermöglichte und Verbindung **104** lieferte (Schema 25).



Schema 25: Modifizierungsversuche von **39** und Ausschnitt aus der Synthese von **104**. Reagenzien und Bedingungen: (a) K_2CO_3 , KI, DMF, 80 °C, 23 Std., 47%.

ermöglichte und Verbindung **104** lieferte (Schema 25).

Durch die nachfolgende Testung der Eignung von **104** mittels molekularem Docking konnte die zuvor aufgestellte Hypothese bestätigt und die allosterische Bindungstasche als wahrscheinlichsten Bindungsmodus von **104** identifiziert werden. Die Charakterisierung des neu synthetisierten potenziellen allosterischen Liganden **104** erfolgte daraufhin in zellulären und nicht-zellulären Experimenten.

In einem Gal4-Hybrid-Reporterassay (HEK293T-Zellen) wurde festgestellt, dass **104** allein nur eine schwache Aktivierung von $PPAR\gamma$ zeigte. Allerdings war **104** nicht in der Lage, die Aktivität des orthosterischen Agonisten Pioglitazon (**33**) in einer dosisabhängigen Weise zu steigern. Außerdem induzierte **104** die Transkriptionsaktivität über das menschliche $PPAR$ -Response-Element (PPRE) und verstärkte die PPRE-Aktivierung durch **33**. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass trotz der Bindung von **104** eine Bindung von **33** in die orthosterische Bindungstasche immer noch möglich war. In Ergänzung zu diesem Experiment wurde die Fähigkeit von **104** untersucht, die $PPAR\gamma$ -Phosphorylierung von Ser273 in HEK293T-Zellen zu

4. Zusammenfassung und Ausblick

blockieren. Dieser Effekt kann bei klassischen Thiazolidindione (TZD), wie Rosiglitazon (**32**) oder Pioglitazon (**33**), beobachtet werden und steht mit der antidiabetischen Aktivität in Zusammenhang²¹⁴. Es stellte sich jedoch heraus, dass **104** nicht imstande war diese Phosphorylierung zu blockieren, was darauf schließen lässt, dass eine alleinige Bindung von **104** in die allosterische Bindungstasche zur Auslösung des Effekts nicht ausreichte. Daneben zeigte **104** keine zytotoxische Aktivität in COS7-Zellen und keine agonistischen noch antagonistischen Effekte auf eine Vielzahl von im Gal4-Assay getesteten NRs, insbesondere nicht auf anderen Mitgliedern der PPAR-Familie (NR1C1, NR1C2).

Zusätzlich zu den vielversprechenden zellulären Untersuchungen mussten die Ergebnisse ebenfalls im zellfreien System reproduziert werden. Die Untersuchung mittels differentieller Scanning Fluorometrie (DSF) demonstrierten, dass **104** allein keine Auswirkung auf die Schmelztemperatur des PPAR γ -Proteins hatte. Jedoch war eine additive thermische Stabilisierung der PPAR γ -LBD bei der Kombination von **104** mit **33** zu sehen.

Dies lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass **104** sowohl die allosterische Bindungsstelle besetzte sowie zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Proteins beitrug. Der eindeutige Beweis für die selektive allosterische Bindung von **104**

konnte durch die Co-Kristallisation von **104** mit der PPAR γ -LBD generiert werden. Die Analyse der Kristallstruktur offenbarte eine selektive Bindung von **104** in die allosterische Bindungstasche von PPAR γ (Abbildung 24).

Obwohl die Aktivierungsfunktion (AF-2) im PPAR γ -**104**-Komplex keine direkte Bindung mit **104** aufwies, konnte festgestellt werden, dass dennoch eine aktive Konformation der PPAR γ -LBD induziert wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Ω -Schleife sein, die zu einer Stabilisierung der PPAR γ -LBD und einer anderen Konformation von H4 und H5 führte. Bei dem Vergleich des Bindungsmodus von **104** mit Bindungsmodi von anderen bekannten Liganden, wie

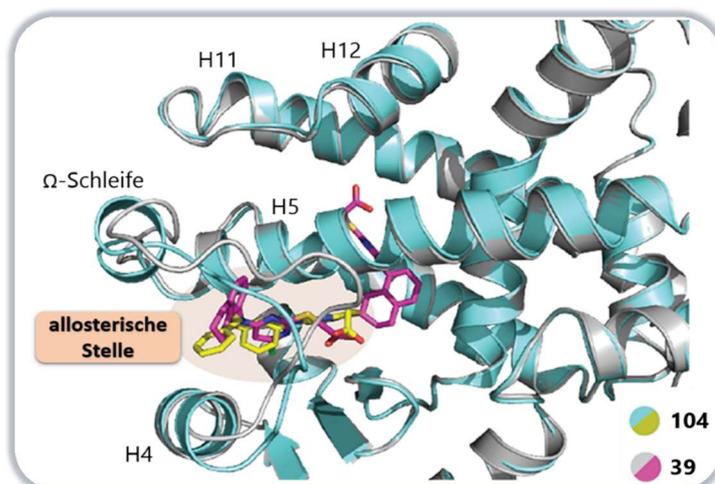


Abbildung 24: Die Co-Kristallstruktur von PPAR γ -LBD im Komplex mit **39** (magenta, PDB: 8ATY¹⁹¹) und **104** (gelb, PDB: 8ATZ¹⁹¹). Die Überlagerung von **104** und **39** zeigte eine ähnliche aktive Konformation, aber eine selektive Bindung von **104** an die allosterische Bindungsstelle.

4. Zusammenfassung und Ausblick

MRL-871 (**1**) und BVT.13 (**38**), fiel auf, dass diese Liganden unterschiedliche Proteinkonformationen induzierten und dadurch unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivierung des Rezeptors bewirkten. Bei der Betrachtung der gebundenen Zustände von **1**, Pirinixinsäure (**31**), **37**, **38**, **39** und **104** mit der PPAR γ -LBD zeigten sich unterschiedliche strukturelle Änderungen, insbesondere in Bezug auf die Konformation der Helix 12 (Abbildung 26). Die Bindung von **1**

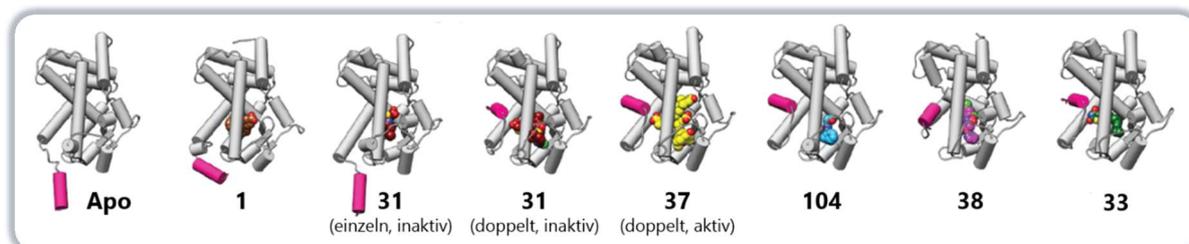


Abbildung 26: Vergleich der PPAR γ -LBD Strukturen im Komplex mit verschiedenen allosterischen und orthosterischen Liganden zeigte Unterschiede in der LBD-Konformation. Zum Vergleich der inaktiven und aktiven Form sind die inaktive Apostruktur und der Pioglitazon (**33**)-Komplex mit der PPAR γ -LBD abgebildet¹⁹¹.

und die Einzelbindung von **31** waren nicht in der Lage die aktive Konformation von H12 zu stabilisieren. Nur die gleichzeitige Bindung von **31** oder GA (**37**) an die ortho- und allosterische Bindungsstelle beziehungsweise die Bindung von **104** an die allosterische Bindungsstelle allein induzierte und stabilisierte die aktive Konformation der PPAR γ -LBD, während die anderen allosterischen Liganden lediglich zu einer Stabilisierung der H12 führten. Zusätzlich wurde durch einen strukturellen Vergleich der Bindungsmodi der zuvor erwähnten Verbindungen der außergewöhnliche Bindungsmodus von **104** offenbart. **104** besetzte im Vergleich zu den anderen Liganden nur die allosterische Bindungstasche, ohne Überlappung in die orthosterische Bindungstasche.

Für die weitere Untersuchung der Bindung von **104**, wurden Bindungsstudien in Lösung in An- und Abwesenheit eines orthosterischen Liganden unter Verwendung von ITC und Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Die ITC-Untersuchung zeigte eine 1:1 Stöchiometrie für die Bindung von **104** an das PPAR γ -LBD-Protein. Auch die vorherige Behandlung der PPAR γ -LBD mit dem kovalenten Antagonisten GW9662 (**36**) änderte die Bindungsstöchiometrie nicht. Außerdem zeigte ein MS-basierter-PPAR γ -Ligandenbindungs-Assay eine dosisabhängige Interaktion von **104** mit dem PPAR γ -LBD-Protein, die unabhängig von der An- oder Abwesenheit des orthosterischen Agonisten Pioglitazon (**33**) war. Die Ergebnisse aus beiden Experimenten bestätigten, dass eine Bindung von orthosterischen (**33**, **36**) und allosterischen Liganden (**104**) ohne Konkurrenz möglich war sowie die Anwesenheit von **104** die Bindung von **33** nicht beeinflusste, so dass **104** die Bindung eines orthosterischen Agonisten ermöglichte.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Auch die molekularen Effekte der allosterischen Bindung von **104** auf die PPAR γ -Aktivität wurden umfassend studiert. Hierfür erfolgte der Vergleich des Einflusses von Pioglitazon (**33**), GW9662 (**36**) und **104** auf die Rekrutierung von Co-Regulatoren an die PPAR γ -LBD mittels zeitaufgelösten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer(HTRF)-Assay. Im Gegensatz zu herkömmlichen Agonisten demonstrierte **104** abweichende molekulare Effekte (Abbildung 31).

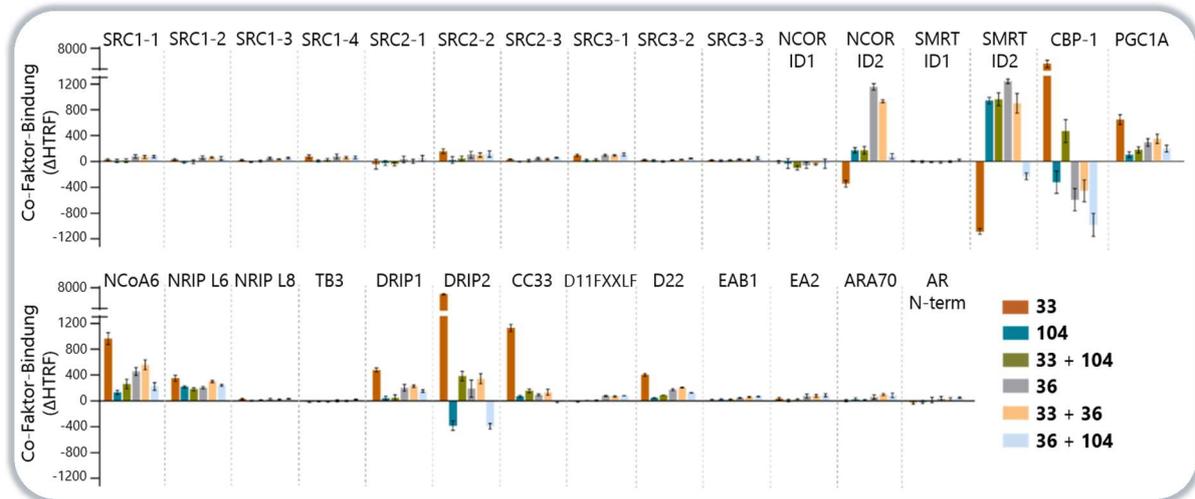


Abbildung 31: Pioglitazon (**33**, 3 μ M), GW9662 (**36**, 10 μ M) und **104** (30 μ M) verursachten unterschiedliche Auswirkungen auf die Rekrutierung von Co-Regulatoren durch PPAR γ ¹⁹¹.

Pioglitazon (**33**) induzierte die Bindung von Co-Regulatoren wie CBP-1, PGC-1 α , NCoA6 und DRIP2 an die PPAR γ -LBD und verdrängte SMRT und NCOR. Dagegen verstärkte der Antagonist GW9662 (**36**) die Bindung von SMRT und NCOR und verdrängte CBP-1. **104** zeigte eine schwächere Rekrutierung von PGC-1 α und NCoA6, war aber fähig CBP-1 und DRIP2 zu verdrängen und die Bindung von SMRT und NCOR zu verstärken. Zudem konnte **104** die Heterodimerisierung von PPAR γ mit RXR α verringern und die Stabilisierung des Heterodimers, durch **33**, aufheben.

Da es sich bei **104** gemäß dieser umfassenden Charakterisierung um einen selektiven allosterischen Liganden handelte, bot es sich an mit diesem die biologischen Effekte dieser selektiven Bindung zu betrachten. Hierfür wurde die Wirkung von **104** auf die Differenzierung von adipozytären Stammzellen untersucht. Es stellte sich heraus, dass **104** im Gegensatz zu **33** keine Adipogenese induzierte und sogar die von **33** induzierte Adipogenese leicht verringerte, obwohl dieser Prozess normalerweise durch PPAR γ reguliert wird. Dieses Experiment zeigte somit, dass die allosterische Bindung von **104** keine klassisches, pro-adipogenes PPAR γ -Signaling auslöste.

Für ein noch besseres Verständnis der Wirkungsweise von **104** wurde die nicht-kanonische PPAR γ -Modulation betrachtet. Dies geschah durch die Untersuchung des Einflusses von **104**

4. Zusammenfassung und Ausblick

auf die Genexpression in Hepatozyten (HepG2) mittels RNA-Sequenzierung. Die Sequenzierung lieferte 1750 Gene, deren Expression **104** signifikant veränderte. Zudem bewirkte **104** keine Induktion der kanonischen PPAR γ -Signalgebung, im Gegensatz zu Pioglitazon (**33**) und GA (**37**). **104** verursachte lediglich eine Runterregulierung mehrerer PPAR γ -regulierter Gene, die an der Adipogenese, dem Fettstoffwechsel und -transport beteiligt sind. Weitergehende Untersuchungen präsentierten, dass **104** eine Herunterregulierung von FOXO3 und Aktivatoren der FOXO-Signalübertragung verursachte. **33** hingegen veränderte die FOXO-Signalgebung nicht¹⁸⁴. Dies könnte darauf hindeuten, dass die PPAR γ -Modulation von **104** auf die allosterische Bindungsstelle zurückzuführen ist. Zudem bewirkte die Behandlung mit **104** eine Herunterregulierung von Genen, die in Verbindung zur Lipogenese, der TOR-Signalgebung, der Zellzyklusprogression, Apoptose und ATP-Erzeugung stehen. Wenn die Effekte durch **104** im gesamten betrachtet werden, deutet dies auf eine verringerte Stoffwechselaktivität und den Eintritt der Zellen in einen Ruhezustand hin. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die verringerte FOXO-Aktivität liefern. Aus diesem Grund wurde die beobachtete unterdrückende Wirkung von **104** auf FOXO in einem orthogonalen Zellexperiment (HEK293T) betrachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit **104** zu einer Förderung der Phosphorylierung von FOXO3a an Ser253 führte, welche den Export von FOXO aus dem Zellkern förderte²³³. Zudem ergaben Transkriptionsaktivitätsmessungen, dass **104** die Transkriptionsaktivität von FOXO verringerte, während Pioglitazon (**33**) diese erhöhte.

Zusammenfassend lieferte diese Forschungsarbeit neue Erkenntnisse über die allosterische Modulation des PPAR γ -Rezeptors durch den neuen allosterischen Liganden **104**. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit verdeutlichen die Bedeutung von allosterischen Liganden und gezielter allosterische Modulation von NRs, die intensiviert Forschung bedürfen. Mit **104** wurde eine Verbindung entwickelt, die die Möglichkeit für die Identifizierung und Entwicklung von neuen allosterischen Liganden bietet. Dies ist zum Beispiel durch ein MS-basierten-Ligandenbindungs-Screening (wie unter Kapitel 3.2.4.4 MS-basierter-PPAR γ -Ligandenbindungs-Assay) mit **104** und Pioglitazon (**33**) möglich. Dabei kann das Protein entweder nur mit der zu screenenden Verbindung behandelt oder zusätzlich mit **33** oder **104** inkubiert werden. Dadurch, dass **33** die orthosterische und **104** die allosterische Bindungstasche blockiert, dienen **33** und **104** als Reporterliganden, um die jeweilige Bindungstasche eines neuen Liganden festzustellen. Dies erlaubt somit eine schnellere Identifizierung von allosterischen Liganden. Interessant wären insbesondere Verbindungen, die sich von **104** ableiten und sich durch eine bessere Affinität

4. Zusammenfassung und Ausblick

und Stabilität auszeichnen. Darüber hinaus bietet die Hemmung der FOXO-Signalübertragung durch **104** ein äußerst interessantes Forschungspotential. Diese Aktivität birgt möglicherweise einen therapeutischen Wert, da ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von FOXO und verschiedenen pathologischen Zuständen besteht. Eine gezielte Herunterregulierung dieses Signalwegs könnte beispielsweise eine positive neuroprotektive Wirkung haben, wie sie durch eine verstärkte Neurogenese nach FOXO-Hemmung *in vivo* beobachtet wurde^{235,236}. **104** ist somit ein innovatives und vielfältig einsetzbares Werkzeug zur Erforschung der allosterischen Modulation von PPAR γ , dessen Geschichte an diesem Punkt noch nicht zu Ende ist.

5. Experimenteller Teil

5.1 Chemisch-synthetischer Teil

Alle **Lösungsmittel und Chemikalien** wurden kommerziell erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Bei Bedarf wurde Argon als Inertgas verwendet.

Für die Durchführung von **Dünnschichtchromatographien** wurden DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Diese sind mit einer 20 mm dicken Schicht Kieselgel 60 und einem Fluoreszenzindikator U₂₅₄ beschichtet. Die Visualisierung der Chromatogramme erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder durch Fluoreszenz bei 366 nm.

Die Aufreinigung mittels **Säulenchromatographie** erfolgte durch Kieselgel 60 (Macherey Nagel, Düren, Deutschland), mit einer Korngröße von 0,04 – 0,063 mm. Als mobile Phase wurden technische Lösungsmittel verwendet.

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden mittels **Kernresonanzspektroskopie** (NMR) an den Spektrometern von Bruker AVANCE DPX250 (Billerica, MA, USA, 250 MHz), Bruker AVANCE 300 (300 MHz), Bruker AVANCE 400er (400 MHz) und Bruker AVANCE 500 (500 MHz) aufgenommen. Die Angabe der chemischen Verschiebung (δ) erfolgte in *parts per million* (ppm) und bezieht sich auf den internen Standard Tetramethylsilan (TMS), der als Signalkalibrierung diente. Die Einheit der dazugehörigen Kopplungskonstante *J* wurde in Hz angegeben. Die Signalaufspaltungen werden für Singulettts als s, für Dublettts als d, für Tripletts als t, für Quartettts als q und für Multipletts als m angegeben.

Die **Massenspektrometrie** (MS) in Form von Elektrospray-Ionisierung (ESI) wurde an einem Surveyor MSQ Gerät (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Probe wurde hierbei mithilfe einer Pumpe (Flussrate: 300 μ L/Min, Lösungsmittel: Methanol/Wasser/Ameisensäure, 50:50:0,1) injiziert. Zur Durchführung von DC-MS-Messungen wurde ein Camag TLC-MS Interface 2 (CAMAG Chemie-Erzeugnisse & Absorptionstechnik, Berlin, Deutschland) zwischengeschaltet. Die Aufnahme von hochauflösenden Massenspektren erfolgte an einem MALDI LTQ ORBITRAP XL Instrument (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Die Reinheitsbestimmung der synthetisierten Verbindungen erfolgte durch **HPLC**-Messungen. Die hierfür verwendete Waters 600 Controller HPLC-Anlage (Waters, Milford, MA, USA), beinhaltete einen Waters 2487 dualen Absorptionsdetektor, einen Waters 717 Plus Autosampler und eine MultoHigh 100 RP18-5 μ m, 240x4 mm Säule (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Als

5. Experimenteller Teil

mobile Phase wurde ein Gradient, der sich aus Lösungsmittel A (Methanol mit 0,1% Ameisensäure) und Lösungsmittel B (Wasser für HPLC-Zwecke mit 0,1% Ameisensäure) zusammensetzte, verwendet. Der Gradient startete bei einer Zusammensetzung von Lösungsmittel A/B im Verhältnis 40:60 für fünf Minuten, dann binnen 20 Minuten wurde Lösungsmittel A auf 100% erhöht und die letzten 20 Minuten konstant gehalten. Die Detektion erfolgte mittels eines UV-Detektors bei Wellenlängen von 254 und 280 nm. Alle synthetisierten Verbindungen, mit Ausnahme von Zwischenstufen, hatten eine Reinheit von > 95%.

