

Wirkung des Schilddrüsenhormonmetaboliten
3,5-T₂ auf den Energiestoffwechsel und die
Schilddrüsenhormonachse in Mäusen
unter normaler Diät und Hochfettdiät

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Julika Lietzow

aus Berlin

März 2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2013 bis Juli 2015 und August 2016 bis März 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Josef Köhrle am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Josef Köhrle

2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am: 22.09.2017

Für meine Familie.

Zusammenfassung

Das komplexe Krankheitsbild Adipositas betrifft alle Bevölkerungsschichten und Altersgruppen und die Prävalenz nimmt kontinuierlich zu. Mit Ausnahme von operativen Methoden existieren kaum wirksame Interventionsstrategien zur langanhaltenden Gewichtsreduktion und zufriedenstellenden Behandlung von Adipositas und assoziierten Begleiterkrankungen.

Der Schilddrüsenhormonmetabolit 3,5-Diiodthyronin (3,5-T₂) gilt als metabolisch aktiv, beeinflusst den Energie- und Fettstoffwechsel und reduziert das Körpergewicht nach exogener Applikation in Nagetieren. Negative Effekte auf die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse) und auf das kardiovaskuläre System, wie sie für Schilddrüsenhormone (TH) bekannt sind, wurden in zahlreichen Rattenstudien nicht beobachtet. Als endogen vorkommender Metabolit stellt 3,5-T₂ demnach ein interessantes Zielmolekül für die therapeutische Behandlung der Adipositas dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die chronische 3,5-T₂-Behandlung in einem Mausmodell mit Diät-induzierter Adipositas das Körpergewicht reduziert und den Energie- und Fettstoffwechsel positiv beeinflusst. Die zwei bzw. vierwöchige Behandlung mit 0,25 oder 2,5 µg/g Körpergewicht 3,5-T₂ hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht der adipösen, männlichen Mäuse. Vergleichbar mit einer 83-fach geringeren T₃-Konzentration verbesserte die hohe Dosis 3,5-T₂ den Lipidstatus im Serum, beeinflusste hepatische Parameter des Fettstoffwechsels und der mitochondrialen Funktion in Richtung kataboler Stoffwechsellaage und wirkte folglich anti-lipidämisch und hypocholesterinämisch.

Entgegen den Erwartungen führte 3,5-T₂ sowohl in adipösen als auch in normalgewichtigen Mäusen zu einer Suppression der HPT-Achse einhergehend mit Änderung hypophysärer Genexpressionsmuster, Reduktion der TH-Gehalte in Serum und Leber sowie Induktion der hepatischen Deiodase 1. Ferner wurde eine Zunahme des Herzgewichts festgestellt. Untersuchungen des Herzwebes und in Kardiomyozyten ergaben, dass 3,5-T₂ die Expression klassischer, kardialer TH-responsiver Gene moduliert, jedoch auch Expressionsmarker des fetalen Genprogramms veränderte. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse in der Leber lassen schlussfolgern, dass 3,5-T₂ entgegen der klassischen Wirkung von TH und partiell vermittelt durch den konstitutiven Androstanrezeptor spezifisch auf Genexpressionsprofile des Fremdstoff-metabolisierenden Enzymsystems Einfluss nimmt. In Mäusen unter Hochfettdiät führte 3,5-T₂ zur Induktion des hepatischen Cholesterinbiosyntheseweges. Darüber hinaus konnte eine Diät-abhängige Beeinflussung des Sexualsteroidstoffwechsels in der Leber nach 3,5-T₂-Behandlung festgestellt werden.

Die propagierte Verwendung von 3,5-T₂ als therapeutisches Gewichtsreduktionsmittel und anti-steatotische Substanz sollte angesichts der 3,5-T₂-vermittelten Wirkung auf die HPT-Achse, das Herz und den hepatischen Fremdstoff- und Steroidstoffwechsel in der Leber kritisch bewertet werden.

Summary

Obesity as a complex disorder affects all classes of population and age groups and the prevalence continues to increase. With the exception of surgical methods, there are hardly any effective intervention strategies for long-term weight reduction and satisfactory control of obesity and its associated comorbidities.

The thyroid hormone metabolite 3,5-diiodothyronine (3,5-T₂) is considered to be metabolically active, influences energy and lipid metabolism and reduces body weight after exogenous application in rodents. Negative effects on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis (HPT axis) and on the cardiovascular system, as known for thyroid hormones (TH), have not been observed in numerous rat studies. As an endogenous metabolite 3,5-T₂ represents an interesting target molecule for the therapeutic treatment of obesity.

The aim of this work was to investigate whether chronic treatment of 3,5-T₂ in a mouse model of diet-induced obesity reduces body weight and positively influences energy and lipid metabolism. Treatment with 0.25 or 2.5 µg/g body weight 3,5-T₂ for two or four weeks had no effect on body weight of the obese male mice. Comparable to a 83-fold lower T₃ concentration, the high dose of 3,5-T₂ improved serum lipid status, influenced hepatic parameters of the lipid metabolism and mitochondrial function towards catabolic metabolic status and consequently exerted anti-lipidemic and hypocholesterolemic effects.

Contrary to expectations, 3,5-T₂ in both obese and normal-weight mice led to suppression of the HPT axis with changes in gene expression patterns in the pituitary, reduction of TH concentration in serum and liver as well as induction of hepatic deiodinase 1. Furthermore, an increase in heart weight has been observed. Studies of heart tissue and cardiomyocytes revealed that 3,5-T₂ modulated expression of classical, cardiac TH-responsive genes, but also altered expression markers of the fetal gene program. The results of the transcriptome analysis in the liver suggest that 3,5-T₂, contrary to classical TH action and partially mediated by the constitutive androstane receptor, specifically influences gene expression profiles of the drug-metabolizing enzyme system. 3,5-T₂ induced the hepatic cholesterol biosynthesis pathway in mice under high-fat diet. In addition, a diet-dependent effect on the sexual steroid metabolism in the liver after 3,5-T₂ treatment was observed.

Based on the obtained results showing 3,5-T₂-mediated effects on the HPT-axis, heart and hepatic drug and steroid metabolism in the liver, the proposed use of 3,5-T₂ as a therapeutic weight-reducing agent and anti-steatotic substance should be critically assessed.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Physiologie der Schilddrüsenhormonachse	1
1.1.1 Synthese, Sekretion und Zirkulation der Schilddrüsenhormone	1
1.1.2 Zellulärer Schilddrüsenhormontransport und -metabolismus	3
1.1.3 Molekulare Wirkmechanismen der Schilddrüsenhormone	5
1.2 Regulation der Schilddrüsenhormonachse	9
1.3 Wirkspektrum der Schilddrüsenhormone	10
1.4 Biologische Wirkung des Schilddrüsenhormonmetaboliten 3,5-T ₂	11
1.5 Die Leber als zentrales Organ des Fremdstoff- und Steroidstoffwechsels	13
2 Zielsetzung der Arbeit	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	17
3.2 Software und Datenbanken	18
3.3 Antikörper und Reagenziensysteme	19
3.4 Puffer und Lösungen	19
3.5 Lösung und Reinheitsgrad der Testsubstanzen	20
3.6 Tierexperimente	20
3.6.1 Versuchstiere und Tierhaltung	20
3.6.2 Studiendesign	20
3.7 Zellbiologische Methoden	22
3.7.1 Zellzahlbestimmung	22
3.7.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur	22
3.7.3 Primäre Hepatozyten	23
3.7.4 Kardiomyozytäre Zelllinie H9c2	26
3.8 Molekularbiologische Methoden	26
3.8.1 Organentnahme und Gewebepreparation	26
3.8.2 Probenaufbereitung und Isolierung von RNA aus murinem Gewebe und Zellkulturhomogenat	27
3.8.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Integrität	27
3.8.4 cDNA-Synthese	28
3.8.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR	29
3.8.6 Primerdesign	30