5.1.1 Synthese und analytische Daten von Derivaten für Nur77

Generelle Vorgehensweise für die Acetylierung von *N*-Phenylpiperazinen

Triethylamin (TEA, 1,0 äq) wurde zu einer Lösung des Piperazinderivats (1,0 äq) in 10 mL Dichlormethan ($c = 0,5 \text{ M}$) hinzugefügt. Anschließend wurden Natriumacetat (1,1 äq) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC-HCl, 1,2 äq) hinzugefügt und die Mischung bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Danach wurde Ethylacetat (10 mL) hinzugefügt, die Mischung dreimal mit Wasser (10 mL) gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat (Na_2SO_4) getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie mittels Kieselgels mit *n*-Hexan/Ethylacetat (9:1) als mobile Phase isoliert.

1-(4-(4-Methoxyphenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on (47): Durchführung nach der generellen Vorgehensweise mit der Verwendung von **53** (106 mg, 551 μmol , 1,00 äq). Ausbeute: 56%. Beiger Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 6,96\text{--}6,93$ (m, 2H), 6,86–6,83 (m, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,71 3,69 (m, 2H), 3,66–3,64 (m, 2H), 3,05–3,03 (m, 2H), 3,00–2,98 (m, 2H), 2,13 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 171,61, 156,03, 146,64, 120,18, 115,46, 55,92, 52,46, 52,01, 47,56, 42,79, 21,13$ ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 235,14 für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), gefunden 235,15.

HRMS (MALDI): m/z berechnet 235,13963 für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$, gefunden 235,13953 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

5. Experimenteller Teil

1-(4-(4-Nitrophenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on (49): Durchführung nach der generellen Vorgehensweise mit der Verwendung von **55** (105 mg, 505 μmol , 1,00 äq). Ausbeute: 44%. Gelber Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 8,08–8,06 (m, 2H), 7,02–7,00 (m, 2H), 3,61–3,58 (m, 4H), 3,55–3,53 (m, 2H), 3,48–3,46 (m, 2H), 2,04 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 168,53, 154,37, 136,94, 125,72, 112,51, 46,96, 44,72, 21,19 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 250,11 für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$ ([M+H]⁺), gefunden 250,08.

HRMS (MALDI): m/z berechnet 250,11862 für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$, gefunden 250,11862 ([M+H]⁺).

1-(4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-on (50): Durchführung nach der generellen Vorgehensweise mit der Verwendung von **56** (106 mg, 538 μmol , 1,00 äq). Ausbeute: 43%. Beiger Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4): δ = 7,22–7,20 (m, 2H), 6,95–6,93 (m, 2H), 3,72–3,70 (m, 2H), 3,67–3,65 (m, 2H), 3,18–3,16 (m, 2H), 3,12–3,10 (m, 2H), 2,13 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4): δ = 171,65, 151,23, 129,98, 129,94, 126,09, 119,02, 50,60, 50,19, 47,27, 42,55, 21,12 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 239,09 für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}$ ([M+H]⁺), gefunden 239,24.

HRMS (MALDI): m/z berechnet 239,09457 für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}$, gefunden 239,09467 ([M+H]⁺).

1-[4-(2-Fluorophenyl)piperazin-1-yl]ethan-1-on (51): Durchführung nach der generellen Vorgehensweise mit der Verwendung von **57** (102 mg, 567 μmol , 1,00 äq). Ausbeute: 37%. Braunes Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4): δ = 7,11–6,96 (m, 4H), 3,73–3,71 (m, 2H), 3,68–3,66 (m, 2H), 3,08–3,06 (m, 2H), 3,02–3,00 (m, 2H), 2,13 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4): δ = 171,68, 158,15, 156,20, 141,01, 140,94, 125,81, 125,78, 124,39, 124,32, 120,65, 120,63, 117,10, 116,94, 52,06, 52,03, 51,55, 51,52, 21,14 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 223,12 für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{FN}_2\text{O}$ ([M+H]⁺), gefunden 223,06.

HRMS (MALDI): m/z berechnet 223,12412 für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{FN}_2\text{O}$, gefunden 223,12416 ([M + H]⁺).

5. Experimenteller Teil

5.1.2 Synthese und analytische Daten des allosterischen PPAR γ -Ligand

Ethyl-2-((4-chloro-6-((3-(hydroxymethyl)-2-methylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetat (78): (3-Amino-2-methylphenyl)methanol (**83**, 71,0 mg, 515 μ mol, 1,00 äq), Ethyl-2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetat (**82**, 138 mg, 515 μ mol, 1,00 äq) und Natriumcarbonat (164 mg, 1,55 mmol, 3,00 äq) wurden in 4 mL Dimethylformamid ($c = 0,05$ M) gelöst und vier Stunden bei 120 °C gerührt. Danach wurde Wasser (10 mL) hinzugefügt und die Mischung dreimal mit Ethylacetat (10 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat (Na_2SO_4) getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Anschließend wurde eine Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat 3:2) durchgeführt, um **78** (20%) als beigen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 7,58-7,55$ (m, 1H), 7,47-7,41 (m, 1H), 7,37-7,34 (m, 1H), 6,15 (s, 1H), 4,94 (s, 2H), 4,40 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,04 (s, 2H), 2,39 (s, 3H), 1,50-1,45 (m, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 170,43, 169,57, 162,76, 160,18, 140,93, 135,35, 133,11, 127,25, 126,94, 126,19, 98,03, 63,56, 61,86, 33,65, 14,27, 13,23$ ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 390,08 für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), gefunden 390,01.

tert-Butyl-(3-(hydroxymethyl)phenyl)carbamat (90): (3-Aminophenyl)methanol (**89**, 31,6 mg, 257 μ mol, 1,00 äq) und Natriumhydrogencarbonat (21,6 mg, 257 μ mol, 1,00 äq) wurden eingewogen und in einem Tetrahydrofuran(THF)/Methanol-Gemisch (7:3, $c = 0,03$ M) gelöst und die Reaktionsmischung fünf Minuten gerührt. Währenddessen wurde Di-*tert*-butyldicarbonat (56,0 mg, 257 μ mol, 1,00 äq) in THF ($c = 0,09$ M) gelöst und langsam der Reaktionsmischung hinzugefügt und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft, der Rückstand in Dichlormethan (10 mL) gelöst und dreimal mit Wasser (10 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel erneut im Vakuum verdampft. Die nachfolgende Aufreinigung erfolgt durch eine Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat 2:1), um **90** (95%) als weißen kristallinen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 7,13-7,11$ (m, 2H), 6,90-6,86 (m, 1H), 6,59 (s, 1H), 4,49 (s, 2H), 2,44 (s, 1H), 1,39 (s, 9 H) ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 246,12 für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), gefunden 246,17.

5. Experimenteller Teil

4-(2-(3-Nitrophenoxy)ethyl)morpholin (93): 3-Nitrophenol (**91**, 50,6 mg, 364 μmol , 1,00 äq) und Triphenylphosphin (95,4 mg, 364 μmol , 1,00 äq) wurden in 7 mL THF ($c = 0,05 \text{ M}$) gelöst und 4-(2-Hydroxy)morpholin (**92**, 44,0 μL , 364 μmol , 1,00 äq) hinzugefügt. Anschließend wurde Diisopropylazodicarboxylat (DIAD, 71,6 μL , 364 μmol , 1,00 äq) langsam hinzugegeben und die Reaktionsmischung eine Stunde gerührt. Danach wurde die organische Phase dreimal mit Wasser (10 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Als weiterer Aufreinigungsschritt wurde eine Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Aceton+TEA 3:1+2%) durchgeführt, um **93** (96%) als beigen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 7,67\text{-}7,63$ (m, 1H), $7,60\text{-}7,58$ (m, 1H), $7,29$ (t, $J = 8,3 \text{ Hz}$, 1H), $7,13\text{-}7,09$ (m, 1H), $4,08\text{-}4,03$ (m, 2H), $3,61\text{-}3,58$ (m, 4H), $2,73\text{-}2,68$ (m, 2H), $2,51\text{-}2,44$ (m, 4H) ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 253,11 für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), gefunden 253,18.

3-(2-Morpholinoethoxy)anilin (94): 4-(2-(3-Nitrophenoxy)ethyl)morpholin (**93**, 53,6 mg, 212 μmol , 1,00 äq) wurde in 40 mL Ethylacetat ($c = 0,01 \text{ M}$) gelöst, Palladium (10%) auf Aktivkohle (22,6 mg, 212 μmol , 0,10 äq) hinzugefügt und anschließend vier Stunden bei Raumtemperatur und unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wurde danach durch Celite filtriert und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Verdampfung des Lösungsmittels im Vakuum führte zu **94** als beiger Feststoff (88%).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 7,01$ (t, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H), $6,31\text{-}6,26$ (m, 2H), $6,24\text{-}6,20$ (m, 1H), $4,06\text{-}4,01$ (m, 2H), $3,72\text{-}3,70$ (m, 4H), $3,64$ (s, 2H), $2,77\text{-}2,72$ (m, 2H), $2,59\text{-}2,52$ (m, 4H) ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 223,14 für $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), gefunden 223,21.

3-Nitrophenylacetat (96): 3-Nitrophenol (**91**, 1,01 g, 7,28 mmol, 1,00 äq) und Natriumacetat (0,712 g, 8,68 mmol, 1,20 äq) wurden in 10 mL Essigsäureanhydrid ($c = 0,73 \text{ M}$) fünf Stunden refluxiert. Danach wurde dreimal mit Ethylacetat (10 mL) gewaschen, die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und **96** (86%) als braune Flüssigkeit erhalten, die über Nacht auskristallisierte.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform-*d*): $\delta = 8,13\text{-}8,08$ (m, 1H), $8,00\text{-}7,98$ (m, 1H), $7,56$ (t, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H), $7,47\text{-}7,42$ (m, 1H), $2,34$ (s, 3H) ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 204,04 für $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_4\text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 204,08 gefunden.

5. Experimenteller Teil

3-Aminophenylacetat (97): 3-Nitrophenylacetat (**96**, 1,19 g, 6,58 mmol, 1,00 äq) wurde in 200 mL Ethylacetat ($c = 0,03$ M) gelöst, Palladium (10%) auf Aktivkohle (70,0 mg, 658 μmol , 0,10 äq) hinzugefügt und anschließend fünf Stunden bei Raumtemperatur in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wurde danach durch Celite filtriert und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Verdampfung des Lösungsmittels im Vakuum führte zu **97** (96%) als braune Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform- d_3): $\delta = 7,12$ (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,53-6,49 (m, 1H), 6,48-6,44 (m, 1H), 6,40-6,38 (m, 1H), 3,76 (s, 2H), 2,26 (s, 3H) ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 152,06 für $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 152,04 gefunden.

3-Nitroanisol (98): Dimethylformamid (DMF, 15 mL, $c = 0,30$ M) wurde zu 3-Nitrophenol (**91**, 642 mg, 4,61 mmol, 1,00 äq) und Natriumhydrid (111 mg, 4,61 mmol, 1,00 äq) bei 0 °C hinzugefügt. Anschließend wurde Methyljodid (315 μL , 5,07 mmol, 1,10 äq) tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Nach 24 Stunden wurde Wasser (10 mL) hinzugefügt und die Mischung dreimal mit Ethylacetat (10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Als weiterer Aufreinigungsschritt wurde eine Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Ethylacetat 9:1) durchgeführt, um **98** (82%) als farblosen Feststoff zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 7,78$ -7,74 (m, 1H), 7,68-7,67 (m, 1H), 7,46 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,30-7,26 (m, 1H), 3,86 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 160,34$, 129,91, 120,54, 115,03, 107,94, 55,01 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 154,04 für ${}^7\text{H}_8\text{NO}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), kein Molekülion gefunden.

***m*-Anisidin (99):** 3-Nitroanisol (**98**, 1,21 g, 7,89 mmol, 1,00 äq) wurde in 100 mL Ethylacetat ($c = 0,08$ M) gelöst, Palladium (10%) auf Aktivkohle (84,0 mg, 789 μmol , 0,10 äq) hinzugefügt und anschließend 15 Stunden bei Raumtemperatur und unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wurde danach durch Celite filtriert und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Verdampfung des Lösungsmittels im Vakuum führte zu **99** als braunes Öl (92%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 6,89$ (t, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,16-6,13 (m, 2H), 6,09-6,05 (m, 1H), 5,01 (s, 2H), 3,64 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 160,27$, 149,98, 129,54, 106,86, 101,47, 99,44, 55,54 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 124,07 für $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NO}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), gefunden 124,06.

Ethyl-2-((4-chloro-6-((3-methoxyphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetat (100):

Ethyl-2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetat (**82**, 256 mg, 957 μmol , 1,00 äq) wurde in einer Mischung von DMF (10 mL, $c = 0,1 \text{ M}$) und Diisopropylethylamin (157 μL , 1,14 mmol, 1,19 äq) gelöst, *m*-Anisidin (**99**, 118 mg, 957 μmol , 1,00 äq) hinzugefügt und die Lösung für 20 Stunden bei 120 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Ethylacetat (30 mL) hinzugefügt, die Mischung dreimal mit Wasser (30 mL) gewaschen, die vereinten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der nächste Aufreinigungsschritt erfolgte durch eine Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Aceton 8:1), um **100** als braunes Öl (63%) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 7,23$ (t, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H), 7,17-7,16 (m, 1H), 7,09-7,05 (m, 1H), 6,71-6,67 (m, 1H), 6,43 (s, 1H), 4,11 (q, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,01 (s, 3H), 1,20 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 170,53$, 169,64, 161,13, 160,29, 158,21, 139,63, 129,27, 113,15, 109,2, 106,77, 100,29, 61,35, 54,39, 32,66, 12,99 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 376,06 für $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), gefunden 375,99.

2-((4-Chloro-6-((3-hydroxyphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)essigsäure (101):

Ethyl-2-((4-chloro-6-((3-methoxyphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetat (**100**, 212 mg, 599 μmol , 1,00 äq) wurde in Dichlormethan (7 mL, 0,09 M) gelöst, Bortribromid (115 μL , 1,20 mmol, 2,00 äq) tropfenweise hinzugegeben und die Mischung 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde Wasser (10 mL) hinzugefügt und die Mischung dreimal mit Ethylacetat (10 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Der nächste Aufreinigungsschritt erfolgte durch eine Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Aceton 3:2), um **101** als beigen Feststoff (81%) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 7,14$ (t, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 1H), 7,01-6,98 (m, 2H), 6,57-6,53 (m, 1H), 6,41 (s, 1H), 3,95 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 171,5$, 170,6, 161,2, 158,2, 157,7, 139,5, 129,4, 112,3, 110,9, 107,95, 99,9, 32,7 ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 312,01 für $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), gefunden 312,08.

2-((4-Chloro-6-((3-phenethoxyphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)thio)essigsäure (104): 2-((4-Chloro-6-((3-hydroxyphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)essigsäure (**101**, 42,4 mg, 136 μmol , 1,00 äq) und Kaliumcarbonat (56,3 mg, 407 μmol , 2,99 äq) wurde in DMF (10 mL, $c = 0,01$ M) gelöst und 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde 2-Bromoethylbenzen (**103**, 18,5 μL , 136 μmol , 1,00 äq) langsam hinzugegeben und die Mischung 27 Stunden bei 80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Ethylacetat (10 mL) hinzugefügt und die Mischung dreimal mit Wasser (10 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Die weitere Aufreinigung wurde mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan/Aceton 2:1) durchgeführt und **104** als beiges Öl (47%) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 7,22\text{-}7,19$ (m, 2H), 7,15-7,14 (m, 3H), 7,11 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,01-7,00 (m, 1H), 6,93-6,91 (m, 1H), 6,58-6,56 (m, 1H), 6,37 (s, 1H), 4,23 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,92 (s, 2H), 2,85 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 171,75, 171,08, 162,47, 159,48, 159,05, 140,81, 139,15, 130,70, 129,87, 129,38, 127,41, 113,62, 112,25, 109,46, 101,49, 67,35, 35,77, 33,98$ ppm.

MS (ESI⁺): m/z berechnet 438,08 für $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{SNa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), gefunden 438,50.

HRMS (MALDI): m/z berechnet 416,08302 für $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$, gefunden 416,08310 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

5.2 PPAR γ -LBD-Expression, Aufreinigung und Kristallisation

❖ Die rekombinante Herstellung der PPAR γ -LBD und die Kristallstrukturanalysen erfolgten durch **Dr. Apirat Chaikuad**.

Der Ligand (4 mM, ~10-facher Überschuss) wurde der rekombinanten PPAR γ -LBD (13 mg/mL, hergestellt wie zuvor beschrieben¹⁹¹) vor der Kristallisation mittels einer Dampfdiffusions-Methode (*vapour diffusion*) bei 20 °C und den in Tabelle 15 aufgelisteten Bedingungen hinzugefügt. Bei dieser Methode kommt es zu einem kontinuierlichen Ausgleich zwischen dem Konzentrationsgradienten, der sich zwischen dem „sitzenden Tropfen“ (*sitting drop*) des Protein-**104**-Gemisches und einer **104**-Reagenzienlösung befindet, wobei dieser Ausgleich so lange abläuft, bis es zu einer Kristallisation kommt.

Die Struktur wurde an der Swiss Light Source (Paul-Scherrer-Institut, Villigen, Schweiz) vermessen. Die Auswertung erfolgte mit XDS5²³⁷ und aimless6²³⁸, die Lösung der Proteinstruktur mithilfe der Koordinaten von PPAR γ (PDB: 6TSG¹⁶¹) mit Phaser7²³⁹. Der manuelle Modellbau und die Strukturverfeinerung wurden mit COOT²⁴⁰ und REFMAC5²⁴¹ durchgeführt.

5. Experimenteller Teil

Tabelle 15: Datenerfassung und Verfeinerungsstatistik der durchgeführten Kristallisationen.

Komplex	39	104	31 (Zweifach Bindung)	31 (Einfach Bindung)	Apo-Form
PDB ID	8ATY	8ATZ	8CPI	8CPH	8CPJ
Datenerfassung					
Auflösung ^a (Å)	44,30-1,90 (1,97-1,90)	46,33-1,95 (2,02-1,95)	46,38-2,10 (2,17-2,10)	44,50-2,40 (2,51-2,40)	44,62-2,40 (2,48-2,40)
Spacegroup	P 4 ₃ 2 ₁ 2	P 4 ₃ 2 ₁ 2	P 4 ₃ 2 ₁ 2	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 4 ₁ 2 ₁ 2
Zellabmessung	a, b = 65,3, c = 156,0 Å α, β, γ = 90,0°	a, b = 65,5, c = 157,4 Å α, β, γ = 90,0°	a, b = 65,6, c = 157,3 Å α, β, γ = 90,0°	a = 62,5, b = 63,4, c = 168,4 Å α, β, γ = 90,0°	a, b = 63,1, c = 168,1 Å α, β, γ = 90,0°
No. Unique reflections ^a	27.306 (2.612)	25.916 (2.487)	20.906 (2.002)	26.908 (3.218)	14.070 (1,341)
Vollständigkeit	99,3 (98,5)	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)	99,8 (99,5)	100,0 (100,0)
I/σI ^a	16,6 (2,2)	14,1 (2,0)	23,5 (2,0)	17,2 (1,8)	19,6 (2,0)
R _{merge} ^a	0,059 (0,877)	0,068 (0,989)	0,045 (1,085)	0,058 (1,255)	0,101 (1,387)
CC (1/2)	0,999 (0,767)	0,999 (0,867)	1,000 (0,833)	1,000 (0,738)	0,999 (0,798)
Redundanz	8,7 (8,5)	11,1 (11,6)	11,8 (12,5)	9,6 (9,4)	13,8 (14,2)
Verfeinerung					
No. atoms in refinement (P/L/O) ^b	2,199/ 46/ 185	2,221/ 28/ 128	2,224/ 42/ 44	4,231/ 42/ 36	2,185/ -/ 14
B-Faktor (P/L/O) ^b (Å ²)	43/ 45/ 49	52/ 78/ 51	73/ 99/ 59	95/ 114/ 71	97/ -/ 68
R _{fact} (%)	17,6	19,7	22,2	21,6	23,8
R _{free} (%)	20,1	24,5	28,2	26,3	28,2
rms deviation bond ^c (Å)	0,015	0,014	0,011	0,011	0,012
rms deviation angle ^c (°)	1,5	1,3	1,2	1,3	1,1
Kristallisationsbedingungen	1,4 M Ammoniumsulfat, 0,1 M tris 8,0	1,6 M Ammoniumsulfat, 0,1 M tris 7,5	1,6 M Ammoniumsulfat, 0,1 M tris 8,0	30% PEG 3350, 0,15 M Natriumcitrat	27% PEG 3350, 0,15 M Natriumcitrat

^a Die Werte in Klammern zeigen die Statistik für die *highest resolution shells*.

^b P/L/O steht für Protein/ Ligand von Interesse und andere (Wasser- und Lösungsmittelmoleküle)

^c rms bedeutet *root-mean-square*.