INHALTSVERZEICHNIS

3.8.7	Transkriptomanalyse	32
3.9	Biochemische Methoden	33
3.9.1	Isolierung von Protein aus Gewebe – und Zellextrakten.....	33
3.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay.....	34
3.9.3	Western Blot Analyse.....	34
3.10	Bestimmung der Dio1-Aktivität.....	37
3.10.1	Radioaktiver Dio1-Assay	37
3.10.2	Nicht-radioaktiver Dio1 Assay.....	38
3.11	Bestimmung der Konzentration von Schilddrüsenhormonen und deren Metaboliten im murinen Gewebe und in Zellkulturüberständen und -homogenaten mittels LC-MS/MS.....	39
3.11.1	Extraktion von Schilddrüsenhormonen und 3,5-T ₂ aus Lebergewebe	39
3.11.2	Extraktion von Schilddrüsenhormonen und 3,5-T ₂ aus Seren.....	40
3.11.3	Extraktion von Schilddrüsenhormonen und deren Metaboliten aus Zellkulturüberständen und -homogenaten.....	40
3.11.4	LC-MS/MS Analyse.....	41
3.12	Bestimmung der Konzentration von Steroidhormonen in der Leber mittels GC-MS/MS	44
3.13	Histologische Untersuchungen.....	44
3.13.1	Masson-Trichrom-Goldner-Färbung des Herzgewebes	44
3.13.2	Immunhistologische Färbung der Kardiomyozyten H9c2.....	45
3.14	Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels Seahorse XF Analyzer	46
3.15	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Wirkung von 3,5-T ₂ auf die hepatische Expression ausgewählter Gene und Enzyme des Energiestoffwechsels in Mäusen unter Hochfettdiät.....	49
4.2	Einfluss von 3,5-T ₂ auf die Schilddrüsenhormon-Achse	52
4.3	Kardiale Effekte von 3,5-T ₂	56
4.3.1	Wirkung von 3,5-T ₂ im Herzgewebe von Mäusen unter Hochfettdiät	56
4.3.2	Effekte von 3,5-T ₂ in differenzierten H9c2 - Kardiomyozyten.....	59
4.4	Wirkung von 3,5-T ₂ auf den hepatischen Fremdstoff- und Steroidmetabolismus	62
4.4.1	3,5-T ₂ reguliert die Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme	62
4.4.2	Effekte von 3,5-T ₂ auf den Cholesterin- und Steroidstoffwechsel	67
4.5	Wirkung von 3,5-T ₂ in primären Hepatozyten der Maus	70
5	Diskussion	77
5.1	Bewertung des Mausmodells und der Dosiswahl von 3,5-T ₂ und T ₃ anhand des metabolischen Phänotyps	77
5.2	Wirkung von 3,5-T ₂ auf die Expression TH-responsiver Gene und auf den Mitochondrienstoffwechsel in der Leber.....	80
5.3	Einfluss von 3,5-T ₂ auf die Schilddrüsenhormonachse.....	84
5.4	Kardiale Effekte von 3,5-T ₂	87

INHALTSVERZEICHNIS

5.5	Wirkung von 3,5-T ₂ auf den hepatischen Fremdstoffmetabolismus	92
5.6	Effekte von 3,5-T ₂ auf den Cholesterin- und Sexualsteroidstoffwechsel.....	95
5.7	Einfluss von 3,5-T ₂ auf den hepatischen Schilddrüsenhormonmetabolismus.....	98
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	100
	Abbildungsverzeichnis	101
	Tabellenverzeichnis.....	103
	Literaturverzeichnis.....	105
	Publikationen.....	121
	Danksagung.....	122
	Eidesstattliche Erklärung.....	124
	Lebenslauf	125
	Anhang	126