5.3 Bindungs-Assays

5.3.1 Differentielle Scanning Fluorometrie

Die Untersuchung der thermischen Stabilität der rekombinanten PPAR γ -LBD (hergestellt wie zuvor beschrieben¹⁹¹) und die Stabilisierung durch Testverbindungen erfolgte mittels Differentieller-Scanning-Fluorometrie (*differential scanning fluorimetry*, DSF) an einem Mx3005p Echtzeit PCR Gerät (Stratagene, San Diego, CA, USA) gemäß eines publizierten Protokolls²⁴². Das rekombinante PPAR γ -LBD-Protein wurde mit einem Puffer (10 mM HEPES, pH 7,5; 100 mM NaCl) auf eine Endkonzentration von 2 μ M verdünnt und anschließend mit dem Farbstoff

5. Experimenteller Teil

SYPRO Orange (Verdünnung 1:1000), DMSO (5%) und den Testverbindungen (**104**), Pioglitazon (**33**) und Kombinationen von **33** (5, 10 & 20 μM) und **104** (5 & 10 μM) in unterschiedlichen Konzentrationen gemischt. Die Temperatur wurde über 71 Zyklen (1 $^{\circ}\text{C}$ /Zyklus) erhöht, wobei die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen wurde. Die Testung aller Proben erfolgte in drei biologisch unabhängigen Wiederholungen. Ebenfalls wurden Kontrollexperimente ohne PPAR γ -LBD durchgeführt, um mögliche unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Testverbindungen und dem Farbstoff auszuschließen. Die Schmelzkurven wurden mithilfe einer Boltzmann-Gleichung analysiert, um die Schmelzpunkte (T_m) zu ermitteln und ΔT_m zu berechnen, das T_m (Verbindung) – T_m (unbehandelt) entspricht.

5.3.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Experimente zur isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wurden an einem Affinity-ITC-Gerät (TA Instruments, New Castle, Deutschland) bei 25 $^{\circ}\text{C}$ mit einer Rührgeschwindigkeit von 75 Umdrehungen pro Minute durchgeführt.

ITC-Experimente für Nur77: Das Nur77-LBD-Protein (20-40 μM) wurde in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 mM TCEP, 5% Glycerol), der 2% DMSO enthielt, mit der jeweiligen Testverbindung (**40-42**, **60-64**, **67-69**, **73**, **74**; Konzentration: 100 oder 200 μM , im selben Puffer mit 2% DMSO) in 25 Injektionen (1 x 1 μL und 24 x 4 μL oder 24 x 3 μL) in einem Injektionsintervall von 200 – 300 Sekunden titriert. Zur Kontrolle der detektierten Daten erfolgten zwei Experimente. Die Testverbindung wurde unter sonst gleichen Bedingungen in den jeweiligen Puffer und der jeweilige Puffer in die PPAR γ -LBD-Proteinlösung titriert. Die detektierten Wärmeraten für die Titrationsen wurden mithilfe der Software NanoAnalyze (TA instruments, New Castle, Deutschland) mit einem unabhängigen Bindungsmodell ausgewertet.

ITC-Experimente für PPAR γ : Das PPAR γ -LBD-Protein (20 μM , hergestellt wie zuvor beschrieben¹⁹¹) wurde in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% Glycerol), der 5% DMSO enthielt, mit der jeweiligen Testverbindung (**39**, **104**, jeweils 100 μM , im selben Puffer mit 5% DMSO) in 26 Injektionen (1 x 1 μL und 25 x 5 μL) in einem Injektionsintervall von 150 Sekunden titriert. Um eine Bindung an die GW9662 (**36**)-gebundene PPAR γ -LBD zu bestimmen, wurde das Protein (100 μM) 24 Stunden lang vor dem ITC-Experiment bei 4 $^{\circ}\text{C}$ mit dem oben beschriebenen Puffer, der zusätzlich **36** (250 μM) enthielt, inkubiert. Die Durchführung des ITC erfolgte danach wie oben beschrieben, wobei der verwendete Puffer durch 50 μM **36** ergänzt wurde. Zur Überprüfung der Bindung von **36** wurde die an **36** gebundene PPAR γ -LBD mit Pioglitazon (**33**) unter

5. Experimenteller Teil

denselben Bedingungen titriert, wobei keine Bindungswärme detektiert wurde. Als Kontrollexperimente wurden das freie oder **36**-gebundene PPAR γ -LBD-Protein mit Puffer und Puffer mit den Lösungen der Testverbindungen titriert. Die Ergebnisse wurden mit der Software Nano-Analyze (TA Instruments, New Castle, Deutschland) mit einem sequenziellen Zwei-Seiten-Bindungsmodell (**39**-PPAR γ) oder einem unabhängigen Bindungsmodell (**39**-PPAR γ /**36**, **104**-PPAR γ , **104**-PPAR γ /**36**) ausgewertet.

5.3.3 MS-basierter PPAR γ -Ligandbindungs-Assay

❖ Die Experimente zum „MS-basierten PPAR γ -Ligandenbindungs-Assay“ wurden von **Dr. Georg Höfner** und **Lennart Obeser** durchgeführt.

Die PPAR γ -LBD (0,2 oder 1 μ M) wurde mit Liganden in Tris Puffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,5 mM TCEP, 5% Glycerol, 1% DMSO, pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 110 μ L für eine Stunde bei 25 °C in einem schüttelnden Wasserbad inkubiert. Parallel dazu erfolgte eine Inkubation mit einem zuvor denaturierten Protein (80 °C, 30 Minuten im Wasserbad) unter sonst gleichen Bedingungen. Die Bindungsproben (100 μ L) wurden dann auf einen Microcon 10 kDa 0,5 mL Zentrifugalfilter, der eine Ultracel-Membran aus regenerierter Cellulose (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthält, übertragen und anschließend einer Ultrafiltration bei 14000 g für 40 Minuten unterzogen, wobei sich ein Restvolumen von 5 μ L ergab. Danach wurde jeder Filter auf ein neues Polypropylenröhrchen aufgesetzt und nach dem Aufbringen von 10 μ L Ammoniumacetatpuffer (154 mM, pH 7,4) 10 Sekunden intensiv geschüttelt. Für die vollständige Abtrennung des verbleibenden Rückstands auf der Membran, wurde die Filtereinheit umgedreht (entgegengesetzte Flussrichtung im Vergleich zur Ultrafiltration) und eine Minute bei 4000 g zentrifugiert. Zu den dadurch enthaltenen Proben wurde 80 μ L mobile Phase (0,1% Ameisensäure und Acetonitril, Verhältnis 40:60) hinzugefügt. Nach anschließender Zentrifugation bei 25.142 g für zehn Minuten wurde jedes Aliquot mit JP147 (Verbindung 28 von Referenz¹⁷¹, finale Konzentration 10 nM) als interner Standard versetzt und mit der mobilen Phase verdünnt. Die Quantifizierung mittels LC-ESI-MS/MS erfolgte mit einem Injektionsvolumen von 10 μ L an einem API 3200 QTrap Triple-Quadropol-Massenspektrometer (Sciex, Darmstadt, Deutschland), das an einen Agilent 1100 HPLC-System (Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit SIL-20A/HAT-Autosampler (Shimadzu, Kyoto, Japan) gekoppelt war. Das Gerät wurde durch das Analyst-Programm (v.1.6.3) gesteuert. Die Durchführung der Chromatographie erfolgte an einer Triart-C18-Säule (3 μ M, 50 mm x 2 mm, YMC Europe, geschützt mit einer 0,5 μ m- und einer

5. Experimenteller Teil

0,2 µm-Fritte) als stationärer Phase und einer mobilen Phase (0,1% Ameisensäure und Acetonitril, 40:60) mit einer Flussrate von 400 µL/Min. Die MS-Detektion erfolgte unter positiven ESI-Bedingungen im MRM-Modus mit folgenden Ergebnissen für die Massenübergänge: m/z 416,1 → 105,1 (**104**), m/z 357,2 → 134,1 (Pioglitazon, **33**), m/z 382,2 → 310,1 (JP147).

5.4 Reportergeren-Assays

5.4.1 Kultivierung der verwendeten Zellen

Alle Zelllinien wurden von DMSZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH) erhalten. HEK293T-, HepG2-, COS7- und ASC52telo HTERT-Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (*dulbecco's modified eagle's medium*, DMEM, Gibco, Life Technologie, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit einem hohen Glucose-Anteil, das mit 10% fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, Capricorn, Ebsdorfengrund, Deutschland), Natriumpyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) ergänzt wurde, bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium ohne Natriumpyruvat aber ansonsten gleichen Zusätzen und Bedingungen.

5.4.2 Hybrid-Reportergeren-Assay

Der „Hybrid-Reportergeren-Assay“ wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt^{126,120}. Es wurden jeweils drei Plasmide (Gal4-Rezeptor-Fusionsplasmid, Firefly-Luciferase-Plasmid, Renilla-Plasmid) transient transfiziert. Dabei diente pFR-Luc (Stratagene) als Reporterplasmid und pRL-SV40 (Promega) zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und des Zellwachstums. Die Durchführung der Experimente erfolgte mit folgenden Plasmiden, die für die Hinge-Region und die LBD der kanonischen Isoform der Kernrezeptoren kodieren: pFA-CMV-hTHRα-LBD¹⁶¹, pFA-CMV-hTHRβ-LBD¹⁶¹, pFA-CMV-hRARα-LBD¹⁷¹, pFA-CMV-hRARβ-LBD¹⁷¹, pFA-CMV-hRARγ-LBD¹⁷¹, pFA-CMV-hPPARα-LBD²⁴³, pFA-CMV-hPPARγ-LBD²⁴³, pFA-CMV-hPPARδ-LBD²⁴³, pFA-CMV-hRORα-LBD²⁴⁴, pFA-CMV-hRORβ-LBD²⁴⁴, pFA-CMV-hRORγ-LBD²⁴⁴, pFA-CMV-hLXRα-LBD²⁴⁵, pFA-CMV-hLXRβ-LBD²⁴⁵, pFA-CMV-hFXR-LBD²⁴⁶, , pFA-CMV-hVDR-LBD²⁴⁷, pFA-CMV-hCAR-LBD²⁴⁷, pFA-CMV-hHNF4α-LBD¹⁹⁹, pFA-CMV-hRXRα-LBD²⁴⁸, pFA-CMV-hRXRβ-LBD²⁴⁸, pFA-CMV-hRXRγ-LBD²⁴⁸, pFA-CMV-hTR2-LBD, pFA-CMV-hTR4-LBD, pFA-CMV-hTLX-LBD, pFA-CMV-hNur77-LBD¹²⁶, pFA-CMV-hNurr1-LBD¹²⁶, pFA-CMV-hNOR-1-LBD¹²⁶, pFA-CMV-hLRH-1-LBD und pFA-CMV-VP16-LBD.

5. Experimenteller Teil

HEK293T-Zellen wurden, wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, kultiviert und in 96-Well-Platten (3 x 10⁴ Zellen pro Well) ausgesät. Der Austausch des Mediums erfolgte nach 24 Stunden gegen Opti-MEM ohne Zusätze und die Zellen wurden mit einem pFA-CMV-hNR-LBD-Klon, pFR-Luc und pRL-SV40 mittels Lipofectamin LTX-Reagenz (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstelleranweisung transient transfiziert. Fünf Stunden nach beendeter Transfektion fand die Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Testverbindungen oder Referenzagonisten in Opti-MEM, das zusätzlich Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL) und 0,1% DMSO enthielt, statt. Als Negativkontrolle diente Opti-MEM mit 0,1% DMSO. Von jeder Probe wurden Duplikate erstellt und diese in mindestens drei unabhängigen Experimenten getestet. Nach einer Inkubationszeit von 14-16 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität anhand der Lumineszenz mit dem Dual-Glo Luciferase-Assay-System (Promega, Fitchburg, WI, USA) nach Herstelleranweisung auf einem Tecan Spark Luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Deutschland) gemessen. Um relative Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) zu erhalten, wurde die Lumineszenz der Firefly-Luciferase durch die Lumineszenz der Renilla-Luciferase dividiert und mit 1000 multipliziert. Dieser Schritt führte zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und des Zellwachstums. Durch Division der mittleren RLU der Testverbindungen durch die mittleren RLU der Negativkontrolle (0,1% DMSO) ergab sich die x-fache Aktivierung. Die relative Aktivierung ließ sich aus dem Quotienten der x-fachen Aktivierung der jeweiligen Testverbindung und des jeweiligen Referenzagonisten bilden. Folgende Referenzagonisten wurden, wenn nichts anderes angegeben ist mit einer Konzentration von 1 µM verwendet: THRα/β – T3, RARα-γ – Tretinoin, PPARα – GW7647, PPARγ – Pioglitazon (**33**), PPARβ/δ – L165,041, RORα – T0901317, RORβ – T0901317, RORγ – SR1001, LXRα/β – T0901317, FXR – GW4064, VDR – Calcitriol, CAR – CITCO, HN4α – Frag1240, RXRα-γ – Bexaroten, TLX – Propranolol, Nur77 – Amodiaquin (**4**, 100 µM), Nurr1 – Amodiaquin (**4**, 100 µM), NOR-1 – Amodiaquin (**4**, 100 µM). Für die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven und die Berechnung der EC₅₀-Werte wurde die Gleichung „[Agonist] gegen Reaktion (variable Steigung – vier Parameter)“ in GraphPad Prism (Version 7.00, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Für aktive Verbindungen wurden Kontrollexperimente mit dem Liganden-unabhängigen Transkriptionsfaktor Gal4-VP16 (kodiert durch pECE-SV40-Gal4-VP16¹⁹⁵, 1 ng/Well, Addgene Plasmid #71728, Watertown, MA, USA) durchgeführt.

5. Experimenteller Teil

5.4.3 PPAR γ -PPRE-Assay

Die Untersuchung der Aktivierung des PPAR γ -RE (PPRE) wurde wie zuvor bereits beschrieben mittels Reporterplasmid PPRE1-pGL3 durchgeführt¹⁷¹. Dieses kodiert unter Kontrolle des menschlichen PPRE für die Firefly-Luciferase. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und des Zellwachstums, diente pRL-SV40. HepG2-Zellen wurden, wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, kultiviert und 24 Stunden vor der Transfektion in 96-Well-Platten (1,25 x 10⁴ Zellen pro Well), die mit Kollagen G-Lösung beschichtet waren, ausgesät. Für die Erzeugung der Beschichtung wurden die Kulturplatten vor der Zellaussaat für 30 Minuten bei 37°C mit einer 10 μ g/mL-Lösung von Kollagen G in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) inkubiert. Vor der Transfektion wurde das Medium gegen Opti-MEM ohne Zusätze ausgetauscht. Die transiente Transfektion mit PPRE1-pGL3 und pRL-SV40 (Promega) erfolgte mit Lipofectamin 3000 (Invitrogen) nach Herstelleranweisung. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Opti-MEM, das zusätzlich Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 μ g/mL) sowie 0,1% DMSO enthielt, und der jeweiligen Testverbindung (+ 0,1% DMSO) oder mit 0,1% DMSO allein (Negativkontrolle) inkubiert. Jede Probe wurde als Duplikat in drei unabhängigen Wiederholungen gemessen. Die Messung der Luziferaseaktivität und die Analyse der Daten erfolgte, wie unter Kapitel 5.4.2 beschrieben.

5.4.4 Nur77-Vollängen-Assay

❖ Die Klonierung des humanen Vollängen Nur77 erfolgte durch **Dr. Jan Heering**.

Der Reporter-Gen-Assay für die Beobachtung der Modulation des humanen Nur77-Vollängenrezeptors auf dem natürlichen humanen NBRE wurde mit den Plasmiden pcDNA3.1-Nur77, pFR-Luc-NBRE und pRL-SV40 durchgeführt. pcDNA3.1-Nur77 wurde durch Klonierung der humanen Vollängen Nur77 kodierenden DNA-Sequenz (CDS) für die Isoform 1 (uniprot P22736-1) in pcDNA3.1 +/C-(K)-DYK (genescript, New Jersey, USA) erhalten - der C-terminale Tag wurde weggelassen. Durch die natürliche Nur77 cDNA als Vorlage (GenBank-Eintrag: BC016147.1, erworben als I.M.A.G.E.-cDNA-Klon von Source BioScience, Nottingham, UK) konnte mittels PCR das Insert mithilfe der Q5 high-fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, USA) sowie mit den Primern 5' -CGA GCT CGG ATC CGC CAC CAT GCC CTG TAT CCA AGC CCA ATA TG-3' (fwd; Startcodon) und 5'-CCC CTC TAG ATC AGA AGG GCA GCG TGT CCA TG-3' (rev; Stoppcodon) erhalten werden. Der Vorwärtsprimer diente zur

5. Experimenteller Teil

Einführung einer Restriktionsstelle für BamHI gefolgt von einer Kozak-Sequenz und dem Startcodon. Der Rückwärtsprimer führte zur Einführung einer Restriktionsstelle für XbaI unmittelbar nach dem Stoppcodon. Die Klonierung des Insert erfolgte zwischen BamHI und XbaI innerhalb der MCS (multiple cloning site) von pcDNA3.1+/C-(K)-DYK unter Verwendung von T4 DNA Ligase (NEB). Die Steuerung der Expression der humanen Vollängen Nur77-Isoform 1 ohne Tags erfolgt durch den CMV-Promotor. Die überlappende Sequenzierung der Sequenz zwischen CMV-Promotor und bGH_PA-Terminator diente als Überprüfung der Sequenzidentität. Der Nur77-Vollängen-Reporteragen-Assay wurde mit den Plasmiden pcDNA3.1-Nur77, pFR-Luc-NBRE und pRL-SV40 wie der Hybrid-Reporteragen-Assay durchgeführt. Als Referenzligand diente der NR4A-Agonist-Amodiaquin^{85,96,126} (**4**, $EC_{50} = 61 \pm 5 \mu\text{M}$, $602 \pm 60\%$ max. Aktivierung; $100 \mu\text{M}$ als Positivkontrolle).

5.5 PPAR γ -Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay

❖ Die Experimente zum „PPAR γ -Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay“ wurden von **Dr. Jan Heering** durchgeführt.

Für die Untersuchung der Rekrutierung von Co-Regulator Peptiden an die PPAR γ -LBD wurde ein homogener zeitaufgelöster Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (HTRF)-Assay verwendet, der zuvor bereits beschrieben wurde¹⁸⁴. Das rekombinante, biotinylierte PPAR γ -LBD-Protein (exprimiert wie zuvor beschrieben²²²) wurde stabil mit Terbiumkryptat als Streptavidin Konjugat (Tb-SA, Cisbio Bioassays, Codolet, France) gekoppelt und diente als FRET-Donor. Die Herstellung der Assay-Lösungen erfolgte in einem HTRF-Puffer (25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KF, 10% Glycerol), der DTT (5 mM) und 0,1% CHAPS, rekombinant biotinyliertes PPAR γ (finale Konzentration: 3 nM), Tb-SA (3 nM), das jeweilige fluoreszenz-gelabelte Co-Regulator Peptid (100 nM) und 1% DMSO mit der jeweiligen Testverbindung (**33**, **36**, **104**) oder DMSO allein als Negativkontrolle enthielt. Die Co-Regulator-Peptide (ThermoFisher Scientific, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) waren mit Fluorescein als FRET-Akzeptor fusioniert. Alle Experimente wurde in 384 Well-Platten durchgeführt, unter der Verwendung von weißen Mikrotiterplatten mit flachem Boden aus Polystyren (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). Jede Probe wurde in vier technischen Wiederholungen gemessen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenzintensität (FI) des FRET-Akzeptors (bei 520 nm) und des Tb-SA-Donors (bei 620 nm) an einem SPARK Plattenleser (Tecan Deutschland GmbH) nach Anregung bei 340 nm gemessen. FI_{520 nm} wurde durch die

5. Experimenteller Teil

Fl620 nm geteilt und mit 10.000 multipliziert, um ein dimensionsloses HTRF-Signal zu bekommen. Die folgenden Fluorescein-gekoppelten Co-Regulator-Peptide wurden verwendet: Steroid-Rezeptor-Co-Aktivator (SRC) 1-1, Fluorescein-KY SQTSHKLVQLLTTTAEQQL-OH; SRC 1-2, Fluorescein-LTARHKILHRLLEGGSPSD-OH; SRC 1-3, Fluorescein-ESKD HQLLRLLDKDEKDL-OH; SRC 1-4, Fluorescein-GPQTPQAQKSLQQLTE-OH; SRC 2-1, Fluorescein-DSKGQTKLLQLLTKSDQ M-OH; SRC 2-2, Fluorescein-LKEKHKILHRLLDSSSPV-OH; SRC 2-3, Fluorescein-KKKENALLRYLLDKDDTKD-OH; SRC 3-1, Fluorescein -ESKGHKLLQLLTCSSDDR-OH; SRC 3-2, Fluorescein-LQEKHRILHKLLQNGNSPA-OH; SRC 3-3, Fluorescein-KKENNALLRYLLDRDDPSD-OH; NR Co-Repressor (NCOR) ID1, Fluorescein-RTHRLITLADHICQIITQDFARN-OH; NCOR ID2, Fluorescein-DPASNLGLEDIIRKALMGSFDDK-OH; Silencing Mediator für Retinoid und Thyroid Hormonrezeptor (SMRT) ID1, Fluorescein-GHQRVVTLAQHISEVITQDYTRH-OH; SMRT ID2, Fluorescein-HASTNMGLEAIIRKALMGKYDQW-OH; CREB-Bindungsprotein 1 (CBP-1), Fluorescein-AASKHKQLSELLRGGSGSS-OH; C33, Fluorescein-HVEMHPLLMGLLMESQWGA-OH; D11-FXXLF, Fluorescein-VESGSSRFMQLFMANDLLT-OH; D22, Fluorescein-LPYEGSLLLKLLRAPVEEV-OH; EAB1, Fluorescein-SSNHQSSRLIELLSR-OH; EA2, Fluorescein-SSKGVLWRMLAEPVSR-OH; Androgenrezeptor-assoziiertes Protein 70 (ARA70), Fluorescein-SRETSEKFKLLFQSYNVND-OH; N-terminale Sequenz vom Androgenrezeptor (AR N-term), Fluorescein-SKTYRGAFQNLQSVREVI-OH; Peroxisom-proliferator-aktivierender Rezeptor gamma Co-Aktivator 1- α (PGC1 α), Fluorescein-EAEEPSLLKLLAPANTQ-OH; NR Co-Aktivator 6 (NCoA6, auch PRIPRAP250 genannt), Fluorescein-VTLTSPLLVNLQSDISAG-OH; NR-interagierendes Protein 1 (NRIP1, auch RIP140 genannt, Interaktionsmotiv L6), Fluorescein-SHQKVTLQLLLGHKNEEN-OH; RIP140L8, Fluorescein-SFSKNGLLSRLLRQNQDSY-OH; TB3, Fluorescein-SSVASREWWRELSR-OH; Thyroid Hormonrezeptor assoziiertes Protein (TRAP) TRAP220/DRIP-1, Fluorescein-KVSQNPILTSLLQITGNGG-OH; TRAP220/DRIP-2, Fluorescein-NTKNHPMLMNLKDNPAQD-OH. Bei allen Experimenten, die den kovalenten Antagonisten GW9662 (**36**) enthielten, wurde PPAR γ (3 nM) im HTRF-Puffer, mit allen Zusätzen, 48 Stunden vor dem Experiment bei 4°C mit **36** (10 μ M) in der Anwesenheit von 0,125% DMSO inkubiert.

5.6 Konzentrationsabhängiger PPAR γ -Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay

- ❖ Die Experimente zum „Konzentrationsabhängiger PPAR γ -Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay“ erfolgten durch **Dr. Jan Heering**.

Die konzentrationsabhängige PPAR γ -Co-Regulator-Rekrutierung wurde mit einer PPAR γ -LBD durchgeführt, die am N-terminus an superfolder GFP (sGFP-PPAR γ , Expression wie zuvor beschrieben²²²) fusioniert war, wobei sGFP als FRET-Akzeptor diente. Die Peptide die vom CBP-1 Co-Aktivatormotiv 1 (CBP; biotin-NLVPDAASKHKQLSELLRGGSGS-OH) und der SMRT Interaktionsdomäne 2 (SMRT-ID2; Biotin-SQAVQEHA STMNGLEAIIRKALMGKYDQW-OH) abgeleitet waren, wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen und mit Streptavidin an Terbiumkryptat gekoppelt. Die Herstellung der Assay-Lösungen erfolgte in Puffer (25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KF, 5% Glycerol, 5 mM DTT und 0,1% CHAPS) und enthielten Tb-SA (12 nM), das jeweilige Biotin-gelabelte Peptid (12 nM) und 100 nM (für CBP) oder 24 nM (für SMRT) sGFP-PPAR γ Protein sowie 1% DMSO mit der Testverbindung (Pioglitazon (**33**), **104**) oder 1% DMSO als Negativkontrolle. Die Testung jeder Probe erfolgte in drei technischen Wiederholungen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde, wie in Kapitel 5.5. beschrieben die Fluoreszenzintensität (FI) bei 520 nm und 620 nm gemessen und das HTRF-Signal bestimmt.

5.7 PPAR γ -RXR α -Heterodimerisierungs-Assay

- ❖ Die Experimente zum „PPAR γ -RXR α -Heterodimerisierungs-Assay“ erfolgten durch **Dr. Jan Heering**.

Die Untersuchung des Einflusses von **104** auf die Bildung des PPAR γ -RXR α Heterodimer erfolgte mithilfe von sGFP-RXR α -LBD-Protein (bis zu 300 nM, FRET-Akzeptor), das in der Anwesenheit von biotinylierten PPAR γ -LBD²²² (0,375 nM) und Tb-SA (0,75 nM) titriert wurde. Die Konzentration von sGFP wurde konstant bei 300 nM gehalten, indem freies sGFP hinzugefügt wurde. Die Durchführung der Assays erfolgte in HTRF-Assay-Puffer (unter 5.5 beschrieben) mit 10% Glycerol, der zusätzlich 5 mM DTT, 0,1% CHAPS, 1% DMSO sowie die jeweilige Testverbindung bei fixen Konzentrationen (SR11237 – 10 μ M, **33** – 10 μ M, **104** – 50 μ M) oder DMSO allein als Negativkontrolle enthielt. Die Testung jeder Probe erfolgte in drei technischen Wiederholungen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde, wie in Kapitel 5.5. beschrieben die Fluoreszenzintensität (FI) bei 520 nm und 620 nm gemessen und das HTRF-Signal bestimmt.

5.8 PPAR γ -Phosphorylierung an Ser273

❖ Die Experimente zur „PPAR γ -Phosphorylierung an Ser273“ erfolgten durch **Dr. Julian Marschner**.

Um die Effekte von PPAR γ -Liganden auf die PPAR γ -Phosphorylierung an Ser273 zu studieren, wurden HEK293T-Zellen in 6-Well-Platten (3×10^5 Zellen pro Well) im unter Kapitel 5.4.1 beschriebenen Medium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit Rosiglitazon (**32**, 1 μ M) oder **104** (20 μ M) in Opti-MEM, ergänzt mit Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 μ g/mL) und 0,1% DMSO oder nur mit dem Opti-MEM mit Zusätzen. Jede Probe wurde in drei biologisch unabhängigen Wiederholungen hergestellt. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet, anschließend bei 1000 g zehn Minuten zentrifugiert und für weitere Verarbeitung bei -80 °C als trockene Pellets eingefroren. Für die Proteinextraktion wurden die Pellets in 100 μ L vollständigem Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer (10 mL Pierce RIPA-Puffer, ergänzt mit 1 Tablette Pierce Protease- und Phosphatase-Inhibitor, ThermoFisher #A32959) resuspendiert, gründlich gevortext und 15 Minuten bei 4 °C und 600 U/Min horizontalem Schütteln inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C für zehn Minuten, wurde der Überstand geerntet und dann mit 25 μ L 5X Pierce TM Lane Marker reduzierender Probenpuffer (ThermoFisher #39000) gemischt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben erneut bei -80 °C gelagert. Die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde unter Verwendung eines 12%igen Polyacrylamidgels, das mit 15 μ L Proteinextrakt beladen war, bei 100 V für 20 Minuten und 200 V für 40 Minuten im Laufpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% w/v SDS, pH 8,3) durchgeführt. Kurz vor dem Tank-Blotting der getrennten Proteine auf eine mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon®-FL PVDF-Membran, Merck, #05317) wurden Gel und Membran zwei Minuten lang in Transferpuffer (125 mM TRIS, 970 mM Glycin) äquilibriert. Das Tank-Blotting mit dem in Transferpuffer getränktem Whattman-Papier erfolgte bei 80 V und 4 °C über Nacht. Die PVDF-Membran wurde viermal für zehn Minuten in einer Tris-gepufferten Kochsalzlösung mit 0,5% Tween 20 (TBST) gewaschen, anschließend in TBST mit 5% BSA und in anti-PPAR γ (Ser273)-Antikörper (Bioss Antibodies #bs-4888R, verdünnt 1:1000) oder anti-GAPDH (Cell Signaling Technology, Klon D16H11, verdünnt 1:1000) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der gleiche Waschschrift, wie oben beschrieben, noch einmal durchgeführt und die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Sigma Aldrich #12-348, 1:4000 verdünnt in TBST und 5% Magermilch) für eine

5. Experimenteller Teil

Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen in TBST wurde die Membran eine Minute lang in verstärkter Chemilumineszenzlösung (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM *p*-Cumarsäure, 2,6 mM Wasserstoffperoxid) getaucht und das Signal mit dem ChemiDoc Imaging System (BioRad) detektiert.

5.9 Toxizitäts-Assay

❖ Die Experimente zur Messung der „Toxizität“ erfolgten durch **Dr. Julian Marschner**. COS7-Zellen (DSMZ #ACC 60) wurden, wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben kultiviert und einen Tag vor dem Experiment in 96-Well-Platten (5 x 10⁴ Zellen pro Well) in Kulturmedium mit reduziertem Serumgehalt (0,2%) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte der Austausch des Mediums gegen ein Kulturmedium, das den gleichen reduzierten Serumgehalt (0,2%) beinhaltet und zusätzlich 0,1% DMSO sowie die zu untersuchende Testverbindung (**104**, Doxorubicin, Flavopiridol) oder 0,1% DMSO als unbehandelte Kontrolle enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, wurde das Medium abgesaugt, die Wells wurden einmal mit 100 µL PBS gewaschen und 30 Minuten lang mit PBS inkubiert, das entweder 1 µM NucView® 405 fluorogenes Caspase-3-Substrat (#P4864, Merck, Darmstadt, Deutschland) oder 0,5 µg/mL Propidiumiodid (#P4864, Merck, Darmstadt, Deutschland) enthielt, um Apoptose bzw. nicht regulierte Formen des Zelltods nachzuweisen. Nach der Inkubation wurden insgesamt sechs Fluoreszenzbilder pro Well bei 10-facher Vergrößerung, zum Nachweis von NucView® (Ex: 381-400 nm, Em: 414-450 nm) bzw. Propidiumiodid (Ex: 543-566 nm, Em: 580-611 nm) mit einem Tecan Spark Cyto (Tecan Group AG) aufgenommen. Die Messung der Referenzwerte für Hintergrundkorrekturen und der Nachweis von Autofluoreszenz erfolgte vor der Färbung bei der jeweiligen Wellenlänge. Zusätzlich wurde die Konfluenz der Zellen vor der Verabreichung der Prüfverbindungen, nach dem ersten Mediumwechsel, 24 Stunden nach der Verabreichung der Prüfverbindungen und nach der Fluoreszenzbildgebung mit einem Tecan Spark Cyto bestimmt, um den Zellverlust durch die Verabreichung der Prüfverbindung und die Handhabung der Zellen zu beobachten.

5.10 Effekte an der GATA2-Expression in HeLa-Zellen

- ❖ Die Experimente zur Bestimmung der „Effekte an der GATA2-Expression in HeLa-Zellen“ erfolgten durch **Dr. Julian Marschner**.

Für die Bestimmung der Effekte an der GATA2-Expression wurden HeLa-Zellen (ATCC CCL-2™) mit dem unter Kapitel 5.4.1 beschriebenen Medium in 12 Well-Platten ($2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch RPMI 1640 ersetzt, das zusätzlich 0,2% FCS, Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) enthielt und anschließend weitere 24 Stunden bebrütet. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit **68** (10 und 30 µM) oder THPN (**16**, 20 µM), die jeweils 0,1% DMSO enthielten oder mit 0,1% DMSO allein (Negativkontrolle). Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden, wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und nach Absaugen der Restflüssigkeit bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem E.Z.N.A® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, Norcross, USA) nach Herstelleranweisung. Mit einem NanoDrop™ One UV/VIS-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde die RNA-Konzentration und die -Reinheit bei 260/280 nm bestimmt. Vor der reversen Transkriptase (RT), wurde die RNA bei einer Konzentration von 133 ng/µL linearisiert und anschließend für mindestens eine Minute auf Eis inkubiert. Die Durchführung der RT erfolgte an einem Thermocyclers XT96 (VWR International, Darmstadt, Deutschland) mit einem maximalen Gesamtvolumen von 22,45 µL, das sich aus einer Gesamt-RNA-Menge von 2 µg sowie 20 U rekombinantem RNasin® Ribonuklease Inhibitor (Promega, Mannheim, Deutschland), 100 U SuperScript® IV RT (enthält 5x Erststrang Puffer und 0,1 M Dithiothreitol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)), 3,75 ng lineares Acrylamid, 625 ng Random-Hexamer-Primer (#11277081001, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 11,25 nmol Desoxynukleosidtriphosphat Mischung (2,8 nmol je ATP, TTP, CTP, GTP; #R0186, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zusammensetzte. Die Durchführungstemperatur lag zehn Minuten bei 50 °C und zehn Minuten bei 80 °C. Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde mit einem Applied Biosystems™ QuantStudio 1 (Thermo Fisher, Waltham, USA) und einer SYBR-grün-basierten Detektionsmethode durchgeführt. Dafür wurde 0,2 µL vorbereitete cDNA-Lösung, 6 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,8 U Tag DNA Polymerase (#M0267, New England Biolabs, Ipswich, USA), 4 ppm SYBR® Green I (#S9430, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 1,2 nmol Desoxynukleosidtriphosphat-Mischung (wie oben angegeben), 60 nmol MgCl₂, 4 µg Rinderserumalbumin (#B14, Thermo Fisher Scientific,

5. Experimenteller Teil

Waltham, USA), 20% BioStab PCR Optimizer II (#53833, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 10% Taq-Puffer ohne Detergenzien (#B55, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet und anschließend mit ddH₂O zu einem Endvolumen von 20 µL aufgefüllt. Alle Proben durchliefen 40 Zyklen von Denaturierung (15 Sekunden bei 95 °C), Primer-Annealing (15 Sekunden bei 60 °C) und Dehnung (15 Sekunden bei 68 °C). Die Auswertung der PCR-Produktspezifität erfolgte durch eine Schmelzkurvenanalyse im Bereich von 65 bis 95 °C. Die GAPDH-mRNA-Expression diente zur Normalisierung der GATA2 mRNA Expression jeder Probe, unter Verwendung der Δ Ct-Methode. Folgende Primer wurden verwendet: GAPDH: fw: 5'-AGG TCG GAG TCA ACG GAT TT-3', rev: 5'-TTC CCG TTC TCAGCC TTG AC-3'; GATA2: fw: 5'-CAG CAA GGC TCG TTC CTG TTC A-3', rev: 5'-ATG AGT GGT CGG TTC TGC CCA T-3'.

5.11 Adipozyten-getriebene mesenchymale Stammzellendifferenzierung

❖ Die Experimente zur „Adipozyten-getriebene mesenchymale Stammzellendifferenzierung“ erfolgten durch **Romy Busch**.

Die Differenzierungsexperimente mit ASC52telo hTERT-Zellen (ATCC® SCRC-4000™) wurden nach einem bereits beschriebenen Verfahren durchgeführt²⁴⁹. Die Kultivierung der Zellen erfolgte, wie in Kapitel 5.4.1 aufgeführt und wurden einen Tag vor dem Experiment in 96-Well-Platten (5 x 10³ Zellen pro Well) im Kulturmedium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Zellen mit einem Differenzierungsmedium, das sich aus Kulturmedium (siehe Kapitel 5.4.1) mit Humaninsulin (10 µg/mL, #I3536, Merck, Darmstadt, Deutschland), Dexamethason (1 µM, #D4902, Merck, Darmstadt, Deutschland), Isobutylmethylxanthin (0,5 mM, #I5879, Merck, Darmstadt, Deutschland), DMSO (finale Konzentration 0,1%) und den jeweiligen Testverbindungen (**33**, **104**) zusammensetzte. Das Differenzierungsmedium wurde alle 48-72 Stunden für insgesamt sechs Zyklen innerhalb von 13 Tagen erneuert. Bei jedem Mediumwechsel wurden die Testverbindungen frisch zugesetzt. Innerhalb des Zeitraums vom 14. bis zum 22. Tag befanden sich die Zellen in einem Erhaltungsmedium, das aus dem Kulturmedium bestand und nur Humaninsulin (10 µg/mL) enthielt, ohne zusätzliche Behandlung. Das Erhaltungsmedium wurde innerhalb von neun Tagen alle 48-72 Stunden in insgesamt vier Zyklen erneuert. Nach dem 21-tägigen Differenzierungsprozess und der Behandlung mit den Testverbindungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Formalin (10%, stabilisiert mit Methanol, 100 µL pro Well, Nr. 15071, Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) fixiert. Danach wurde das Formalin abgesaugt und

5. Experimenteller Teil

die fixierten Zellen zweimal mit 40%igem 2-Propanol gewaschen. Der zweite Waschschrift dauerte 30 Minuten bei Raumtemperatur, um die Proben für die Färbung ins Gleichgewicht zu äquilibrieren. Oil Red O (#O0625, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde in 2-Propanol (10 mg/mL) zubereitet und mit einem Whatman®-Filterpapier der Qualität 595 (#311611, Schleicher & Schuell GmbH, London, UK) und einem 0,2 µm Spritzenfilter (FP 30/0,2 CA-S, #10462200, Schleicher & Schuell GmbH, London, UK) gefiltert und anschließend mithilfe von ddH₂O verdünnt, sodass die Lösung eine Endkonzentration von 0,4% Oil Red O und 40% 2-Propanol erreichte. Nach der Gleichgewichtseinstellung wurden die Proben mit einer 0,4%igen Oil Red O-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Oil Red O-Lösung abgesaugt und die Wells zwei bis dreimal mit ddH₂O gewaschen, um gegebenenfalls ausgefallene Oil Red O-Kristalle zu entfernen. Für die nachfolgenden Analysen erfolgte die Aufbewahrung der Proben in ddH₂O. Für jedes Well wurden mehrere Bilder mit einem Motic® AE31E-Inversmikroskop und einem Moticam 1080 (Motic Hong Kong Ltd.) bei vierfacher Vergrößerung aufgenommen. Nach anschließender Dichromatisierung und Extraktion des roten Kanals mit ImageJ 1.53q wurde der prozentuale Anteil, der durch Oil Red O gefärbten Flächen durch die Erzeugung binärer Bilder unter Anwendung eines geeigneten Schwellenwerts auf die extrahierten Bilder bewertet. Zur Auswertung einer biologischen Wiederholung wurde der Mittelwert von drei technischen Wiederholungen berechnet und jede Probe in drei voneinander unabhängigen Experimenten getestet.

5.12 Differentielle Genexpressionsanalyse von Hepatozyten

- ❖ Die mRNA-Sequenzierung der hier beschriebenen Proben erfolgte durch das Unternehmen **Novogene** auf Honorarbasis. An der Aufbereitung der erhaltenen Daten war **Dr. Julian Marschner** mit beteiligt.