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung	Abkürzung	Beschreibung
%	Prozent	Dio1	Deiodase 1
dH ₂ O	destilliertes Wasser	Dio2	Deiodase 2
°C	Grad Celsius	Dio3	Deiodase 3
3,3'-T ₂	3,3'-Diiodthyronin	DIT	Diiodtyrosin
3,5'-T ₂	3,5'-Diiodthyronin	DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
3',5'-T ₂	3',5'-Diiodthyronin	DMSO	Dimethylsulfoxid
3-T ₁	3-Monoiodthyronin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
3-T ₁ AM	3-Iodthyronamin	DNase	Desoxyribonuklease
Abb.	Abbildung	DTT	Dithiothreitol
AgRP	Agouti-related Protein	DUOX	NADPH-abhängige Dual Oxidase
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor	ECAR	Extracellular Acidification Rate
Akt	Proteinkinase B	ECL	Enhanced Chemiluminescence
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase	EGTA	Ethylenglycol-bis(Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ANP	atriales natriuretisches Peptid	ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
AP-1	Aktivator Protein 1	FCCP	Carbonyl-Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
AS	Aminosäure	FCS	Fetales Kälberserum
ATP	Adenosintriphosphat	FME	Fremdstoff-metabolisierende Enzyme
Atp2a2 (Serca2)	Ca ²⁺ - ATPase	fT ₃ / fT ₄	freies / nicht-Protein gebundenes T ₃ / T ₄
ATPase	Adenosintriphosphatase	FXR	Farnesoid X Rezeptor
avβ3	Integrin (Transmembranprotein)	g	Beschleunigung
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid	GH	Wachstumshormon
bp	Basenpaare	Glc	Glucose
BSA	Rinderserumalbumin	Gln	Glutamin
C/EBP	CCAAT / Enhancer-Binding-Protein	GST	Glutathion-S-Transferasen
C57BL/6 (J,N)	Inzuchtmausstamm	h	Stunde(n)
Ca	Calcium	H ₂ O	Wasser
CaMKK	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
CAR	konstitutiver Androstanrezeptor	H9c2	Kardiomyozyten-Zelllinie (Ursprung Ratte)
cDNA	komplementäre DNA	HFD	Hochfett diät
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat	HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1α
CHTBP	Schilddrüsenhormon-Bindungsproteine	HKG	Housekeeping Gen (Referenzgen)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
CoA/CoR	Coaktivator/Corepressor	HNF-4α	Hepatozyten Nukleärer Faktor 4α
COX (IV)	Cytochrom C Oxidase (Untereinheit IV)	HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
CRYM	μ-Crystallin	HPT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse
C _T	Threshold Cycle	HRP	Meerrettich-Peroxidase
Cyp	Cytochrome P450	i.p.	Intraperitoneal
Cyt C	Cytochrom C	IRD	innere Ring-Deiodierung
d	Tage (n)	kDa	Kilodalton
DEPC	Diethyldicarbonat	KFO 218	Klinische Forschergruppe 218
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	KG	Körpergewicht
DIFE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung	LAT	L-Typ Aminosäure-Transporter
		LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Beschreibung	Abkürzung	Beschreibung
LLE	Liquid liquid extraction	PKA	Proteinkinase A
ITRβ1	Schilddrüsenhormonrezeptor β in Teleostei („lange“ Isoform)	PKC	Proteinkinase C
LXR	Leber X Rezeptor	PKG	Proteinkinase G
M	Molare Masse	PLC	Phospholipase C
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	POMC	Proopiomelanocortin
MCT	Monocarboxylattransporter	PPAR	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor
MDR	Multi-Drug Resistenz-Transporter	PTU	Propylthiouracil
min	Minute(n)	p-Wert	Signifikanzwert
MIT	Monoiodtyrosin	PXR	Pregnan X Rezeptor
MOPS	3-(N-morpholino) Propansulfonsäure	qPCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
mRNA	messenger RNA	R ²	Determinationskoeffizient
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon	RAR	Retinsäure Rezeptor
mtDNA	mitochondriale DNA	RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin	RNA	Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid	RNase	Ribonuklease
MW	Mittelwert	rpm	Rounds per minute
Na ₂ SeO ₃	Natriumselenit	rT ₃	3,3',5'-Triiod-L-Thyronin
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid	RXR	Retinoid X Rezeptor
NCBI	National Center for Biotechnology Information	s	Sekunde (n)
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer	s.c.	subkutan
NIS	Natrium-Iodid-Symporter	S1/S2	Domäne 1 und 2 des avβ3
NMR	Magnetresonanztomographie	SD	Standarddiät
NO	Stickstoffmonoxid	SDS	Natriumdodecylsulfat
NPY	Neuropeptid Y	SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese
NTCP	Natrium-Taurocholotransportierendes Peptid organischer Anionentransporter	Sec	Selenocystein
OAT	Anionentransporter	SECIS	Selenocystein-Insertations-Sequenz
OATP	Anionen-Transport-Polypeptide	SEM	Standardfehler
OCR	Oxygen consumption rate	Sirt1	Sirtuin 1
OD	optische Dichte	SPE	Solid phase extraction
ORD	äußere Ring-Deiodierung	ssRNA	Einzelsträngige (single-stranded) RNA
P/S	Penicillin/Streptomycin	SULT	Sulfotransferasen
p30	Schilddrüsenhormonrezeptor α1 (verkürzt, membranständig)	T ₀	Thyronin
p38	mitogenaktivierte Proteinkinase	T ₃	3,3',5'-L-Triiodthyronin
p43, p28	Schilddrüsenhormonrezeptor α1 (verkürzt, mitochondrial)	T ₄	3,3',5,5'-L-Tetraiodthyronin, Thyroxin
P450	Cytochrome P450	Tab.	Tabelle
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphatsulfat	TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	TBME	Tert-Butylmethylether
PGC-1α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1α	Tetrac	Tetraiod-Essigsäure
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	TG	Thyreoglobulin
		TH	Schilddrüsenhormone
		TPO	Schilddrüsenperoxidase
		TR (α,β)	Schilddrüsenhormonrezeptor (α,β)
		TRE	Schilddrüsenhormon-responsive-Elemente
		Trh	Thyreotropin-Releasing-Hormon

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Beschreibung
Triac	Triiodthyo-Essigsäure
Tsh	Thyreotropin (Thyroid stimulating hormone)
TTR	Transthyretin
UCP	Uncoupling Protein
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuronosyltransferasen
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Δ	Änderung

Die Bezeichnungen und Abkürzungen von Genen im Text richteten sich nach den offiziellen Vorgaben (NCBI) und werden im Abkürzungsverzeichnis nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Schilddrüsenhormonachse

1.1.1 Synthese, Sekretion und Zirkulation der Schilddrüsenhormone

Die Schilddrüse ist eine der größten endokrinen Drüse des Menschen und besteht aus zwei seitlich der Trachea liegenden eigenständigen Lappen (Lobi), die durch eine schmale Gewebebrücke (*Isthmus glandulae thyroideae*) miteinander verbunden sind. Die Lage unterhalb des Schildknorpels an der Vorderseite der Luftröhre trägt maßgeblich zur lateinischen Namensgebung „*Glandula thyreoides*“ bei, welche der englische Arzt Thomas Wharton 1656 in Anlehnung an einen antiken griechischen Schild vergab. Die Schilddrüse ist umgeben von einer dünnen fibrösen Kapsel, die auch die Parathormonproduzierenden Nebenschilddrüsen (Epithelkörperchen) umfasst (Eickhoff 2012).

Die Schilddrüse ist ausschließlich für die Synthese, Speicherung und Sekretion der Schilddrüsenhormone (TH) L-Tetraiodthyronin (Thyroxin, 3,3',5,5'-T₄) und L-Triiodthyronin (3,3',5-T₃) verantwortlich. Daneben produzieren die parafollikulären Zellen der Schilddrüse das Calcitonin, welches an der Regulation des Calcium- und Phosphathaushaltes beteiligt ist.

Die Schilddrüse setzt sich aus funktionellen Einheiten, den Follikeln, zusammen. Die Follikel sind von Blutkapillaren und Bindegewebe umgeben und bestehen jeweils aus einem einschichtigen Epithel, in deren Inneren die Hormone als sogenanntes Kolloid gespeichert werden.

Iod ist ein wichtiger Strukturbestandteil der TH und nimmt bis zu 65 % beziehungsweise 58 % des Gewichtes von T₄ und T₃ ein (Miot et al. 2000). Iod wird größtenteils über die Nahrung aufgenommen, vom Dünndarm resorbiert und zu Iodid reduziert, bevor es über das Blut zu den Schilddrüsenepithelzellen (Thyreozyten) transportiert wird.

Über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in der basolateralen Plasmamembran gelangt das Iodid aus der Zirkulation in die Thyreozyten, diffundiert durch die Zelle und gelangt über einen passiven Transport entlang der apikalen Plasmamembran in das Kolloid des Schilddrüsenfollikels. Pendrin und Anoctamin wurden hierbei als apikale Transportproteine charakterisiert (Dupuy et al. 1999, Bizhanova and Kopp 2011, Viitanen et al. 2013, Iosco et al. 2014).

Das mit Kolloid gefüllte Follikellumen enthält eine hoch konzentrierte Menge an Thyreoglobulin (TG), welches als Synthese- und Speicherprotein der TH dient. Die an der apikalen Zellmembran verankerte Schilddrüsenperoxidase (TPO) katalysiert die Oxidation des Iodid zu elementarem Iod als auch die Bindung der Iod-Moleküle an die Tyrosinreste des TG. Für beide Reaktionen wird Wasserstoffperoxid (H₂O₂) benötigt, welches als Elektronenakzeptor fungiert und von den dualen NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen (DUOX1, 2) bereitgestellt wird (Dupuy et al. 1999, De Deken et al. 2002).