HepG2-Zellen wurden, wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben kultiviert und in 6-Well-Platten (1 x 10⁶ Zellen pro Well) ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Austausch des Mediums gegen minimales essenzielles Medium (MEM), dem 1% FCS, Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) zugesetzt waren. Das Medium wurde nach 48 Stunden erneuert und enthielt nun zusätzlich 0,1% DMSO und Verbindung **104** (20 µM) oder 0,1% DMSO allein als Kontrolle. Jede Behandlung fand an vier unabhängigen biologischen Proben statt. Nach zwölf Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Aus den erhaltenen Proben wurde mittels RNA-Extraktion mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (R6834-02, Omega-

5. Experimenteller Teil

Bio-Tek Inc., Norcross, SA, USA) die RNA gewonnen. Die RNA-Sequenzierung erfolgte durch das Unternehmen Novogene (Cambridge, UK) auf Honorarbasis. Als Ausgangsmaterial für die RNA-Probenvorbereitung diente 1 µg RNA pro Probe. Die Erstellung der Sequenzierungsbibliothek geschah mit dem NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit für Illumina® (NEB, USA) wie vom Hersteller empfohlen. Zusätzlich wurden Indexcodes hinzugefügt, um die Proben den Sequenzen zuzuordnen. Zur Isolierung der mRNA wurde die Gesamt-RNA mit an Poly-T-Oligo gebundenen magnetischen Perlen gereinigt. Die Fragmentierung wurde unter Verwendung von zweiwertigen Kationen bei erhöhter Temperatur in NEBNext Erststrang-Synthese-Reaktions-Puffer (5X) durchgeführt. Die Synthese des cDNA-Erststrangs erfolgte unter der Verwendung von Random-Hexamer-Primern und M-MuLV-Reverser-Transkriptase (RNase H). Die Synthese des zweiten Strangs erfolgte anschließend mit der DNA-Polymerase I und RNase H und mithilfe von Exonukleasen/Polymerase-Aktivitäten wurden die verbliebenen Überhänge in stumpfe Enden umgewandelt. Die 3'-Enden der DNA-Fragmente wurden adenyliert und an einen NEBNext-Adapter, der Haarnadelstreifenstrukturen beinhaltet, gebunden. Dies diente zur Vorbereitung der Hybridisierung. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Bibliotheksfragmente mit dem AMPure XP-System (Beckman Coulter, Beverly, USA), um cDNA-Fragmente mit einer Länge von 150 bis 200 bp zu isolieren. Danach wurde 3 µL USER-Enzyme (NEB, USA) und gröbenselektierte, Adapter-gebundene cDNA für 15 Minuten bei 37 °C verwendet, gefolgt von fünf Minuten bei 95 °C vor der PCR. Die Durchführung der PCR erfolgte mit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Universal-PCR-Primern und einem Index (X) Primer. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (AMPure XP System) und die Bewertung der Qualität der Bibliothek erfolgte mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 System. Die Durchführung des Clustering der index-kodierten Proben wurde auf dem cBot Cluster Generation System unter Verwendung des PE Cluster Kit cBot-HS (Illumina) entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt. Nach Abschluss des Clustering wurden die Bibliothekspräparate einer Sequenzierung unterzogen und Paired-End-Reads generiert. Alle Rohdaten wurden im FASTQ-Format zunächst durch fastp aufgearbeitet. Daten (Reads) die Adapter- und Poly-N-Sequenzen enthielten oder eine niedrige Qualität aufwiesen wurden aus den Rohdaten entfernt, wodurch bereinigte Reads entstanden. Gleichzeitig erfolgte die Berechnung des Q20, Q30 und der GC-Gehalt der bereinigten Reads. Alle folgenden Analysen wurden mit den bereinigten Reads mit hoher Qualität erhoben. Die Dateien für Referenzgenome und Genmodelle wurden vom Genom-Website-Browser (NCBI/UCSC/Ensembl) heruntergeladen. Die Auswertung von Paired-End-Clean-Reads erfolgte

5. Experimenteller Teil

mit der Software STAR (*spliced transcripts alignment to a reference*). Die Anzahl der gemappten Reads für jedes Gen wurde durch Feature Counts bestimmt. Anschließend erfolgte die Berechnung der Reads pro Kilobase des Exon-Modells pro Millionen gemappter Reads (RPKM) jedes Gens auf der Grundlage der Länge des Gens und der Anzahl der für dieses Gen gemappten Reads. RPKM dienen zur Schätzung der Genexpressionswerte und berücksichtigen die Auswirkungen der Sequenzierungstiefe sowie der Genlänge auf die Anzahl der Reads²⁵⁰. Für die Analyse der differentiellen Expression zwischen den beiden Bedingungen/Gruppen (vier biologische Wiederholung pro Bedingung) wurde das DESeq2 R-Paket verwendet. Dieses bietet statistische Routinen zur Bestimmung der differentiellen Expression in digitalen Genexpressionsdaten unter Verwendung eines Modells auf der Grundlage der negativen Binomialverteilung. Gene mit einem p-Wert < 0,05, die durch DESeq2 identifiziert wurden, erhielten eine Einstufung als differentiell exprimiert. Die Implementierung der Gene Ontology (GO, <http://www.geneontology.org/>) zur Vereinheitlichung der Darstellung von Geneigenschaften und der Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen erfolgte mithilfe der R-Pakete clusterProfil, AnnotationDbi und org.Hs.eg.db. GO-Begriffe mit einem p-Wert von < 0,05 wurden durch unterschiedliche exprimierte Gene als signifikant angereichert betrachtet. Für die Visualisierung der verschiedenen Pfade (log₂ fold change), die sich durch die Behandlung ergaben, wurde das R-Paket pathview auf der KEGG Pathway Project-Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>) verwendet. Die Gene die **104**, Pioglitazon (**33**) und GA (**37**) regulierten, wurden mithilfe der PPARgene-Datenbank²²⁵ auf das Vorhandensein von experimentell bestätigten oder vorhergesagten PPAR-Antwortelementen analysiert.

5.13 Beobachtung der FOXO-Phosphorylierung und Aktivität

- ❖ Die Experimente zur „Beobachtung der FOXO-Phosphorylierung und Aktivität“ erfolgte durch **Dr. Julian Marschner**.

HepG2-Zellen wurden, wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben kultiviert. Bei jeweils einer Passage vor und während der Experimente erfolgte die Kultivierung auf Kollagen G beschichteten Platten (siehe Kapitel 5.4.3).

FOXO-RE-Reporter-Assay

Die Zellen wurden auf Kollagen G beschichtete 96-Well-Platten (3 x 10⁴ Zellen pro Well) in DMEM (siehe Kapitel 5.4.1) ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte der Austausch des Mediums

5. Experimenteller Teil

gegen MEM-Medium, das zusätzlich Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) enthält. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium gegen Opti-MEM ohne Zusätze ausgetauscht, die Zellen mit Lipofectamin 3000 (Invitrogen) transient mit FHRE-Luc (Addgene Plasmid #1789, 12 ng pro Well) und pRL-SV40 (Promega, 1 ng pro Well) transfiziert. Vier Stunden nach vollendeter Transfektion wurden die Zellen mit der Testverbindung (**104** – 20 µM) in MEM, ergänzt mit Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL) und 0,1% DMSO oder mit 0,1% DMSO allein inkubiert. Die Luziferaseaktivität wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inkubation mit dem Dual-Glo-Luciferase Assay System (Promega, gemäß Protokoll) auf einem Tecan-Spark Luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Deutschland) gemessen. Jede Probe wurde in Duplikaten in mindestens drei unabhängigen Experimenten getestet. Zur Berechnung der relativen Lichteinheiten (RLU) wurde die Firefly-Lumineszenz durch die Renilla-Lumineszenz geteilt und mit 1000 multipliziert. Dies diente zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und des Zellwachstums. Anschließend wurde die mittlere RLU der behandelten Proben durch die mittlere RLU der 0,1%igen DMSO-Kontrolle zum jeweiligen Messzeitpunkt geteilt, um die relative FHRE-Aktivität zu erhalten.

Protein-Extraktion, SDS-PAGE und Western-Blot

HEK293T-Zellen wurden in 6-Well-Platten (3 x 10⁵ Zellen pro Well) mit dem in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Medium ausgesät. Nach 24 erfolgte die Inkubation der Zellen mit **104** (20 µM) in Opti-MEM, ergänzt mit Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL) und 0,1% DMSO oder mit dem ergänzten Medium mit Zusätzen ohne **104**. Jede Probe wurde in drei unabhängigen biologischen Wiederholungen hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurden die Zellen geerntet, anschließend bei 1000 g zehn Minuten zentrifugiert und bis zur Weiterverarbeitung als trockene Pellets bei -80 °C eingefroren. Für die Proteinextraktion wurden die Pellets in 100 µL vollständigem Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer (10 mL Pierce RIPA-Puffer) der mit einer Tablette Pierce Protease- und Phosphatase-Inhibitor (ThermoFisher #A32959) ergänzt wurde, vollständig resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension gründlich gevortext, 15 Minuten bei 4 °C und 600 Umdrehungen pro Minute sowie horizontalem Schütteln inkubiert und bei 14.000 g (4 °C, zehn Minuten) zentrifugiert. Nach dieser Prozedur wurde der Überstand geerntet, mit 25 µL 5X Pierce™ Lane Marker reduzierender Probenpuffer (ThermoFisher #39000) vermischt und fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung der Proben bei -80 °C. Die Durchführung der Natrium-

5. Experimenteller Teil

dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat, SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese geschah mit einem 12%-igen Polyacrylamidgel, das mit 15 µL Proteinextrakt bei 100 V für 20 Minuten und 200 V für 40 Minuten in Laufpuffer (25 mM TRIS, 192 nM Glycin, 0,1% w/v, SDS, pH 8,3) beladen war. Das Gel und die Membran wurden zwei Minuten lang in Transferpuffer (125 mM TRIS, 970 mM Glycin) äquilibriert und anschließend das Tank-Blotting des separierten Proteins auf eine methanolaktivierte Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon®-FL PVDF-Membran, Merck, #05317) mit in Transferpuffer getränktem Whattmann-Papier bei 80 V und 4°C über Nacht durchgeführt. Danach erfolgten vier Waschschriffe der PVDF-Membran für zehn Minuten in 0,5% TBST mit anschließender Inkubation in TBST mit 5% BSA und Anti-Phospho-FOXO3a (Ser253)-Antikörper (Cell Signaling Technology #9466, verdünnt 1:1000) oder Anti-GAPDH (Cell Signaling Technology, Klon D16H11, verdünnt 1:1000) über Nacht bei 4 °C. Nach Wiederholung der oben beschriebenen Waschprozedur wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Sigma Aldrich #12-348, verdünnt 1: 4000 in TBST und 5% Magermilch) inkubiert. Anschließend wurde mit TBST gewaschen und die Membran eine Minute in verstärkter Chemilumineszenzlösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,8, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarsäure, 2,6 mM Wasserstoffperoxid) getaucht. Die Ermittlung des Signals erfolgte mit einem ChemiDoc Imaging System (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA).

5.14 Molekulares Docking

❖ Die Experimente zum „Molekularen Docking“ wurden von **Laura Isigkeit** und **Dr. Thomas Wein** durchgeführt.

Molekulares Docking für PPAR γ

Das Molekulare Docking wurde mit der Software Molecular Operating Environment (MOE, Version 2020.09, Chemical Computing Group Inc. Montreal, QC, Canada) durchgeführt. Die Kristallstruktur des PPAR γ -**39**-Komplexes (PDB: 8ATY) diente als Vorlage für das struktur- und dockingbasierte Design von **104**. Die Struktur wurde unter Anwendung von MOE QuickPrep unter Standardeinstellung erstellt und der Protonierungszustand des Komplexes angepasst. Die Vorbereitung von **104** erfolgte unter Anwendung der MOE-Wash-Routine mit dominantem Protonierungszustand bei pH 7,0. Die Koordinaten wurde in 3D neu aufgebaut und die bestehende Chiralität beibehalten. Für alle Docking-Berechnungen dienten folgende Einstellungen: Force Field = Amber10:EHT, Rezeptor = Rezeptor- und Lösungsmittelatome, Site = Ligandenatome

5. Experimenteller Teil

von **39**, Placement = Template mit 100 Posen, Verfeinerung = starrer Rezeptor, Scoring-Funktion = GBVI/WSA dG mit 10 Posen. Die Eignung der Methode wurde durch das Redocking des kristallisierten Liganden **39** an der orthosterischen Stelle (RMSD = 0,39, mittlere RMSD = 1,57, Score = - 8,24) und der allosterischen Stelle (RMSD = 0,18, mittlere RMSD = 1,92, Score = - 8,67) von PPAR γ bestätigt. Durch das Andocken von Pioglitazon (**33**) an den PPAR γ -**104**-Komplex (PDB: 8ATZ¹⁹¹) wurde die mögliche gemeinsame Bindung von **104** und **33** bewertet. Die Durchführung der Vorbereitung und des Dockings geschah wie oben beschrieben. Da im PPAR γ -**104**-Komplex kein Ligand an die orthosterische Stelle gebunden war, wurde die TZA-Wechselwirkungen von Pioglitazon (**33**) mit His323, His449 und Ser289 als Vorlage definiert und der allosterische Ligand diente zur Definition ausgeschlossener Volumina. Beim Vergleich mit dem co-kristallisierten PPAR γ -Pioglitazon(**33**)-Komplex (PDB: 5Y2O²²¹) ergab sich eine RMSD von 3,57 für den experimentell bestimmten Bindungsmodus von **33** und die vorhergesagte Pose im PPAR γ -**104**-Komplex.

Molekulares Docking für Nur77

Basierend auf den Katalogen von SPECS (SPECS Surface Nano Analysis GmbH, Berlin, Deutschland, <https://www.specs-group.com/>) und Enamine (Enamine Ltd., New Jersey, USA, <https://enamine.net/>) wurde mithilfe der Substrukturfilter der CDK- und RDKit-Software in KNIME (Version 4.4.0; KNIME AG, Zürich, Schweiz) eine virtuelle Sammlung von 25.021 kommerziell verfügbaren Derivaten von **41** mit dem *N*-Phenylpiperazin Strukturelement als gemeinsamem Kerngerüst erstellt. Die Berechnung der molekularen Merkmale, Morgan-Fingerabdrücke und Tanimotoähnlichkeit der Screening-Verbindungen erfolgte ebenfalls mit CDK- und RDKit-Software in KNIME.

Die Schrödinger Software Suite (Version 2019-1; Schrödinger Inc., New York, NY, U.S.A.) diente zur Durchführung aller Docking-Berechnungen. Die Moleküle der Screening-Bibliothek wurden durch LigPrep in 3D-Strukturen umgewandelt. Basierend auf dem 2D-SDF-Format wurden Wasserstoffatome hinzugefügt, Ionisierungszustände für pH 7,0 \pm 1,0 erzeugt und Tautomere und Enantiomere generiert. Nach Minimierung der 3D-Konformationen durch confgen²⁵¹ ergaben sich 42.816 Verbindungen für das virtuelle Screening mittels Docking.

Die Nur77-Proteinstrukturen 3v3q⁵⁰, 4jgv¹²⁰ und 6kz5⁸⁶ aus der Proteindatenbank²⁵² wurden für das Docking in Maestro (Schrödinger, LLC, New York, USA) importiert und mit dem Proteinvorbereitungsassistenten vorbereitet. Die Identifizierung der Zentren der Bindungsstellen erfolgte durch die co-kristallisierten Liganden. Mit dem Modul „Receptor Grid Generation“ in Maestro

5. Experimenteller Teil

wurde das Docking-Gitter erstellt. Die Berechnung des Docking erfolgte in Glide²⁵³ (Schrödinger, LLC, New York, USA) durch die Verwendung des Standard-Präzisionsprotokolls (SP), wobei für die abschließende Post-Docking-Minimierung mit zehn (anstelle von fünf) besten Posen und fünf (anstelle von einer) endgültigen Posen gearbeitet wurde. **41** wurde an alle Proteinstrukturen angedockt. Das Docking der virtuellen Sammlung erfolgte nur an die 4jgv⁵⁰-Struktur. Die ermittelten Docking-Scores für die virtuellen Screening-Verbindungen befanden sich in einem Bereich von -9,88 und -2,03.

6. Literatur

1. Mazaira, G. I. *et al.* The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nucl. Recept. Res.* **5**, (2018).
2. Ottow, E. & Weinmann, H. Nuclear receptors as drug targets: A historical perspective of modern drug discovery. *Nucl. Recept. as Drug Targets* **39**, 1–23 (2008).
3. Hollenberg, Stanly. M Weinberger, C. *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635–641 (1985).
4. Skerrett, R., Malm, T. & Landreth, G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* **72**, 104–116 (2014).
5. Willems, S., Zaienne, D. & Merk, D. Targeting Nuclear Receptors in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *J. Med. Chem.* **64**, 9592–9638 (2021).
6. Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell* **157**, 255–266 (2014).
7. Weikum, E. R., Liu, X. & Ortlund, E. A. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci.* **27**, 1876–1892 (2018).
8. Meijer, F. A., Leijten-van de Gevel, I. A., de Vries, R. M. J. M. & Brunsveld, L. Allosteric small molecule modulators of nuclear receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **485**, 20–34 (2019).
9. Östberg, T. *et al.* A New Class of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Agonists with a Novel Binding Epitope Shows Antidiabetic Effects. *J. Biol. Chem.* **279**, 41124–41130 (2004).
10. Leijten-van de Gevel, I. A. *et al.* Indazole MRL-871 interacts with PPAR γ via a binding mode that induces partial agonism. *Bioorg. Med. Chem.* **68**, (2022).
11. Committee, N. R. N. A Unified Nomenclature System for. *Cell* **97**, 161–163 (1999).
12. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).
13. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* **81**, 1269–1304 (2001).
14. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121–141 (2000).
15. Wärnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. H. & Gustafsson, J. Å. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1901–1909 (2003).
16. Luisi, B. F. *et al.* Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nat. 1991 3526335* **352**, 497–505 (1991).

6. Literatur

17. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 685–704 (2006).
18. Zilliacus, J., Carlstedt-duke, J. A. N., Gustafsson, J. & Wright, A. P. H. Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. **91**, 4175–4179 (1994).
19. Gronemeyer, H. & Moras, D. Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature* **375**, 190–191 (1995).
20. Wurtz, J.-M. *et al.* Ligand Binding Domain of Nuclear Receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **3**, 1996 (1996).
21. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nat.* 1995 3756530 **375**, 377–382 (1995).
22. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* **81**, 1269–1304 (2001).
23. Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-Jones, K. D. & Miura, M. T. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.160308> **69**, 201–220 (2007).
24. Gallastegui, N., Mackinnon, J. A. G., Fletterick, R. J. & Estébanez-Perpiña, E. Advances in our structural understanding of orphan nuclear receptors. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 25–35 (2015).
25. Rastinejad, F., Huang, P., Chandra, V. & Khorasanizadeh, S. Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J. Mol. Endocrinol.* **51**, (2013).
26. Li, Y., Lambert, M. H. & Xu, H. E. Activation of Nuclear Receptors: A Perspective from Structural Genomics. *Structure* **11**, 741–746 (2003).
27. Weatherman, R. V., Fletterick, R. J. & Scanlan, T. S. Nuclear-receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 559–581 (1999).
28. Wurtz, J. M. *et al.* A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 87–94 (1996).
29. Savkur, R. S., Bramlett, K. S., Clawson, D. & Burris, T. P. Pharmacology of Nuclear Receptor-Coregulator Recognition. *Vitam. Horm.* **68**, 145–183 (2004).
30. Millard, C. J., Watson, P. J., Fairall, L. & Schwabe, J. W. R. An evolving understanding of nuclear receptor coregulator proteins. *J. Mol. Endocrinol.* **51**, T23 (2013).
31. Merk, D. *et al.* Molecular tuning of farnesoid X receptor partial agonism. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
32. Moras, D. G. H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function Dino

6. Literatur

- Moras * and Hinrich Gronemeyert I-IAT. *Cell Biol.* **10**, 384–391 (1998).
33. Berg, K. A. & Clarke, W. P. Making sense of pharmacology: Inverse agonism and functional selectivity. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **21**, 962–977 (2018).
 34. Moore, T. W., Mayne, C. G. & Katzenellenbogen, J. A. Minireview: Not picking pockets: Nuclear receptor alternate-site modulators (NRAMs). *Mol. Endocrinol.* **24**, 683–695 (2010).
 35. Caboni, L. & Lloyd, D. G. Beyond the ligand-binding pocket: targeting alternate sites in nuclear receptors. *Med. Res. Rev.* **33**, 1081–1118 (2013).
 36. Lu, S., Li, S. & Zhang, J. Harnessing allosterity: a novel approach to drug discovery. *Med. Res. Rev.* **34**, 1242–1285 (2014).
 37. Nussinov, R. & Tsai, C. J. Allosterity in disease and in drug discovery. *Cell* **153**, 293–305 (2013).
 38. Huang, W. *et al.* Allosite: a method for predicting allosteric sites. *Bioinformatics* **29**, 2357–2359 (2013).
 39. Huang, W. *et al.* ASBench: benchmarking sets for allosteric discovery. *Bioinformatics* **31**, 2598–2600 (2015).
 40. Abelson, J. N. & Simon, M. I. *Methods in Enzymology Volume 493, Fragment-Based Drug Design: Tools, Practical Approaches, and Examples.* (2011).
 41. Erlanson, D. A., Wells, J. A. & Braisted, A. C. Tethering: fragment-based drug discovery. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 199–223 (2004).
 42. Tipps, M. E., Lawshe, J. E., Ellington, A. D. & Mihic, S. J. Identification of novel specific allosteric modulators of the glycine receptor using phage display. *J. Biol. Chem.* **285**, 22840–22845 (2010).
 43. Meijer, F. A., Van Den Oetelaar, M. C. M., Doveston, R. G., Sampers, E. N. R. & Brunsveld, L. Covalent Occlusion of the ROR γ Ligand Binding Pocket Allows Unambiguous Targeting of an Allosteric Site. *ACS Med. Chem. Lett.* **12**, 631–639 (2021).
 44. Hughes, T. S. *et al.* An alternate binding site for PPAR γ ligands. *Nat. Commun.* **2014 515**, 1–13 (2014).
 45. Meyer, U., Costantino, G., Macchiarulo, A. & Pellicciari, R. Is antagonism of E/Z-guggulsterone at the farnesoid X receptor mediated by a noncanonical binding site? A molecular modeling study. *J. Med. Chem.* **48**, 6948–6955 (2005).
 46. Musille, P. M. *et al.* Antidiabetic phospholipid-nuclear receptor complex reveals the mechanism for phospholipid-driven gene regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 532–537 (2012).
 47. Delfosse, V. *et al.* Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

6. Literatur

- U. S. A.* **109**, 14930–14935 (2012).
48. Scheepstra, M. *et al.* Identification of an allosteric binding site for ROR γ t inhibition. *Nat. Commun.* **2015 6** **16**, 1–10 (2015).
 49. YOON, H. S., RAJAN, S., TOH, H. T., LIU, X. & YAO, H. CO-CRYSTALS OF NURR1-LBD IN COMPLEX WITH A CYCLOPENTENONE PROSTAGLANDIN AND MODULATORS OF NURR1. (2018).
 50. Zhan, Y. Y. *et al.* The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 897–904 (2012).
 51. Chen, L. *et al.* Sulindac-derived RXR α modulators inhibit cancer cell growth by binding to a novel site of RXR α . *Chem. Biol.* **21**, 596 (2014).
 52. Biron, E. & Bédard, F. Recent progress in the development of protein-protein interaction inhibitors targeting androgen receptor-coactivator binding in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **161**, 36–44 (2016).
 53. Scheepstra, M. *et al.* Identification of an allosteric binding site for ROR γ t inhibition. *Nat. Commun.* **2015 6** **16**, 1–10 (2015).
 54. Wang, Y., Kumar, N., Crumbley, C., Griffin, P. R. & Burris, T. P. A Second Class of Nuclear Receptors for Oxysterols: Regulation of ROR α and ROR γ activity by 24S-Hydroxycholesterol (Cerebrosterol). *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 917 (2010).
 55. Solt, L. A. *et al.* Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* **472**, 491–494 (2011).
 56. Montarolo, F. *et al.* Altered NR4A Subfamily Gene Expression Level in Peripheral Blood of Parkinson's and Alzheimer's Disease Patients. doi:10.1007/s12640-016-9626-4.
 57. Law, S. W., Conneely, O. M., Demayo, J. & O'malley, B. W. Identification of a New Brain-Specific Transcription Factor, NURRI. (1992).
 58. Safe, S. *et al.* Nuclear receptor 4A (NR4A) family – orphans no more. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **157**, 48–60 (2016).
 59. Xiao, Q., Castillo, S. O. & Nikodem, V. M. Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors Nurr1 and Nur77 (NGFI-B) in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience* **75**, 221–230 (1996).
 60. Kon, T. *et al.* Localization of nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3) in Lewy body disease and multiple system atrophy. *Neuropathology* **35**, 503–509 (2015).
 61. Maheux, J., Éthier, I., Rouillard, C. & Lévesque, D. Induction Patterns of Transcription Factors of the Nur Family (Nurr1, Nur77, and Nor-1) by Typical and Atypical Antipsychotics in the Mouse Brain: Implication for Their Mechanism of Action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 460–

6. Literatur

- 473 (2005).
62. Benoit, G. *et al.* International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 798–836 (2006).
 63. Maira, M., Martens, C., Philips, A. & Drouin, J. Heterodimerization between Members of the Nur Subfamily of Orphan Nuclear Receptors as a Novel Mechanism for Gene Activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7549–7557 (1999).
 64. Paulsen, R. E., Granås, K., Johnsen, H., Rolseth, V. & Sterri, S. Three related brain nuclear receptors, NGFI-B, Nurr1, and NOR-1, as transcriptional activators. *J. Mol. Neurosci.* **6**, 249–255 (1995).
 65. 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).
 66. Gilbert, F. *et al.* Nur77 Gene Knockout Alters Dopamine Neuron Biochemical Activity and Dopamine Turnover. *Biol. Psychiatry* **60**, 538–547 (2006).
 67. Éthier, I., Kagechika, H., Shudo, K., Rouillard, C. & Lévesque, D. Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: Involvement of Nur77 and retinoid receptors. *Biol. Psychiatry* **56**, 522–526 (2004).
 68. Mahmoudi, S. *et al.* Nur77 mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid. *Neurobiol. Dis.* **36**, 213–222 (2009).
 69. Mount, M. P. *et al.* Perturbation of Transcription Factor Nur77 Expression Mediated by Myocyte Enhancer Factor 2D (MEF2D) Regulates Dopaminergic Neuron Loss in Response to 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *J. Biol. Chem.* **288**, 14362–14371 (2013).
 70. McKinsey, T. A., Chun Li Zhang & Olson, E. N. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 497–504 (2001).
 71. Heidenreich, K. A. & Linseman, D. A. Myocyte enhancer factor-2 transcription factors in neuronal differentiation and survival. *Mol. Neurobiol.* **29**, 155–165 (2004).
 72. Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M. & Greenberg, M. E. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* **286**, 785–790 (1999).
 73. She, H. *et al.* Direct regulation of complex I by mitochondrial MEF2D is disrupted in a mouse model of Parkinson disease and in human patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 930–940 (2011).
 74. Liu, T. Y., Yang, X. Y., Zheng, L. T., Wang, G. H. & Zhen, X. C. Activation of Nur77 in microglia attenuates proinflammatory mediators production and protects dopaminergic neurons from inflammation-induced cell death. *J. Neurochem.* **140**, 589–604 (2017).
 75. Yan, J. *et al.* Nur77 attenuates inflammatory responses and oxidative stress by inhibiting

6. Literatur

- phosphorylated I κ B- α in Parkinson's disease cell model. *Aging (Albany, NY)*. **12**, 8107–8119 (2020).
76. Rouillard, C. *et al.* Genetic disruption of the nuclear receptor Nur77 (Nr4a1) in rat reduces dopamine cell loss and L-Dopa-induced dyskinesia in experimental Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **304**, 143–153 (2018).
77. Liebmann, M. *et al.* Nur77 serves as a molecular brake of the metabolic switch during T cell activation to restrict autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E8017–E8026 (2018).
78. Rothe, T. *et al.* The Nuclear Receptor Nr4a1 Acts as a Microglia Rheostat and Serves as a Therapeutic Target in Autoimmune-Driven Central Nervous System Inflammation. *J. Immunol.* **198**, 3878–3885 (2017).
79. Zhao, Y., Liu, Y. & Zheng, D. Alpha 1-antichymotrypsin/SerpinA3 is a novel target of orphan nuclear receptor Nur77. *FEBS J.* **275**, 1025–1038 (2008).
80. Wang, L., Zheng, Y., Gao, X., Liu, Y. & You, X. Retinoid X receptor ligand regulates RXR α /Nur77-dependent apoptosis via modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **10**, 10770 (2017).
81. Wei, X. *et al.* Contra-directional Coupling of Nur77 and Nurr1 in Neurodegeneration: A Novel Mechanism for Memantine-Induced Anti-inflammation and Anti-mitochondrial Impairment. *Mol. Neurobiol.* **53**, 5876–5892 (2016).
82. Popichak, K. A. *et al.* Compensatory Expression of Nur77 and Nurr1 Regulates NF- κ B-Dependent Inflammatory Signaling in Astrocytes. *Mol. Pharmacol.* **94**, 1174 (2018).
83. Bateman, A. *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, D480–D489 (2021).
84. Camacho, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, (2009).
85. Munoz-Tello, P. *et al.* Assessment of NR4A Ligands That Directly Bind and Modulate the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *J. Med. Chem.* **63**, 15639–15654 (2020).
86. Yang, P. B. *et al.* Blocking PPAR γ interaction facilitates Nur77 interdiction of fatty acid uptake and suppresses breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 27412–27422 (2020).
87. Li, L. *et al.* Impeding the interaction between Nur77 and p38 reduces LPS-induced inflammation. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 339–346 (2015).
88. Chu, Y. *et al.* Nurr1 in Parkinson's disease and related disorders. *J. Comp. Neurol.* **494**, 495–514 (2006).
89. Decressac, M. *et al.* α -synuclein-induced down-regulation of Nurr1 disrupts GDNF signaling in nigral dopamine neurons. *Sci. Transl. Med.* **4**, (2012).

6. Literatur

90. Volakakis, N. *et al.* Nurr1 and Retinoid X Receptor Ligands Stimulate Ret Signaling in Dopamine Neurons and Can Alleviate α -Synuclein Disrupted Gene Expression. *J. Neurosci.* **35**, 14370–14385 (2015).
91. Volakakis, N. *et al.* NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12317–12322 (2010).
92. Liu, W., Gao, Y. & Chang, N. Nurr1 overexpression exerts neuroprotective and anti-inflammatory roles via down-regulating CCL2 expression in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 1312–1319 (2017).
93. Wang, X. *et al.* The lentiviral-mediated Nurr1 genetic engineering mesenchymal stem cells protect dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Am. J. Transl. Res.* **10**, 1583 (2018).
94. Saijo, K. *et al.* A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell* **137**, 47–59 (2009).
95. Yi, S. H. *et al.* Foxa2 acts as a co-activator potentiating expression of the Nurr1-induced DA phenotype via epigenetic regulation. *Development* **141**, 761–772 (2014).
96. Kim, C. H. *et al.* Nuclear receptor Nurr1 agonists enhance its dual functions and improve behavioral deficits in an animal model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 8756–8761 (2015).
97. Rajan, S. *et al.* PGE1 and PGA1 bind to Nurr1 and activate its transcriptional function. *Nat. Chem. Biol.* **2020 168 16**, 876–886 (2020).
98. Bruning, J. M. *et al.* Covalent Modification and Regulation of the Nuclear Receptor Nurr1 by a Dopamine Metabolite. *Cell Chem. Biol.* **26**, 674–685.e6 (2019).
99. Smith, G. A. *et al.* A Nurr1 Agonist Causes Neuroprotection in a Parkinson's Disease Lesion Model Primed with the Toll-Like Receptor 3 dsRNA Inflammatory Stimulant Poly(I:C). *PLoS One* **10**, e0121072 (2015).
100. Friling, S., Bergsland, M. & Kjellander, S. Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* **10**, 1–8 (2009).
101. Wang, J. *et al.* Selective brain penetrable Nurr1 transactivator for treating Parkinson's disease. *Oncotarget* **7**, 7469–7479 (2016).
102. Spathis, A. D. *et al.* Nurr1:RXR α heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 3999–4004 (2017).
103. Loppi, S. *et al.* HX600, a synthetic agonist for RXR-Nurr1 heterodimer complex, prevents ischemia-induced neuronal damage. *Brain. Behav. Immun.* **73**, 670–681 (2018).
104. Terzioglu-Usak, S., Negis, Y., Karabulut, D. S., Zaim, M. & Isik, S. Cellular Model of Alzheimer's

6. Literatur

- Disease: A β 1-42 Peptide Induces Amyloid Deposition and a Decrease in Topo Isomerase II β and Nurr1 Expression. *Curr. Alzheimer Res.* **14**, 636–644 (2017).
105. Parra-Damas, A. *et al.* Crtc1 Activates a Transcriptional Program Deregulated at Early Alzheimer's Disease-Related Stages. *J. Neurosci.* **34**, 5776–5787 (2014).
 106. Moon, M. *et al.* Correlation between orphan nuclear receptor Nurr1 expression and amyloid deposition in 5XFAD mice, an animal model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **132**, 254–262 (2015).
 107. Moon, M. *et al.* Nurr1 (NR4A2) regulates Alzheimer's disease-related pathogenesis and cognitive function in the 5XFAD mouse model. *Aging Cell* **18**, e12866 (2019).
 108. Montarolo, F., Martire, S., Perga, S. & Bertolotto, A. NURR1 Impairment in Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 4858 **20**, 4858 (2019).
 109. Montarolo, F. *et al.* Effects of Isoxazolo-Pyridinone 7e, a Potent Activator of the Nurr1 Signaling Pathway, on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *PLoS One* **9**, e108791 (2014).
 110. Montarolo, F., Perga, S., Martire, S. & Bertolotto, A. Nurr1 reduction influences the onset of chronic EAE in mice. *Inflamm. Res.* **64**, 841–844 (2015).
 111. Saini, A., Mahajan, S. & Gupta, P. Nuclear receptor expression atlas in BMDCs: Nr4a2 restricts immunogenicity of BMDCs and impedes EAE. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1842–1853 (2016).
 112. Raveney, B. J. E., Oki, S. & Yamamura, T. Nuclear Receptor NR4A2 Orchestrates Th17 Cell-Mediated Autoimmune Inflammation via IL-21 Signalling. *PLoS One* **8**, e56595 (2013).
 113. Pönniö, T. & Conneely, O. M. nor-1 Regulates Hippocampal Axon Guidance, Pyramidal Cell Survival, and Seizure Susceptibility. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9070–9078 (2004).
 114. Ferrán, B. *et al.* The nuclear receptor NOR-1 regulates the small muscle protein, X-linked (SMPX) and myotube differentiation. *Sci. Reports 2016 61* **6**, 1–11 (2016).
 115. Kon, T. *et al.* Localization of nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3) in Lewy body disease and multiple system atrophy. *Neuropathology* **35**, 503–509 (2015).
 116. Chio, C. C. *et al.* Neuron-derived orphan receptor 1 transduces survival signals in neuronal cells in response to hypoxia-induced apoptotic insults. *J. Neurosurg.* **124**, 1654–1664 (2016).
 117. Zhan, Y. *et al.* Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* 2008 **4**, 548–556 (2008).
 118. Liu, J. J. *et al.* A unique pharmacophore for activation of the nuclear orphan receptor Nur77 in vivo and in vitro. *Cancer Res.* **70**, 3628–3637 (2010).
 119. Kanteev, M., Goldfeder, M., Chojnacki, M., Adir, N. & Fishman, A. The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 895–903 (2013).

6. Literatur

120. Wang, W. jia *et al.* Orphan nuclear receptor TR3 acts in autophagic cell death via mitochondrial signaling pathway. *Nat. Chem. Biol.* 2013 102 **10**, 133–140 (2013).
121. Wang, W. J. *et al.* Induction of Autophagic Death in Cancer Cells by Agonizing TR3 and Attenuating Akt2 Activity. *Chem. Biol.* **22**, 1040–1051 (2015).
122. Hu, M. *et al.* Celastrol-Induced Nur77 Interaction with TRAF2 Alleviates Inflammation by Promoting Mitochondrial Ubiquitination and Autophagy. *Mol. Cell* **66**, 141-153.e6 (2017).
123. Jung, Y. S. *et al.* Dual targeting of Nur77 and AMPK α by isoalantolactone inhibits adipogenesis in vitro and decreases body fat mass in vivo. *Int. J. Obes.* 2018 435 **43**, 952–962 (2018).
124. Vinayavekhin, N. & Saghatelian, A. Discovery of a protein-metabolite interaction between unsaturated fatty acids and the nuclear receptor Nur77 Using a metabolomics approach. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17168–17171 (2011).
125. Lakshmi, S. P., Reddy, A. T., Banno, A. & Reddy, R. C. Molecular, chemical, and structural characterization of prostaglandin A2 as a novel agonist for Nur77. *Biochem. J.* **476**, 2757–2767 (2019).
126. Willems, S. *et al.* The orphan nuclear receptor Nurr1 is responsive to non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Commun. Chem.* 2020 31 **3**, 1–12 (2020).
127. Munoz-Tello, P. *et al.* Assessment of NR4A Ligands That Directly Bind and Modulate the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *J. Med. Chem.* (2020) doi:10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C00894.
128. Willems, S., Ohrndorf, J., Kilu, W., Heering, J. & Merk, D. Fragment-like Chloroquinolineamines Activate the Orphan Nuclear Receptor Nurr1 and Elucidate Activation Mechanisms. *J. Med. Chem.* **64**, 2659–2668 (2021).
129. De Vera, I. M. S. *et al.* Identification of a Binding Site for Unsaturated Fatty Acids in the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1795–1799 (2016).
130. Zhan, Y. Y. *et al.* The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat. Chem. Biol.* 2012 811 **8**, 897–904 (2012).
131. Lesuisse, D. *et al.* Development of a novel NURR1/NOT agonist from hit to lead and candidate for the potential treatment of Parkinson's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 929–932 (2019).
132. Almario Garcia, A.; Lardenois, P.; Olivier, A. 2-ARYL-6-PHENYLIMIDAZO[1,2- α]PYRIDINE DERIVATIVES, PREPARATION THEREOF AND THERAPEUTIC USE THEREOF. *Sanofi-Aventis WO2008/034*, (2007).
133. Malanda, A. *et al.* Data on synthesis, ADME and pharmacological properties and early safety

6. Literatur

- pharmacology evaluation of a series of novel NURR1/NOT agonist potentially useful for the treatment of Parkinson's disease. *Data Br.* **27**, 104057 (2019).
134. Dubois, C., Hengerer, B. & Mattes, H. Identification of a Potent Agonist of the Orphan Nuclear Receptor Nurr1. *ChemMedChem* **1**, 955–958 (2006).
 135. Hintermann, S. *et al.* Identification of a series of highly potent activators of the Nurr1 signaling pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 193–196 (2007).
 136. Ordentlich, P., Yan, Y., Zhou, S. & Heyman, R. A. Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1. *J. Biol. Chem.* **278**, 24791–24799 (2003).
 137. 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).
 138. Ishizawa, M., Kagechika, H. & Makishima, M. NR4A nuclear receptors mediate carnitine palmitoyltransferase 1A gene expression by the rexinoid HX600. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 780–785 (2012).
 139. McFarland, K. *et al.* Low dose bexarotene treatment rescues dopamine neurons and restores behavioral function in models of Parkinson's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 1430–1438 (2013).
 140. Wansa, K. D. S. A., Harris, J. M., Yan, G., Ordentlich, P. & Muscat, G. E. O. The AF-1 Domain of the Orphan Nuclear Receptor NOR-1 Mediates Trans-activation, Coactivator Recruitment, and Activation by the Purine Anti-metabolite 6-Mercaptopurine. *J. Biol. Chem.* **278**, 24776–24790 (2003).
 141. Kagaya, S. *et al.* Prostaglandin A2 acts as a transactivator for NOR1 (NR4A3) within the nuclear receptor superfamily. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1603–1607 (2005).
 142. Michalik, L. *et al.* International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 726–741 (2006).
 143. Desvergne, B. & Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **20**, 649–688 (1999).
 144. Lehrke, M. & Lazar, M. A. The many faces of PPARgamma. *Cell* **123**, 993–999 (2005).
 145. 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).
 146. Barak, Y. *et al.* PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
 147. Imai, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4543–

6. Literatur

- 4547 (2004).
148. Ribon, V., Printen, J. A., Hoffman, N. G., Kay, B. K. & Saltiel, A. R. A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 872–879 (1998).
 149. Kim, H. *et al.* Thiazolidinediones improve insulin sensitivity in adipose tissue and reduce the hyperlipidaemia without affecting the hyperglycaemia in a transgenic model of type 2 diabetes. *Diabetologia* **47**, 2215–2225 (2004).
 150. Monsalve, F. A., Pyarasani, R. D., Delgado-Lopez, F. & Moore-Carrasco, R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.* **2013**, 1–18 (2013).
 151. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941–946 (2001).
 152. Duez, H., Fruchart, J. C. & Staels, B. PPARs in inflammation, atherosclerosis and thrombosis. *J. Cardiovasc. Risk* **8**, 187–194 (2001).
 153. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G. A., Thomazy, V. A. & Evans, R. M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**, 241–252 (1998).
 154. Kawahito, Y. *et al.* 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ2 induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Clin. Invest.* **106**, 189 (2000).
 155. Chinetti, G. *et al.* Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* **273**, 25573–25580 (1998).
 156. Chinetti, G., Fruchart, J. C. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* **49**, 497–505 (2000).
 157. Huang, J. T. *et al.* Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nat.* 1999 4006742 **400**, 378–382 (1999).
 158. Moreno, S., Farioli-vecchioli, S. & Cerù, M. P. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* **123**, 131–145 (2004).
 159. Roth, A. D. *et al.* PPAR gamma activators induce growth arrest and process extension in B12 oligodendrocyte-like cells and terminal differentiation of cultured oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **72**, 425–435 (2003).
 160. Bernardo, A., Bianchi, D., Magnaghi, V. & Minghetti, L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists promote differentiation and antioxidant defenses of

6. Literatur

- oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 797–808 (2009).
161. Gellrich, L. *et al.* L-Thyroxin and the Nonclassical Thyroid Hormone TETRAC Are Potent Activators of PPAR α . *J. Med. Chem.* **63**, 6727–6740 (2020).
162. Proschak, E., Heitel, P., Kalinowsky, L. & Merk, D. Opportunities and Challenges for Fatty Acid Mimetics in Drug Discovery. (2017) doi:10.1021/ACS.JMEDCHEM.6B01287.
163. Wahli, W. & Michalik, L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 351–363 (2012).
164. Brown, P. J. *et al.* Identification of a subtype selective human PPAR α agonist through parallel-array synthesis. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **11**, 1225–1227 (2001).
165. Henke, B. R. *et al.* N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR γ agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J. Med. Chem.* **41**, 5020–5036 (1998).
166. Cobb, J. E. *et al.* N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR γ agonists. 3. Structure-activity relationship and optimization of the N-aryl substituent. *J. Med. Chem.* **41**, 5055–5069 (1998).
167. Collins, J. L. *et al.* N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR γ agonists. 2. Structure-activity relationship and optimization of the phenyl alkyl ether moiety. *J. Med. Chem.* **41**, 5037–5054 (1998).
168. Berger, J. *et al.* Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and PPAR δ ligands produce distinct biological effects. *J. Biol. Chem.* **274**, 6718–6725 (1999).
169. Santilli, A. A., Scotese, A. C. & Tomarelli, R. M. A potent antihypercholesterolemic agent: [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14643). *Experientia* **30**, 1110–1111 (1974).
170. 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).
171. Pollinger, J. *et al.* Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation. *J. Med. Chem.* **62**, 2112–2126 (2019).
172. Brown, K. K. *et al.* A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* **48**, 1415–1424 (1999).
173. Hanke, T. *et al.* A selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor γ with an unprecedented binding mode. *J. Med. Chem.* **63**, 4555–4561 (2020).
174. 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).