Durch die Iodierung des aromatischen Rings der Tyrosinseitenketten an Position 3 und 5 im TG wird Monoiodtyrosin (MIT) und Diiodtyrosin (DIT) gebildet. Über diese Vorstufen entsteht durch Kopplung von zwei räumlich benachbarten Iodtyrosinen das T_4 (DIT+DIT) und das stoffwechselaktive T_3 (MIT+DIT).

Zur Freisetzung der TH wird TG vom Thyreozyten durch Endozytose aufgenommen. Anschließend fusioniert der endozytotische Vesikel mit Lysosomen. Es folgt die proteolytische Spaltung des TG durch lysosomale Proteasen und Degradation unter Beteiligung von Cathepsinen (Brix et al. 1996). Anschließend werden die TH an der basolateralen Membran, vorwiegend über den Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8), in die Zirkulation sezerniert (Yen 2001, Zoeller et al. 2007, Di Cosmo et al. 2010).

Unter physiologischen Bedingungen sezerniert die Schilddrüse überwiegend das biologisch inaktive T_4 . Das im Blut zirkulierende stoffwechselaktive T_3 stammt hingegen nur zu 20 % aus der Schilddrüse.

Die lipophilen TH erreichen das Zielorgan bzw. die Zielzelle über den Blutkreislauf durch die Bindung an spezielle Proteine (TH-Serumtransportproteine), die sich hinsichtlich ihrer Affinität und Kapazität für TH unterscheiden. Nur circa 0,05 % des T_4 und 0,3 % des T_3 liegen im Plasma in freier Form vor (Refetoff et al. 1970, Ekins 1992). Die Proteinbindung verlängert die biologische Halbwertszeit der TH und vermindert deren unkontrollierte renale Exkretion.

Beim Menschen wird der größte Anteil der TH durch das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) transportiert (75 % des Plasma- T_4), wobei ebenso das Thyroxin-bindende Präalbumin (Transthyretin, TTR, 20 % des Plasma T_4) und Albumin (5 % des Plasma T_4) sowie weitere Serumproteine (z.B. Lipoproteine, 3 % des Plasma- T_4) eine funktionelle Rolle beim Transport von TH spielen (Benvenega and Robbins 1993, Refetoff 2000, Schussler 2000). Lange Zeit wurde postuliert, dass nur höhere Säugetiere TBG als TH-Bindeprotein besitzen, jedoch konnte die Existenz auch in Nagetieren nachgewiesen werden (Vranckx et al. 1990).

Neben den klassischen Transportproteinen werden TH auch intrazellulär an Proteine gebunden. Bereits 1958 beschrieb J.R. Tata die Existenz eines intrazellulären T_4 -bindenden Proteins im Skelettmuskel und Hashizume et al. zeigte Ende der 80-er Jahre die hochaffine Bindung von T_3 an das NADPH-abhängige cytosolische T_3 -Bindungsprotein (p38CTBP), auch als μ -Crystallin (CRYM) bezeichnet (Hashizume et al. 1989, Suzuki et al. 2007). Die Funktion solcher cytosolischen TH-Bindungsproteine (CHTBP) ist jedoch weitestgehend unbekannt. Neben dem Transport von TH in den Zellkern können CHTBP als intrazelluläres Reservoir für TH dienen und deren genomische als auch nicht-genomische Signalwirkung beeinflussen (Takehige et al. 2014, Choi et al. 2015).

1.1.2 Zellulärer Schilddrüsenhormontransport und -metabolismus

Bereits 1954 nahmen Christensen *et al.* an, dass T_4 und T_3 durch einen aktiven Prozess in Tumorzellen transportiert und intrazellulär akkumuliert werden (Christensen et al. 1954). Dies widerspricht der „freien Hormonhypothese“ von Robbins und Rall, welche die passive Diffusion von TH in die Zielzelle postulierten (Robbins and Rall 1960).

Weitere Studien, die vorwiegend Ende der 70er Jahre publiziert wurden, bestätigen den Kanalvermittelten, stereospezifischen und sättigbaren Transport von TH in die Zielzelle (Eckel et al. 1979, Docter et al. 1982).

Seither wurden verschiedene transmembrane Proteine als potentielle TH-Transporter identifiziert. Viele Transmembranproteine besitzen jedoch ein breites Substratspektrum und nur wenige Transporter weisen eine spezifische Affinität zu TH und deren Metaboliten auf. Zu diesen zählen MCT8 und MCT10, die L-Typ Aminosäure-Transporter 1 und 2 (LAT1 und LAT 2), der Organische-Anionen-Transporter 1C1 (OAT1C1) und das Natrium-Taurocholat-cotransportierende Peptid (NTCP) (siehe Reviews (Visser et al. 2011, Schweizer and Kohrle 2013, Bernal et al. 2015).

Damit das biologisch aktive T_3 in der Zielzelle des extrathyroidalen Gewebes seine Wirkung erzielen kann, erfolgt eine katalytische Umwandlung von T_4 durch Deiodasen. Deiodasen gehören zu der Familie der Selenoproteine, welche im katalytischen Zentrum die Aminosäure Selenocystein (Sec) enthalten. Bisher wurden drei unterschiedliche Deiodasen (Dio1, Dio2, Dio3) identifiziert und charakterisiert (Kohrle 1999). Die mRNA aller drei Isotypen enthält eine Sec-Insertations-Sequenz (SECIS) in der 3'-UTR (untranslatierter Bereich), jedoch unterscheiden sich die Enzyme in ihrer katalytischen Aktivität, Substratspezifität und Kinetik (Bianco et al. 2002, Schomburg et al. 2004).

Deiodasen sind für die lokale und systemische Verfügbarkeit von TH verantwortlich und regulieren die TH-Aktivität durch die Metabolisierung von T_4 zu aktiven Iodthyroninderivaten und sind darüber hinaus für deren Inaktivierung verantwortlich (Visser and Peeters 2000). Die Deiodase 1 (Dio1) ist nicht-selektiv und katalysiert die Deiodierung sowohl am inneren Tyrosylring (Innenring-Deiodierung, IRD) als auch am äußeren Phenolring (Außenring-Deiodierung, ORD). Die Deiodase 2 (Dio2) wirkt selektiv am äußeren Ring (ORD) und die Deiodase 3 (Dio3) katalysiert spezifisch die Deiodierung von TH bzw. deren Metabolite am inneren Ring (IRD) (Abb. 1).