6. Literatur

175. Willson, T. M. *et al.* The structure - Activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor γ agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J. Med. Chem.* **39**, 665–668 (1996).
176. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953–12956 (1995).
177. Tolman, K. G. The safety of thiazolidinediones. *Expert Opin. Drug Saf.* **10**, 419–428 (2011).
178. Montaigne, D., Butruille, L. & Staels, B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat. Rev. Cardiol.* **18**, 809–823 (2021).
179. Francque, S. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: the role of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 24–39 (2021).
180. Kroker, A. J. & Bruning, J. B. Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. *PPAR Res.* **2015**, (2015).
181. Nolte, R. T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* **395**, 137–143 (1998).
182. Li, Y. *et al.* Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 865 (2008).
183. Tomioka D., Hashimoto H., Sato M. & Shimizu T. RCSB PDB - 3B0R: Human PPAR gamma ligand binding domain complexed with GW9662 in a covalent bonded form. *Protein Data Bank* <https://www.rcsb.org/structure/3b0r> (2011) doi:10.2210/pdb3B0R/pdb.
184. Willems, S. *et al.* Endogenous vitamin E metabolites mediate allosteric PPAR γ activation with unprecedented co-regulatory interactions. *Cell Chem. Biol.* **28**, 1489-1500.e8 (2021).
185. 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).
186. Hughes, T. S. *et al.* Probing the Complex Binding Modes of the PPAR γ Partial Agonist 2-Chloro-N-(3-chloro-4-((5-chlorobenzo[d]thiazol-2-yl)thio)phenyl)-4-(trifluoromethyl)benzenesulfonamide (T2384) to Orthosteric and Allosteric Sites with NMR Spectroscopy. *J. Med. Chem.* **59**, 10335–10341 (2016).
187. Itoh, T. *et al.* Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 924–931 (2008).
188. Bruning, J. B. *et al.* Partial agonists activate PPAR γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure* **15**, 1258–1271 (2007).
189. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **45**, D353–D361 (2017).
190. Ogata, H. *et al.* KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 29–

6. Literatur

- 34 (1999).
191. Arifi, S. *et al.* Targeting the Alternative Vitamin E Metabolite Binding Site Enables Noncanonical PPAR γ Modulation. *J. Am. Chem. Soc.* **145**, (2023).
192. Arifi, S. *et al.* Fragment-based discovery of orphan nuclear receptor Nur77/NGFI-B ligands. *Bioorg. Chem.* **129**, 106164 (2022).
193. Zaienne, D., Arifi, S., Marschner, J. A., Heering, J. & Merk, D. Druggability Evaluation of the Neuron Derived Orphan Receptor (NOR-1) Reveals Inverse NOR-1 Agonists. **202200259**, 1–5 (2022).
194. Prestwick Drug-Fragment Library - Prestwick Chemical Libraries. <https://www.prestwickchemical.com/screening-libraries/prestwick-drug-fragment-library/>.
195. Budzyński, M. A., Puustinen, M. C., Joutsen, J. & Sistonen, L. Uncoupling Stress-Inducible Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 from Its Activation. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 2530 (2015).
196. Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**, 563–564 (1988).
197. Willems, S. *et al.* Nurr1 Modulation Mediates Neuroprotective Effects of Statins. *Adv. Sci.* **9**, 2104640 (2022).
198. Faudone, G. *et al.* Propranolol Activates the Orphan Nuclear Receptor TLX to Counteract Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells. *J. Med. Chem.* **64**, 8727–8738 (2021).
199. Meijer, I. *et al.* Chemical Starting Matter for HNF4 α Ligand Discovery and Chemogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–11 (2020).
200. Hopkins, A. L., Keserü, G. M., Leeson, P. D., Rees, D. C. & Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 105–121 (2014).
201. Wu, L. & Chen, L. Characteristics of Nur77 and its ligands as potential anticancer compounds (Review). *Mol. Med. Rep.* **18**, 4793–4801 (2018).
202. Boudreaux, S. P., Ramirez-Herrick, A. M., Duren, R. P. & Conneely, O. M. Genome-wide profiling reveals transcriptional repression of MYC as a core component of NR4A tumor suppression in acute myeloid leukemia. *Oncogenesis* **1**, e19 (2012).
203. Call, S. G. *et al.* Targeting Oncogenic Super Enhancers in MYC-Dependent AML Using a Small Molecule Activator of NR4A Nuclear Receptors. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
204. Duren, R. P., Boudreaux, S. P. & Conneely, O. M. Genome Wide Mapping of NR4A Binding Reveals Cooperativity with ETS Factors to Promote Epigenetic Activation of Distal Enhancers in Acute Myeloid Leukemia Cells. *PLoS One* **11**, e0150450 (2016).
205. Itoh, T. *et al.* Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 924 (2008).

6. Literatur

206. Bruning, J. B. *et al.* Partial agonists activate PPAR γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure* **15**, 1258–1271 (2007).
207. Meijer, F. A., Leijten-van de Gevel, I. A., de Vries, R. M. J. M. & Brunsveld, L. Allosteric small molecule modulators of nuclear receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **485**, 20–34 (2019).
208. Jang, J. Y. *et al.* Structural Basis for the Enhanced Anti-Diabetic Efficacy of Lobeglitazone on PPAR γ . *Sci. Rep.* **8**, 31 (2018).
209. Santilli, A. A., Scotese, A. C. & Tomarelli, R. M. A potent antihypercholesterolemic agent: [4-chloro-6-(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14643). *Experientia* **30**, 1110–1111 (1974).
210. Patai, S. The chemistry of the ether linkage. 785 (1967).
211. Feuer, H. & Hooz, J. Methods of formation of the ether linkage. *Ether Link.* 445–498 (2010) doi:10.1002/9780470771075.CH10.
212. Dueno, E. E., Chu, F., Kim, S. I. & Kyung Woon Jung. Cesium promoted O-alkylation of alcohols for the efficient ether synthesis. *Tetrahedron Lett.* **40**, 1843–1846 (1999).
213. Swamy, K. C. K., Kumar, N. N. B., Balaraman, E. & Kumar, K. V. P. P. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem. Rev.* **109**, 2551–2651 (2009).
214. Choi, J. H. *et al.* Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5. *Nature* **466**, 451–456 (2010).
215. de Vink, P. J. *et al.* Cooperativity as quantification and optimization paradigm for nuclear receptor modulators. *Chem. Sci.* **13**, 2744–2752 (2022).
216. Shang, J. *et al.* A molecular switch regulating transcriptional repression and activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* **2020 111 11**, 1–14 (2020).
217. Chrisman, I. M. *et al.* Defining a conformational ensemble that directs activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* **9**, 1794 (2018).
218. Zheng, J. *et al.* Chemical Crosslinking Mass Spectrometry Reveals the Conformational Landscape of the Activation Helix of PPAR γ ; a Model for Ligand-Dependent Antagonism. *Structure* **26**, 1431-1439.e6 (2018).
219. Shang, J. & Kojetin, D. J. Structural mechanism underlying ligand binding and activation of PPAR γ . *Structure* **29**, 940-950.e4 (2021).
220. Heidari, Z. *et al.* Definition of functionally and structurally distinct repressive states in the nuclear receptor PPAR γ . doi:10.1038/s41467-019-13768-0.
221. Lee, M. A., Tan, L., Yang, H., Im, Y. G. & Im, Y. J. Structures of PPAR γ complexed with lobeglitazone and pioglitazone reveal key determinants for the recognition of antidiabetic drugs. *Sci. Rep.* **7**, (2017).

6. Literatur

222. Kilu, W., Merk, D., Steinhilber, D., Proschak, E. & Heering, J. Heterodimer formation with retinoic acid receptor RXR α modulates coactivator recruitment by peroxisome proliferator-activated receptor PPAR γ . *J. Biol. Chem.* **297**, 297–298 (2021).
223. Wolbank, S. *et al.* Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: A comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng.* **13**, 1173–1183 (2007).
224. Carlson, M. org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human. R package version 3.12.0 at (2020).
225. Fang, L. *et al.* PPARgene: A Database of Experimentally Verified and Computationally Predicted PPAR Target Genes. *PPAR Res.* **2016**, (2016).
226. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. & Rishi, A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 1978–1986 (2011).
227. Lee, S. & Dong, H. H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J. Endocrinol.* **233**, R67–R79 (2017).
228. Accili, D. & Arden, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117**, 421–426 (2004).
229. Eijkelenboom, A. & Burgering, B. M. T. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 83–97 (2013).
230. Farhan, M. *et al.* FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 815–827 (2017).
231. Vogt, P. K., Jiang, H. & Aoki, M. Triple layer control: Phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle* **4**, 908–913 (2005).
232. Van Der Horst, A. *et al.* FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2/SIRT1. *J. Biol. Chem.* **279**, 28873–28879 (2004).
233. Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).
234. Willems, S. & Merk, D. Medicinal Chemistry and Chemical Biology of Nurr1 Modulators: An Emerging Strategy in Neurodegeneration. *Journal of Medicinal Chemistry* vol. 65 9548–9563 at <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00585> (2022).
235. Wang, X. *et al.* FoxO mediates APP-induced AICD-dependent cell death. *Cell Death Dis.* **2014** *5*, e1233–e1233 (2014).
236. Siegrist, S. E., Haque, N. S., Chen, C. H., Hay, B. A. & Hariharan, I. K. Inactivation of both Foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in Drosophila. *Curr. Biol.* **20**, 643–648 (2010).

6. Literatur

237. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
238. 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).
239. McCoy, A. J. Acknowledging Errors: Advanced Molecular Replacement with Phaser. *Methods Mol. Biol.* **1607**, 421–453 (2017).
240. Casañal, A., Lohkamp, B. & Emsley, P. Current developments in Coot for macromolecular model building of Electron Cryo-microscopy and Crystallographic Data. *Protein Sci.* **29**, 1069–1078 (2020).
241. Kovalevskiy, O., Nicholls, R. A., Long, F., Carlon, A. & Murshudov, G. N. Overview of refinement procedures within REFMAC 5: Utilizing data from different sources. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **74**, 215–227 (2018).
242. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212–2221 (2007).
243. 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).
244. 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. U. S. A.* **90**, 2160 (1993).
245. Heitel, P., Achenbach, J., Moser, D., Proschak, E. & Merk, D. DrugBank screening revealed alitretinoin and bexarotene as liver X receptor modulators. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **27**, 1193–1198 (2017).
246. Schmidt, J. *et al.* NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015).
247. Flesch, D. *et al.* Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **60**, 7199–7205 (2017).
248. Heitel, P. *et al.* Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype. *ACS Med. Chem. Lett.* **10**, 203–208 (2019).
249. Wolbank, S. *et al.* Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics. *Tissue Eng. Part A* **15**, 1843–1854 (2009).
250. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–628 (2008).
251. Watts, K. S. *et al.* ConfGen: A conformational search method for efficient generation of

6. Literatur

- bioactive conformers. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 534–546 (2010).
252. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
253. Friesner, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **47**, 1739–1749 (2004).

7. Abkürzungsverzeichnis

6-MP	6-Mercaptopurin	FI	Fluoreszenzintensität
6-OHDA	6-Hydroxydopamin	FOXA2	Forkhead-Box-Protein A2
		FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
AD	Alzheimer's disease		
AF-1	Aktivierungsfunktion 1		
AF-2	Aktivierungsfunktion 2	GA	Garcinsäure
AMPK α	AMP-aktivierte Proteinkinase α	GATA2	GATA-Bindungsfaktor 2
AQ	Amodiaquin	GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
AR	Androgenrezeptor	GFP	green fluorescent protein
ASC	adipozytären Stammzellen	GLUT4	Glucosetransporter 4
		GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
Bcl-2	B-Zell-Lymphom 2		
Boc	tert-Butyloxycarbonyl		
CBP	CREB-Bindungsprotein	HTRF	zeitaufgelösten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
CD36	Thrombozytenglykoprotein 4		
CQ	Chloroquin	HTS	high-throughput-screening
CREB	cAMP RE bindendes Protein		
Csn-B	Cytosporon B	IL-1 β	Interleukin-1 β
		iNOS	induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase
DBD	DNA-Bindungsdomäne		
DC	Dünnschichtchromatographie	ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
DEAD	Diethylazodicarboxylat		
DHA	Docosahexaensäure		
DHI	5,6-Dihydroxyindol	KO	Knockout
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat		
DIPEA	Diisopropylethylamin	LBD	Ligandenbindungsdomäne
DMF	Dimethylformamid	LBP	ligand binding pocket
DMSZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur	LDL	low density lipoprotein
		L-Dopa	Levodopa
DOPAC	Dihydroxyphenylethylamin	Lenti	Lentivirus
DRIP	Vitamin D Rezeptor-Interaktionsprotein	LID	L-Dopa induzierten Dyskinesie
		LPS	Lipopolysaccharid
DSF	differentielle Scanning Fluorometrie	LXR	Leber-X-Rezeptor
EAE	experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis	MEF2	myocyte enhancer factor 2
		MEM	minimales essenzielles Medium
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid	MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
		MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridi
ESI	Elektrospray-Ionisierung	MS	Multiple Sklerose, Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol	MYC	c-MYC-Protoonkogen
FCS	fetalem Kälberserum	Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat

7. Abkürzungsverzeichnis

NBRE	NFGI-B Response Element	SDS	Natriumdodecylsulfat
NCoA6	nukleärer Rezeptor Co-Aktivator 6	sGFP	superfolder GFP
NCOR-1	nukleärer Co-Repressor 1	SMRT	nukleärer Co-Repressor 2
NOR-1	Neuronen abgeleiteter Waisenrezeptor	ID2	Interaktionsdomäne 2
NRIP	nukleärer Rezeptor Interaktionsprotein	SN	Substantia nigra
NRs	Nukleäre Rezeptoren	S _N Ar	nukleophile aromatische Substitution
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs	SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
NTD	N-terminale Domäne	SRC	Steroid Rezeptor Co-Aktivator
Nur77	Nervenwachstumsfaktor-induzierter Klon B	Tb-SA	Terbiumkryptat als Streptavidin Konjugat
Nurr1	Kernrezeptor verwandtes Protein 1	TEA	Triethylamin
		TH	Thyrosinhydroxylase
		THF	Tetrahydrofuran
		THPN	1-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)nonan-1-on
ORO	Oil Red O	TMPA	2-[2,3,4-Trimethoxy-6-(1-octanoyl)phenyl]acetat
PD	Parkinson's disease	TMS	Tetramethylsilan
PDNPA	n-Pentyl-2-[3,5-dihydroxy-2-(1-nonanyl)phenyl]acetat	TNF α	Tumornekrosefaktor α
PGA1	Prostaglandin A1	TR	Thyroidhormon-Rezeptor regulatorischen T-Zellen
PGA2	Prostaglandin A2	T _{Reg}	Thiazolidindion
PGC-1 α	PPAR γ Co-Aktivator 1- α	TZD	
PGE1	Prostaglandin E1	VTA	tegmentalen Area
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor	WT	Wildtyp
PPRE	menschliche PPAR-RE	XCT	XCT139508
RE	Response Elemente	ZNS	Zentralen-Nerven-System
ROR	RAR-related orphan receptor		
RXR	Retinoid-X-Rezeptor		
SAR	structure activity relationship		

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeiner struktureller Aufbau von nukleären Rezeptoren. H = Hinge-Region.....	4
Abbildung 2: Schematisierte Darstellung der DBD. P-Box (grün), D-Box (violett), T-Box (blau) und A-Box (gelb) sind farblich hervorgehoben. (C = Cystein). Adaptiert von Referenz 19.....	5
Abbildung 3: Potenzielle Vorteile der Verwendung eines allosterischen Liganden.....	8
Abbildung 4: Bindungsmodi für allosterische Liganden: 1) Expandierte orthosterische Bindungsstelle, 2) Liganden die an zwei Stellen des Rezeptors binden und 3) alternative Bindungstasche. Die Abbildung ist aus Referenz 8 entnommen.....	9
Abbildung 5: Kristallstruktur von 31 (weiß, mit farbigen Elementen) gebunden an die LBD von PPAR γ (gelb, PDB: 2PRG181). 1) 31 gebunden an die LBD von PPAR γ . 2) Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk der TZD-Kopfgruppe von 31 mit Resten der AF-2. Die Abbildung ist aus Publikation181 entnommen.....	33
Abbildung 6: Co-Kristallisation von 36 mit der LBD von PPAR γ (PDB: 3B0R183).....	34
Abbildung 7: Struktureller Vergleich der PPAR γ -LBD mit dem Agonisten Rosiglitazon (PDB: 7AWC184, Protein grau, Helix 12 pink, Ligand nicht gezeigt) oder seinem irreversiblen Antagonisten GW9662 (PDB: 3B0R183, Protein gelb, H12 orange, Ligand gelb (36)). 36 bindet kovalent an die orthosterische Bindungsstelle von PPAR γ und induzierte eine verschobene Position von H12 verglichen zu der Konformation mit Agonisten. Der Ligand beeinträchtigte die aktive Konformation von H12 nicht, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung über alternative Mechanismen nicht durch 36 blockiert wird.....	35
Abbildung 8: ITC-Ergebnisse bestätigen die Bindung von 40 und 41 an die rekombinante Nur77-LBD192.....	42
Abbildung 10: 41 (100 μ M) wirkte der schwachen Nur77 Aktivierung durch 16 entgegen, was auf ein kompetitives Verhalten hindeutet192.	46
Abbildung 9: 1) Der wahrscheinlichste Bindungsmodus von 41 in der THPN-Bindungstasche. 2) Für 41 wurde vorhergesagt, dass es in einem stark hydrophoben Hohlraum zwischen H9 und H11 bindet, der einen Raum für die Erweiterung des Acetylsubstituenten bietet. Die Hydroxylgruppe war Lösungsmittel exponiert und zeigte eine schwache Interaktion mit Thr513192.....	46
Abbildung 11: ITC-Ergebnisse bestätigten die Bindung von 68 an die rekombinante Nur77-LBD192.....	50

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 12:** 1) **68** zeigt innerhalb der NR4A-Familie eine Präferenz für Nur77. 2) THPN (5 μ M, **16**) wirkt der Bindung von **68** entgegen. 3) Effekte von **68** (10 μ M, 30 μ M) und **16** (20 μ M) an der mRNA-Expression von GATA2 in HeLa-Zellen¹⁹². **51**
- Abbildung 13:** 1) **76** verhinderte die Interaktion von NOR-1 mit NCoR1 und SMRT. 2) **43** und **76** induzieren die Expression von MYC in HeLa Zellen¹⁹³. **52**
- Abbildung 14:** Die Kristallstruktur der PPAR γ -LBD in Komplex mit **39** (PDB: 8ATY)¹⁹¹ zeigte, dass zwei Moleküle von **39** an die LBD binden können und wies eine hohe Übereinstimmung mit dem PPAR γ -GA(**37**)-Komplex auf¹⁸⁴. **55**
- Abbildung 15:** Dosis-Wirkungs-Kurve von **39** im Gal4-PPAR γ -Reportergen-Assay in An- und Abwesenheit vom irreversiblen orthosterischen Antagonist GW9662 (**36**)¹⁹¹. **54**
- Abbildung 16:** Allosterische Bindung von GA (**37**, PDB: 7AWD¹⁸³) und **39** (PDB: 8ATY¹⁹¹) an die PPAR γ -LBD zeigten eine Interaktion mit der Seitenkette von Arg288 und potenziellen Freiraum für eine Erweiterung von **39**¹⁹¹. **55**
- Abbildung 17:** Allosterische und orthosterische Bindung von **39** mit der PPAR γ -LBD (PDB: 8ATY¹⁹¹). 1) Allosterische Bindung von **39**, Außenansicht auf die Tasche. 2) Allosterische Bindung von **39** zeigte potenziellen Platz für eine Erweiterung. 3) Orthosterische Bindung von **39**, zeigte keinen Platz für eine Erweiterung an 5- und 6-Position des Tetrahydronaphthalin¹⁹¹. **56**
- Abbildung 18:** Docking von **104** in die Kristallstruktur von **39** in Komplex mit der PPAR γ -LBD (PDB: 8ATY¹⁹¹). Gezeigt ist die Bindung von **39** in die orthosterische (gelb) und allosterische (magenta) Tasche sowie die vorhergesagte Bindung von **104** (orange) in beide Taschen der PPAR γ -LBD. **65**
- Abbildung 19:** Aktivität von **104** an Gal4-PPAR γ (1) und PPRE (2) in An- und Abwesenheit von Pioglitazon (**33**, 3 μ M)¹⁹¹. **66**
- Abbildung 20:** Effekte von **104** an der Ser273 Phosphorylierung von PPAR γ . Rosiglitazon (**32**) dient als positiv Kontrolle¹⁹¹. **66**
- Abbildung 21:** Selektivitätsprofil von **104** an verschiedenen NRs. Ref.-Ligand = Referenz-Ligand¹⁹¹. **67**
- Abbildung 22:** Effekte von **104** auf die Apoptose (1) und Nekrose (2) in COS7-Zellen nach 24 Stunden. Doxorubicin (Doxo, 100 μ M) und Flavopiridol (Flavo, 100 μ M) dienten als Positivkontrolle¹⁹¹. **67**
- Abbildung 23:** Thermische Stabilität der PPAR γ -LBD in der Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von **104** und Pioglitazon (**33**)¹⁹¹. **68**