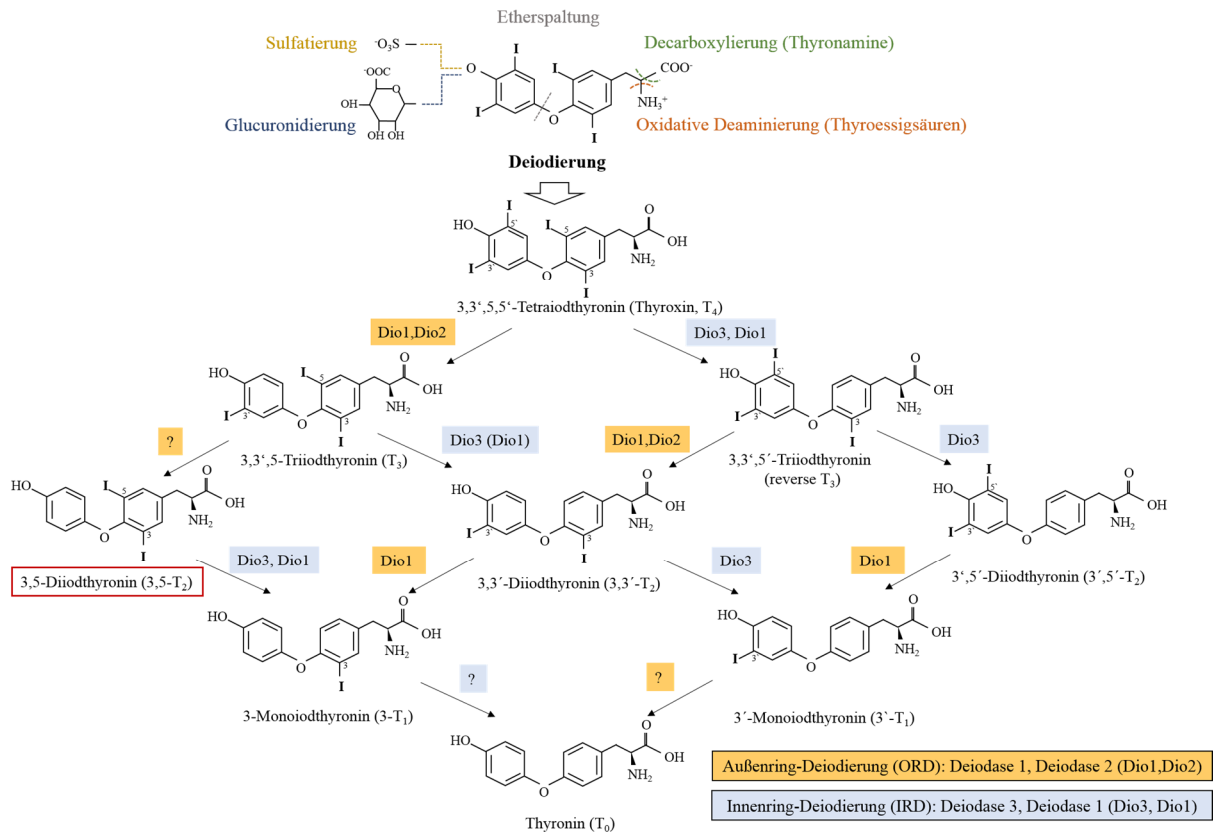


Abb. 1: Aktivierung und Metabolisierung von Schilddrüsenhormonen und deren Metabolite

Dargestellt sind die alternativen TH-Signalwege (Decarboxylierung, Deaminierung, Sulfatierung, Glucuronidierung und Spaltung der Etherbindung) sowie die enzymatischen Reaktionen von TH und deren Metabolite durch Deiodasen (Dio1,2,3). Die laut Literatur potentiell beteiligten Deiodasentypen sind in blauen und gelben Boxen markiert. Fragezeichen markieren diejenigen Reaktionen, für die bisher kein biochemischer Beweis erfolgte. Die Klammer um Dio1 betont, dass Dio3 wahrscheinlich hauptsächlich das Enzym ist, welches die IRD katalysiert. Der für diese Arbeit relevante TH-Metabolit 3,5- T_2 ist mit rotem Rahmen hervorgehoben (modifiziert nach (Kohrle 2002, Wu et al. 2005, Piehl 2008, Mondal et al. 2016).

An der Plasmamembran von Zellen der Leber, Niere, Schilddrüse und euthyreoten Hypophyse wird hauptsächlich die Dio1 exprimiert. Bei einer Hyperthyreose steigt die Aktivität des Enzyms an und Propylthiouracil (PTU) kann als effektiver Dio1-Inhibitor zur Behandlung eingesetzt werden. Die Dio2, welche hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, findet sich vornehmlich in Zellen des ZNS, der Haut, des Skelett- und Herzmuskels sowie im braunen Fettgewebe und der Hypophyse. Die Dio3 wird insbesondere in fetalen und neonatalen Geweben sowie in der Plazenta und im graviden Uterus exprimiert und lässt sich darüber hinaus auch im adulten ZNS nachweisen (Kohrle 1999, Croteau et al. 1996, Baqui et al. 2000, Gereben et al. 2008). Bei pathologischen Zuständen konnte eine gewebespezifische Reaktivierung der Dio3 beobachtet, z.B. bei Entwicklung einer ventrikulären Hypertrophie (Wassen et al. 2002).

Der endogen vorkommende und biologisch aktive TH-Metabolit 3,5-Diiodthyronin (3,5- T_2) ist für die vorliegende Arbeit hervorzuheben. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg ist die 3'-Deiodierung am äußeren Ring von T_3 (Abb. 1). Bisher fehlt jedoch der biochemische Beweis für diese Reaktion *in vitro* (Engler and Burger 1984, Piehl et al. 2008, Darras and Van Herck 2012).

Zusätzlich zur Deiodierung werden Iodthyronine auch durch Konjugation der phenolischen Hydroxy-Gruppe mit Sulfat bzw. Sulfonsäure oder Glucuronsäure metabolisiert (Abb. 1). Folglich wird die Wasserlöslichkeit erhöht und die renale und biliäre Exkretion beschleunigt. Darüber hinaus reduziert sich die Affinität der Hormon-Rezeptor-Wirkung von T_3 nach Sulfatkonjugation und beschleunigt dessen Umwandlung und Inaktivierung durch die Dio1 (Spaulding et al. 1992, Visser 1996). Die beteiligten Enzyme sind Sulfotransferasen (SULT) oder UDP-Glucuronyltransferase (UGT), die zur Familie der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme (FME) gehören.

Weitere alternative Metabolisierungsschritte von TH sind die oxidative Deaminierung und die Decarboxylierung der Alanin-Seitenkette des inneren Tyrosylrings. Dies führt zur Entstehung der entsprechenden Iodthyroacetate Triiodthyro-Essigsäure (Triac) und Tetraiod-Essigsäure (Tetrac), die als biologisch aktiv beschrieben werden (Wu et al. 2005). Eine weitere Gruppe von TH-Metaboliten, die sogenannten Thyronamine, können durch Decarboxylierung von Iodthyroninen entstehen. Der bekannteste Vertreter 3-Iodthyronamin (T_1AM) ist stoffwechselaktiv und kann in pharmakologischen Dosen bei Mäusen zur Erniedrigung der Körpertemperatur, des respiratorischen Quotienten und der Herzrate führen (Scanlan et al. 2004, Chiellini et al. 2007, Braulke et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die intestinale Ornithin-Decarboxylase potentiell die Decarboxylierung von T_4 und $3,5-T_2$ zu $3,5-T_2AM$ katalysiert. $3,5-T_2AM$ kann als Vorläufermolekül der T_1AM -Synthese betrachtet werden (Hoefig et al. 2015). Die Spaltung der Etherbindung innerhalb von TH kann zur vermehrten Entstehung von DIT führen. Diese Reaktion spielt physiologisch eine untergeordnete Rolle, tritt bei Infektionen jedoch verstärkt auf (Meinhold et al. 1991) (Abb. 1).

1.1.3 Molekulare Wirkmechanismen der Schilddrüsenhormone

In den 60-er Jahren zeigten Tata *et al.* in isolierten Rattenzellkernen erstmals den stimulatorischen Effekt von T_3 auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase und die daraus resultierende RNA-Synthese (Tata et al. 1963). Weitere Untersuchungen bestätigen die Existenz hochaffiner T_3 -Bindungsstellen im Zellkern von Rattengewebe (Oppenheimer 1972, Samuels et al. 1974) und bestärken die Theorie der Regulation transkriptionaler Aktivität durch Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR).

TR gehören zu der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und wirken als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die klassischerweise an TH-responsive Elemente (TRE) in der Promoterregion regulierter Gene binden. TR können in Abhängigkeit der An- oder Abwesenheit des Liganden als Repressoren oder als Aktivatoren ihre Wirkung entfalten. Wie alle nukleären Rezeptoren enthalten TR eine konservierte Liganden-Bindedomäne und eine hochkonservierte DNA-Bindungsregion mit zwei hintereinander geschalteten Zink-Fingern. Beide Regionen sind durch ein flexibles Zwischenstück miteinander verbunden. In der aminoterminalen und carboxyterminalen Region befinden sich jeweils Aktivierungsdomänen. Die LBD ist für die Ligandenspezifität des Rezeptors verantwortlich und verändert dessen Fähigkeit Homo- bzw. Heterodimere zu formen und mit weiteren nukleären Rezeptoren zu interagieren (Bogazzi et al. 1994, Schrader and Carlberg 1994, Bassett et al. 2003).

Der Heterodimer-Komplex TR/RXR (Retinoid X Rezeptor) bindet mit der größten Affinität an die DNA, hauptsächlich an TRE im Promoterbereich der Zielgene. Zusätzlich zu RXR beeinflussen direkt oder indirekt weitere nukleäre co-regulatorische Faktoren die transkriptionale Aktivität des TR: Vitamin D₃ Rezeptor, Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR), Retinsäure Rezeptor (RAR), Leber X Rezeptor (LXR), Corepressor (CoR), Coaktivator (CoA) (Yen et al. 2006). Die Assoziation von CoR mit dem TR/RXR-Komplex in Abwesenheit von T₃ verhindert die Genexpression. Bei der kanonischen Transaktivierung bewirkt T₃ eine Konformationsänderung am Rezeptor. Dies führt zur Aktivierung der Transkription TH-respovier Gene, wobei CoR durch CoA ersetzt wird (Brent 2012) (Abb. 2).

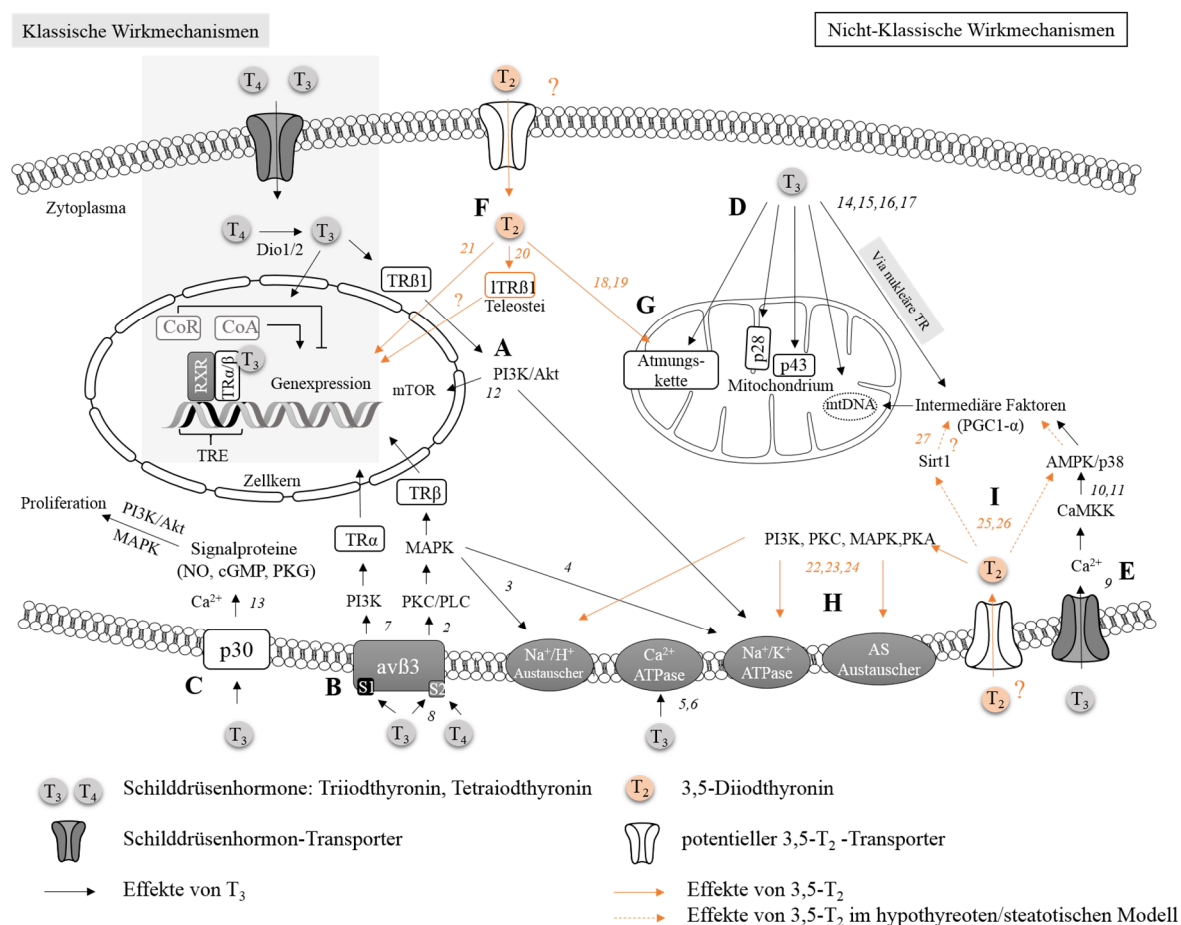


Abb. 2: Schematische Darstellung der klassischen und nicht-klassischen Wirkmechanismen von Schilddrüsenhormonen (TH) und 3,5-T₂

Klassische TH-Effekte (grau unterlegt):

TH werden durch TH-Transporter in die Zelle aufgenommen, wobei T₄ intrazellulär mittels Deiodasen (Dio1,2) in das biologisch aktive T₃ umgewandelt wird. Bereits bei Abwesenheit von T₃ binden TR an entsprechende Sequenzen TH-respovier Gene (TRE), was zu einer Hemmung der Transkription führen kann. Die Bindung von T₃ am TR bewirkt eine allosterische Konformationsänderung der TR und es kommt zu einem Austausch der Corepressoren durch Coaktivatoren und zur Stimulation der Transkriptionsmaschinerie mit anschließender Zielgentranskription.