8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 24:** Die Co-Kristallstruktur von PPAR γ -LBD 1) im Komplex mit **104** (PDB: 8ATZ191) sowie 2) im Komplex mit **39** (magenta, PDB: 8ATY191) und **104** (gelb, PDB: 8ATZ191). Die Überlagerung von **104** und **39** (2) zeigte eine ähnliche aktive Konformation, aber eine selektive Bindung von **104** an die allosterische Bindungsstelle191..... **69**
- Abbildung 25:** Pirinixinsäure (**31**) wies zwei verschiedene Bindungsmodi für die Bindung an PPAR γ auf. 1) Die gleichzeitige Bindung von zwei Molekülen von **31** in die ortho- und allosterische Bindungstasche, die der Bindung von **39** ähnelte und zu einer aktiven Konformation von H12 führte. 2) Einzelbindung von **31**, zeigte ein ähnliches Bindungsprofil wie bei MRL-871 (**1**), zwischen der ortho- und allosterischen Stelle und resultierte in einer inaktiven Konformation von H12. Zum Vergleich ist die Bindung von **39** (orange, PDB: 8ATY191) und **104** (türkis, PDB: 8ATZ191) an die PPAR γ -LBD dargestellt191..... **70**
- Abbildung 26:** 1) Die PPAR γ -Liganden **31**, BVT.13 (**38**, PDB: 2Q6S187), **39** und **104** induzierten verschiedene Konformationen von H12. 2) Im Vergleich zu **38** war die Bindung von **104** aus dem orthosterischen Bereich nach außen verschoben. 3) Vergleich der PPAR γ -LBD Strukturen im Komplex mit verschiedenen allosterischen und orthosterischen Liganden zeigte Unterschiede in der LBD und Konformation. Zum Vergleich der inaktiven und aktiven Form sind die inaktive Apostruktur und der Pioglitazon (**33**)-Komplex mit der PPAR γ -LBD abgebildet191..... **71**
- Abbildung 27:** Die Überlagerung der gebundenen Liganden MRL-871 (**1**), Pirinixinsäure (**31**), GA (**37**), BVT.13 (**38**) und **104** innerhalb der ortho- und allosterischen Bindungsregion zeigte unterschiedliche Bindungsmodi191..... **72**
- Abbildung 28:** Ergebnisse der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) für die Bindung von **39** und **104** zur ligandenfreien und an GW9662(**36**)-gebundene PPAR γ -LBD. Die Anpassung der Bindungswärme ist mit den Isothermen als Einblendung dargestellt191..... **73**
- Abbildung 29:** LC-ESI-MS-basiertes Ligandenbindungs-Experiment zeigte, 1) eine konzentrationsabhängige spezifische Bindung von **104** (0,2 – 4 μ M) an die PPAR γ -LBD in An- und Abwesenheit von Pioglitazon (**33**) 2) sowie eine spezifische Bindung von **104** und **33** in An- und Abwesenheit des jeweiligen anderen Liganden191..... **74**
- Abbildung 30:** Molekulares Docking unterstützt die Annahme der gemeinsamen Bindung von Pioglitazon (**33**, türkis) und **104** (magenta) an die PPAR γ -LBD. **33** wurde in die

8. Abbildungsverzeichnis

- unbesetzte orthosterische Stelle des **104**-PPAR γ -Komplexes (PDB: 8ATZ191) gedockt191..... **74**
- Abbildung 31:** Pioglitazon (**33**, 3 μ M), GW9662 (**36**, 10 μ M) und **104** (30 μ M) verursachten unterschiedliche Auswirkungen auf die Rekrutierung von Co-Regulatoren durch PPAR γ 191..... **75**
- Abbildung 32:** **104** (50 μ M) verringerte und Pioglitazon (**33**) sowie der RXR-Agonist SR11237 erhöhten die Heterodimerisierung von PPAR γ mit RXR. **104** war dazu in der Lage die Dimerstabilisierungseffekte von **33** und SR11237 zu blockieren191..... **77**
- Abbildung 33:** Bilder des ASC-Differenzierungsexperiments von Pioglitazon (**33**) und **104**. DMSO diente als Negativkontrolle191..... **77**
- Abbildung 34:** **104** war im Vergleich zu Pioglitazon (**33**) nicht in der Lage eine Differenzierung von humanen adipozytären Stammzellen (ASC) auszulösen191. **78**
- Abbildung 35:** Effekte von **104** auf den PPAR-Signalweg in HepG2-Zellen. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert191..... **79**
- Abbildung 36:** Effekte von Garcinolsäure (**37**) auf den Signalweg von PPAR-Signalweg in HepG2-Zellen183. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert184. **80**
- Abbildung 37:** Effekte von Pioglitazon (**33**) auf den Signalweg von PPAR-Signalweg in HepG2-Zellen183. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert184. **80**
- Abbildung 38 :** Gegenüberstellung der Effekte von **104** und GA (**37**) bei der Genexpression183. Die Heatmap zeigt hochregulierte (blau), runterregulierte (rot) und nicht regulierte (schwarz) Gene191..... **81**
- Abbildung 39:** Eine Auswahl von Genen die durch die Behandlung mit **104** (20 μ M) reguliert wurden und mit dem FOXO-Signaling (1), Adipo-/Lipogenese (2), TOR-Signaling (3), Apoptose (3) und ATP-Erzeugung (3) in Verbindung stehen. Die Heatmap zeigt die log₂(x-fache Veränderung) der Genexpression von signifikant (p-Wert < 0,05) regulierten Genen191. **82**
- Abbildung 40:** Effekte von **104** auf den FOXO-Signalweg in HepG2-Zellen. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als log₂(fache Änderung)) werden

8. Abbildungsverzeichnis

durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert191.....	82
Abbildung 41: Effekte von Garcinolsäure (37 , GA) auf den FOXO-Signalweg in HepG2-Zellen183. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als \log_2 (fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert184.	83
Abbildung 42: Effekte von Pioglitazon (33) auf den FOXO-Signalweg in HepG2-Zellen183. Die unterschiedlichen Regulierungen (angezeigt als \log_2 (fache Änderung)) werden durch die unterschiedlichen Farben visualisiert und auf den Bereich -1 bis 1 normalisiert184.....	83
Abbildung 43: 104 (20 μ M, 16 Std.) erhöht die inaktivierende Phosphorylierung von FOXO3a an Ser253191.....	84
Abbildung 44: Pioglitazon (33) führt zu einer zeitabhängigen Erhöhung der FOXO-Aktivität in HepG2-Zellen, während 104 eine zeitabhängige Verringerung verursacht191.....	84

9. Schemenverzeichnis

Schema 1: Bekannte Nur77 Modulatoren.....	23
Schema 2: NSAIDs als Agonisten für Nur77, Nurr1, NOR-1.....	25
Schema 3: Literatur bekannte Nurr1-Agonisten.....	26
Schema 4: Potenzielle endogene Liganden von Nurr1.....	26
Schema 5: Nurr1-RXR-Heterodimer-selektive RXR-Agonisten.....	28
Schema 6: NOR-1 aktivierende Verbindungen.....	29
Schema 7: Nicht selektive PPAR γ -Liganden.....	31
Schema 8: Selektive PPAR γ -Liganden.....	32
Schema 9: Orthosterische und allosterische PPAR γ -Liganden.....	35
Schema 10: Chemische Struktur von 39	38
Schema 11: Struktur von Irbesartan (45).....	43
Schema 12: Synthese von Verbindung 82 . Reagenzien und Bedingungen: (a) NaOH, H ₂ O/Ethanol, 60 °C, 4,5 Std., 65%; (b) POCl ₃ , Diethylanilin, 90 °C, 5 Std., 75%.	56
Schema 13: Vergleich der Struktur von Verbindung 39 und die Struktur der neu zu synthetisierende Verbindung 78 . In Rot wurden die gleichen Kohlenstoffatome im Bereich der strukturellen Erweiterung von beiden Verbindungen hervorgehoben.....	56
Schema 14: Struktur von Verbindung 88	60
Schema 15: Struktur von Verbindung 89	60
Schema 16: Mitsunobu-Reaktion von Verbindung 91 und 92 zu Verbindung 93	62
Schema 17: Struktur von Verbindung 96	62
Schema 18: Nukleophile aromatische Substitution von Verbindung 82 und 94 zu Verbindung 95	62
Schema 19: Demethylierung und Esterhydrolyse von 100 mittels Bortribromid (BBr ₃) ergibt Verbindung 101 die mittels einer Williamson-Ether-Synthese und dem Morpholin-Linker (84) zu 102 umgesetzt wurde.....	63
Schema 20: Vollständige Synthese von 104 . Reagenzien und Bedingungen: (a) NaOH, H ₂ O/Ethanol, 60 °C, 4,5 Std., 65%; (b) POCl ₃ , Diethylanilin, 90 °C, 5 Std., 75%; (c) CH ₃ I, NaH, DMF, RT, 24 Std., 82%; (d) H ₂ , Pd(C), EtOAc, RT, 15 Std., 92%; (e) Hünig-Base, DMF, 120 °C, 20 Std., 63%; (f) BBr ₃ , CH ₂ Cl ₂ , RT, 16 Std., 81%; (g) K ₂ CO ₃ , KI, DMF, 80 °C, 23 Std., 47%.	64
Schema 21: Struktur der neuen Verbindung 104 , abgeleitet von 39	65
Schema 22: Screening-Hits für Nur77 und NOR-1.....	86

9. Schemenverzeichnis

Schema 23: Aktive Verbindungen aus dem molekularen Docking. Grün = agonistische Verbindungen (60, 68, 74), blau = invers agonistische Verbindung (64).....	87
Schema 24: Struktur von Verbindung 76 und 77	89
Schema 25: Modifizierungsversuche von 39 und Ausschnitt aus der Synthese von 104 . Reagenzien und Bedingungen: (a) K ₂ CO ₃ , KI, DMF, 80 °C, 23 Std., 47%.....	91

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Superfamilie der 48 humanen NRs	2
Tabelle 2: Behandlung und Durchführung der Versuchsreihen 1-4 von Nur77-KO und -WT-Mäusen.....	13
Tabelle 3: IC50-Werte der drei Screening-Hits (40, 41, 42) von Nur77 im Gal4-Reporterassay, Nur77-Vollängenassay und Bindungsaffinitäten gemäß isothermer Titrationskalorimetrie.	41
Tabelle 4: IC50- und EC50-Werte der drei Screening-Hits (41, 43, 44) von NOR-1 im Gal4-Reporterassay.	42
Tabelle 5: Aktivität von 47-57 an Nur77. Die Aktivität von Fragment-Hit 41 ist zum Vergleich angegeben.....	44
Tabelle 6: Ligandeneffizienz (LE) und lipophile Ligandeneffizienz (LLE) für 41 und 57 im Vergleich zu Cytosporon B (3)117.....	45
Tabelle 7: 17 chemische diverse Verbindungen, abgeleitet von 41 , mit Strukturformel geordnet nach ihrem Docking-Score und mit biologischer Charakterisierung. In blau ist das gemeinsame Strukturmotiv aller Verbindungen hervorgehoben.....	47
Tabelle 8: Aktivität von 43 und Derivaten (75-77) an NOR-1.....	52
Tabelle 9: Reagenzien und Bedingungen der nukleophilen Substitution von Verbindung 82 und 83 zu Verbindung 78	57
Tabelle 10: Reagenzien und Bedingung der Synthese von Verbindung 85 mittels Williamson-Ether-Synthese ausgehend von 78 mit 4-(2-Chloroethyl)morpholin (84) als Linker. ..	58
Tabelle 11: Reagenzien und Bedingungen für die Schützung von 83 mit einer tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe.....	59
Tabelle 12: Reagenzien und Bedingungen der Williamson-Ether-Synthese von Verbindung 84 und 86 zu Verbindung 87	59
Tabelle 13: Reagenzien und Bedingungen der Williamson-Ether-Synthese von Verbindung 84 und 88	60
Tabelle 14: Reagenzien und Bedingungen der Williamson-Ether-Synthese von Verbindung 84 und 90	61
Tabelle 15: Datenerfassung und Verfeinerungsstatistik der durchgeführten Kristallisationen.....	105

11. Publikationsliste

Dieser Arbeit zugrundeliegende Publikationen:

- ❖ **Arifi, S.**, Marschner, J. A., Pollinger, J., Isigkeit, L., Heitel, P., Kaiser, A., Obeser, L., Höfner, G., Proschak, E., Knapp, S., Chaikuad, A., Heering, J., & Merk, D. (2023). Targeting the Alternative Vitamin E Metabolite Binding Site Enables Noncanonical PPAR γ Modulation. *Journal of the American Chemical Society*, 145.
- ❖ **Arifi, S.**, Zaienne, D., Heering, J., Wein, T., Zhubi, R., Chaikuad, A., Knapp, S., Marschner, J. A., & Merk, D. (2022). Fragment-based discovery of orphan nuclear receptor Nur77/NGFI-B ligands. *Bioorganic Chemistry*, 129 (September).
- ❖ Faudone, G., **Arifi, S.**, & Merk, D. (2021). The Medicinal Chemistry of Caffeine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64 (11), 7156–7178.
- ❖ Zaienne, D., **Arifi, S.**, Marschner, J. A., Heering, J., & Merk, D. (2022). *Druggability Evaluation of the Neuron Derived Orphan Receptor (NOR-1) Reveals Inverse NOR-1 Agonists.* 202200259, 1–5.
- ❖ Gellrich, L., Heitel, P., Heering, J., Kilu, W., Pollinger, J., Goebel, T., Kahnt, A., **Arifi, S.**, Pogoda, W., Paulke, A., Steinhilber, D., Proschak, E., Wurglics, M., Schubert-Zsilavecz, M., Chaikuad, A., Knapp, S., Bischoff, I., Fürst, R., & Merk, D. (2020). L-Thyroxin and the Nonclassical Thyroid Hormone TETRAC Are Potent Activators of PPAR α . *Journal of Medicinal Chemistry*, 63 (13).

12. Kooperationspartner

Sofern nicht anders durch Quellenangabe oder Danksagung angegeben, wurde die vorliegende Arbeit von mir im Rahmen meines Promotionsstudiums unter der Aufsicht meiner akademischen Betreuer erstellt. Alle Beiträge von Kollegen, sind deutlich in dieser Dissertation gekennzeichnet.

Nachfolgende aufgelistetes Material wurde in Zusammenhang kollaborativer Forschung erhalten:

- ❖ PPAR γ -LBD-Expression, Aufreinigung und Kristallisation durch Dr. Apirat Chaikwad (AK Prof. Dr. Stefan Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt).
- ❖ MS-basierter PPAR γ -Ligandbindungsassay durch Dr. Georg Höfner und Lennart Obeser (AK Prof. Dr. Merk, Institut für Pharmazie, LMU-München).
- ❖ PPAR γ -Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay, Konzentrationsabhängiger PPAR γ -Co-Regulator-Rekrutierungs-Assay und PPAR γ -RXR α -Heterodimerisierungs-Assay durchgeführt durch Dr. Jan Heering (AK Prof. Proschak, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt).
- ❖ PPAR γ -Phosphorylierung an Ser273, Toxizitäts-Assay, Effekte an der GATA2-Expression in HeLa-Zellen und Beobachtung der FOXO-Phosphorylierung und Aktivität durchgeführt durch Dr. Julian Marschner (AK Prof. Dr. Merk, Institut für Pharmazie, LMU-München).
- ❖ Adipozyten getriebene mesenchymale Stammzellendifferenzierung durchgeführt durch Romy Busch (AK Prof. Dr. Merk, Institut für Pharmazie, LMU-München).
- ❖ Molekulares Docking durchgeführt durch Laura Isigkeit für PPAR γ (Prof. Dr. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt) und Dr. Thomas Wein für Nur77 (AK Prof. Dr. Merk, Institut für Pharmazie, LMU-München).
- ❖ Arzneistofffragment-Screening im Gal4-Nur77-Reporterassay: In Zusammenarbeit mit Daniel Zaienne (AK Prof. Dr. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe Universität Frankfurt).
- ❖ Genexpressionsanalyse: RNA-Sequenzierung erfolgte durch das Unternehmen Novogene (Cambridge, England). Aufbereitung der Daten zum Teil durch Dr. Julian Marschner (AK Prof. Dr. Merk, Institut für Pharmazie, LMU-München).

12. Kooperationspartner

Folgende Teile der Dissertation wurden bereits zuvor veröffentlicht:

- ❖ Abbildung 2 adaptiert nach Referenz 19, keine Genehmigung erforderlich.
- ❖ Abbildung 4: übernommen aus Referenz 8, keine Genehmigung erforderlich.
- ❖ Abbildung 5: übernommen aus Referenz 17, keine Genehmigung erforderlich.
- ❖ Abbildung 6, 14-16, 19-44: übernommen aus Referenz 191, keine Genehmigung erforderlich.
- ❖ Abbildung 8-12: übernommen aus Referenz 192, keine Genehmigung erforderlich.
- ❖ Abbildung 13: übernommen aus Referenz 193, keine Genehmigung erforderlich.

13. Curriculum Vitae

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

14. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den

Silvia Arifi

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

.....
.....
.....

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegeben 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

Silvia Arifi

15. Danksagung

Das Verfassen dieser Forschungsarbeit wäre ohne die Hilfe, das Verständnis und die Unterstützung von Kollegen, Kooperationspartnern, Freunden und Familie nicht möglich gewesen, deswegen besonderen Dank an

- **Prof. Dr. Daniel Merk**, für die fachliche und angenehme Betreuung meiner Promotion, für die steige Unterstützung und Motivation, für den Freiraum für eigenen Ideen sowie die Anregungen, wenn ich keinen Weg mehr gesehen habe sowie das bedingungslose Vertrauen und freien Gestaltung in allen Projekten.
- **Prof. Dr. Manfred. Schubert-Zsivalvecz**, für die stetige Motivation und Unterstützung für die Durchführung dieser Arbeit und für die Arbeitskreiseminare im Schwarzwald und in Österreich sowie die Sommer- und Winterschule, die uns alle nochmal mehr verbunden haben.
- **Dr. Mario Wurglics**, für die Regelung vieler organisatorischer Dinge, Unterstützung bei der Lehre sowie das immer offene Ohr beim Auftreten von Problemen.
- **an alle Kooperationspartner**, insbesondere **Dr. Jan Heering**, **Dr. Julian Marschner**, **Dr. Apirat Chaikwad** und **Dr. Thomas Wein** ohne die diese Forschungsarbeit nicht an den Punkt gekommen wäre, wo sie jetzt ist.
- **Minh Sai**, für die vielen fachlichen und nicht so fachlichen Gespräche, für die schöne Zeit im Studium und in der Promotion, für die gemeinsame Zeit im Labor und das trotz der Entfernung alles gleichgeblieben ist, bis auf die gestiegene Telefonrechnung. Danke fürs Korrekturlesen dieser Arbeit! Wir sehen uns dann bald im selben Büro, ich warte!
- **Annette Kärcher**, für die gemeinsame Zeit in der Masterarbeit und die kurze, aber schöne Zeit in der Promotion und auch dazwischen, für die gemeinsamen Abende mit Filmen, leckeren Essen, Backen und tollen Gesprächen, die den perfekten Ausgleich zum Uni Alltag geschaffen haben.
- **Laura Isigkeit**, für den Ausgleich beim Sport und den dadurch frischeren Geist danach zum weiter Schreiben, da mit dem Muskelkater sowieso nicht mehr an irgendwas anderes zu denken war.
- **Astrid Kaiser**, für die tollen Gespräche und erholsamen Mittagspausen und das immer offene Ohr.

15. Danksagung

- **Dr. Pascal Heitel** für deine Begeisterung an der Forschung und das Forschungspraktikum, dass mich in meiner Entscheidung zu promovieren noch weiter vorangetrieben hat und die Unterstützung in der Promotion.
- **alle meinen Kollegen:** Dr. Pascal Heitel, Dr. Julius Pollinger, Dr. Simone Schierle, Dr. Moritz Helmstädter, Dr. Giuseppe Faudone, Dr. Sabine Willems, Minh Sai, Annette Kärcher, Jan Vietor, Gustave Adouvi, Laura Isigkeit, Daniel Zaienne, Nils Bandomir, Espen Schallmayer, Alisa Lang, Astrid Kaiser, Julia Ohrndorf, Gabriele Sentis und allen andern.
- **bei meinem Partner,** für die gemeinsame Zeit, die bedingungslose Unterstützung und Motivation in schweren Zeiten und den nicht-wissenschaftlichen-Ausgleich, der mich in stressigen Zeiten wieder runtergeholt hat sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit!
- **meine Familie und Freunde,** die in guten und schlechten Zeiten an mich geglaubt, hinter mir gestanden haben und für mich da waren und sich hoffentlich noch gegen die Konfettikanonen bei der Verteidigung entscheiden. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann und diesen bedingungslosen Rückhalt habe.