Nicht-klassische TH-Effekte:

A Die Bindung von T₃ am cytosolischen TRβ1 führt zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase, induziert die Phosphorylierung von Akt und stimuliert die Expression von mTOR und weiterer Zielgene. Via PI3K kann TRβ1 auch die Na⁺/K⁺-ATPase stimulieren.

B T₃ führt bei Bindung an der S1-Domäne des membranständigen Integrins avβ3 zur Stimulation der PI3K, welches eine Phosphorylierung und Translokation des TRα1 vom Zytosol in den Zellkern bewirkt.

EINLEITUNG

Via PLC/PKC können T₃ und T₄ den MAPK/ERK1/2-Signalweg stimulieren. Dies kann die Aktivität des Na⁺/H⁺-Austauschers und der Na⁺/K⁺-ATPase beeinflussen und den Transport des cytosolischen TRβ1 in den Zellkern fördern.

C Die Bindung von T₃ am plasmamembranständigen p30 TRα1 induziert eine Signalkaskade via NO-cGMP-PKG und MAPK bzw. PI3K/Akt und reguliert die Zellproliferation.

D T₃ bindet an den in der Matrix lokalisierten mitochondrialen Rezeptor p43 TRα1, welcher als Transkriptionsfaktor direkt die Expression mitochondrialer Gene stimuliert und Komponenten der mitochondrialen Atmungskette und der Biogenese reguliert. Der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Rezeptor p28 TRα1 fungiert ebenfalls als T₃-Bindungsprotein und beeinflusst die mitochondriale Physiologie. Die Bindung von T₃ an nukleäre TR induziert indirekt die Transkription von intermediären Faktoren (z.B. PGC-1α), welche im Mitochondriengenom die Expression weiterer Gene der mitochondrialen Biogenese regulieren.

E T₃ aktiviert AMPK durch die Stimulation der intrazellulären Calciummobilisation und Induktion des Ca²⁺/Calmodulinkomplexes.

3,5-T₂-Effekte:

F 3,5-T₂ wird in die Zielzelle aufgenommen, jedoch sind der genaue Wirkmechanismus und beteiligte Transporter bisher nicht identifiziert. 3,5-T₂ kann intrazellulär die Expression TH-responsiver Gene regulieren. Die potentielle Beteiligung von nukleären TR ist bei supraphysiologischen 3,5-T₂-Konzentrationen möglich. In Knochenfischen fungiert 3,5-T₂ als Ligand für die lange Isoform des TRβ1 und beeinflusst physiologische Prozesse.

G Für 3,5-T₂ sind in Mitochondrien spezifische Bindungsstellen nachgewiesen worden. 3,5-T₂ bindet an der Untereinheit V des Cytochrom C (COX) - Komplexes der Atmungskette und beeinflusst deren Enzymaktivität. 3,5-T₂ kann zur Entkopplung der Atmungskette beitragen und die Aktivität der mitochondrialen ATP-Synthase beeinflussen.

H Schnelle Effekte an der Plasmamembran sind für 3,5-T₂ beschrieben. Über verschiedene Kinasesignalkaskaden (PI3K, MAPK) beeinflusst 3,5-T₂ den Na⁺/H⁺-Austauscher und den Aminosäure-Transport. Via PKA und PKC übt 3,5-T₂ einen inhibitorischen Effekt auf die Na⁺/K⁺-ATPase aus.

I Im hypothyreoten bzw. steatotischen Modell beeinflusst 3,5-T₂ die metabolische Rate und den Energiestoffwechsel unter Beteiligung des Sirtuin 1/AMPK/PGC-1α Signalweges.

Referenzen	Legende
1 (Brent 2012)	Akt Proteinkinase B
2 (Bergh et al. 2005)	AMPK Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
3 (Incerpi et al. 1999)	AS Aminosäure
4 (Lei et al. 2004)	ATPase Adenosintriphosphatase
5 (Davis et al. 1989)	avβ3 Integrin (Transmembranprotein)
6 (Smith et al. 1992)	CaMKK Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
7 (Bhargava et al. 2009)	cGMP cyclisches Guanosinmonophosphat
8 (Lin et al. 2009)	CoA/CoR Coaktivator/Corepressor
9 (Segal and Ingbar 1984)	Dio1/2 Deiodase 1/2
10 (Yamauchi et al. 2008)	ITRβ1 „lange“ Isoform des Schilddrüsenhormonrezeptor β in Teleostei
11 (Irrcher et al. 2008)	MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase
12 (Cao et al. 2005)	mtDNA mitochondriale DNA
13 (Kalyanaraman et al. 2014)	mTOR mechanistic Target of Rapamycin
14 (Casas et al. 1999)	NO Stickstoffmonoxid
15 (Pessemeesse et al. 2014)	p30 membranständiger Schilddrüsenhormonrezeptor α1 (verkürzt)
16 (Sterling et al. 1980)	p38 mitogenaktivierte Proteinkinase
17 (Weitzel et al. 2003)	p43, p28 mitochondrialer Schilddrüsenhormonrezeptor α1 (verkürzt)
18 (Arnold et al. 1998)	PGC-1α Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1α
19 (O'Reilly and Murphy 1992)	PI3K Phosphoinositid-3-Kinase
20 (Navarrete-Ramirez et al. 2014)	PKA Proteinkinase A
21 (Lietzow et al. 2016)	PKC Proteinkinase C
22 (Incerpi et al. 2002)	PKG Proteinkinase G
23 (Rochira et al. 2013)	PLC Phospholipase C
24 (Scapin et al. 2009)	RXR Retinoid X Rezeptor
25 (de Lange et al. 2011)	S1/S2 Domäne 1 und 2 des avβ3
26 (Lombardi et al. 2009)	Sirt1 Sirtuin 1
27 (Lombardi et al. 2015)	Teleostei Echte Knochenfische
	TRα/β Schilddrüsenhormonrezeptor α/β
	TRE Schilddrüsenhormon-responsive Elemente

TR liegen überwiegend als Spleißvarianten vor. Die Gene THRA und THRB liegen auf Chromosom 17 und 3 der DNA und codieren die Isoformen TR α und TR β . TR α 1, TR β 1 und TR β 2 binden TH und agieren als liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren. In vielen Geweben ist TR β 1 die vorherrschende Isoform und insbesondere in der Leber für die TH-abhängigen Effekte verantwortlich. In der Hypophyse und in Teilen des Hypothalamus ist insbesondere die Isoform TR β 2 exprimiert. Darüber hinaus ist auch TR α 1 in den Geweben weitläufig verbreitet. Vor allem im Herzen führt TR α 1 die für TH bekannten kardialen Effekte aus. TR α 2 bindet T₃-unabhängig an TREs der DNA und fungiert als dominant negative Rezeptorform (Cheng et al. 2010). Weitere TR Isoformen (TR α 3, TR β 3, TR β 4) und gekürzte Spleißvarianten (TR $\Delta\alpha$ 1, TR $\Delta\alpha$ 2 etc.) sind darüber hinaus charakterisiert, jedoch fehlt ihnen die Möglichkeit der Liganden- oder DNA-Bindung (Kinugawa et al. 2001, Chi et al. 2013).

Zusätzlich zu den beschriebenen Rezeptor-vermittelten Effekten von TH gibt es zahlreiche Beschreibungen über nicht-klassische Wirkmechanismen, die keine direkte Transkriptionsregulation und nachfolgende Proteinbiosynthese durch den TR hervorrufen (Cheng et al. 2010) (Abb. 2). Nicht-genomische Effekte, welche teilweise durch Membranrezeptoren vermittelt werden, können letztendlich auch in komplexe nukleäre und zelluläre Mechanismen enden. Dazu zählen nicht-genomische TR-abhängige Signaltransduktionskaskaden.

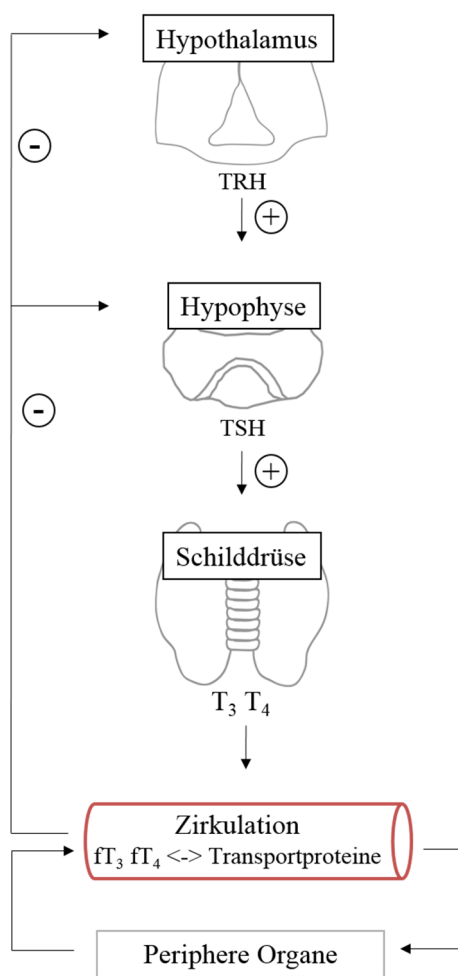
TH gelangen über plasmamembranständige Transporter in die Zielzelle, binden an zytosolischständige TR und initiieren Kinase-vermittelte Signalwege (Lin et al. 2009, Chi et al. 2013). Die Bindung der TH an das Plasmamembranprotein Integrin $\alpha\beta$ 3 stimuliert den MAP-Kinase-Weg (Mitogen-aktivierte Proteinkinase MAPK) und die extrazelluläre signal-regulierte Kinase (ERK1/2), welche für vielfältige zelluläre physiologische Effekte verantwortlich sind und Einfluss auf den extranukleären TR β und dessen nachgeschaltete Transkription nehmen. Die Bindung des T₃ an der S1 Domäne des Integrin $\alpha\beta$ 3 führt zur Aktivierung des PI3K-Signalweges (Phosphatidylinositol 3-kinase) und resultiert in einer nukleären Translokation und Phosphorylierung von TR α 1 und Beeinflussung der Expression des Hypoxie-induzierten Faktors 1 α (HIF-1 α) (Lin et al. 1999, Moeller et al. 2005, Davis et al. 2016). In Muskelgewebe konnte gezeigt werden, dass T₃ den Energiestoffwechsel durch schnelle und kurzfristige Aktivierung der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) und der Proteinkinase B beeinflusst (Irrcher et al. 2008). Bereits Ende der 70-er Jahre wurde die Existenz mitochondrialer Bindungsstellen für T₃ und dessen nachgeschaltete schnelle Wirkung auf mitochondriale Signalwege und Stimulation der oxidativen Phosphorylierung in Rattenlebern gezeigt (Sterling et al. 1980, Goglia et al. 1981). Die Arbeitsgruppe um Wrutniak identifizierte einen 43 kDa großen Rezeptor in der mitochondrialen Matrix (p43), der nach T₃-Bindung die mitochondriale Genexpression und Proteinbiosynthese stimuliert (Wrutniak et al. 1995, Casas et al. 1999). Darüber hinaus üben TH spezifische Effekte an der Plasmamembran aus und beeinflussen Ionenflüsse und -Kanäle wie die Aktivierung von Kaliumkanälen in Myozyten (Sakaguchi et al. 1996) und die Regulation des Natrium/Wasserstoff-Antiport in Myoblasten und embryonalen Hepatozyten (Incerpi et al. 1999, D'Arezzo et al. 2004).

Die Abbildung 2 stellt eine Übersicht der beschriebenen klassischen und nicht-klassischen Wirkmechanismen von TH dar. Die zellulären Effekte von 3,5-T₂ (orange markiert) sind ebenfalls dargestellt, werden jedoch erst im Abschnitt 1.4 detailliert beschrieben.

1.2 Regulation der Schilddrüsenhormonachse

Die Aktivität der Schilddrüsenepithelzellen und die Ausschüttung der TH unterliegen der Steuerung eines komplexen Regelkreises und werden über einen sehr feinen Rückkopplungsmechanismus reguliert, die sogenannte Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse).

Die hypophysiotropen Neurone des paraventriculären Nukleus des Hypothalamus produzieren das Tripeptid (Pyroglutamyl-histidyl-prolinamid) Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH). Über die Eminentia mediana wird das TRH in den Kapillarplexus des Hypophysenstiels sezerniert und gelangt dann über ein sogenanntes Portalsystem direkt in den Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse), wo es die Synthese, Freisetzung und Aktivität des Thyroidea-stimulierenden Hormons (Thyreotropin, TSH) in den thyreotropen Zellen der Hypophyse bewirkt (Zoeller et al. 2007)



Das glandotrope Peptidhormon TSH erreicht über den Blutkreislauf die Schilddrüse und bindet an den G-Protein gekoppelten TSH-Rezeptor an der basolateralen Membran des Thyreozyten. Die intrazellulären Domänen des Rezeptors aktivieren verschiedene G-Proteine (Gs, Gq) und lösen damit zelluläre Signalkaskaden aus, welche die Synthese und Freisetzung der TH, die Iodaufnahme und das Wachstum der Schilddrüse regulieren (Vassart and Dumont 1992, Zoeller et al. 2007).

Eine Erhöhung der TH-Konzentration im Blut führt zu einer negativen Rückkopplung auf der hypothalamischen und hypophysären Ebene. In den hypophysiotropen Neuronen des Hypothalamus unterdrückt T₃ TR-abhängig die Transkription als auch die posttranslationale Modifikation von TRH und reguliert ebenfalls über den TRβ1 die hypophysäre TSH-Expression und Freisetzung (Lechan et al. 1994, Sadow et al. 2003). Das Prohormon T₄ führt indirekt ebenfalls zu einem negativen Feedback, nachdem es in der Hypophyse als auch im Hypothalamus enzymatisch durch 5'-Deiodasen in T₃ umgewandelt wird (Abb. 3).

Abb. 3: Schematische Darstellung des thyreotropen Regelkreises

Die Sekretion von TRH stimuliert die TSH-Freisetzung in der Hypophyse, die wiederum die TH-Synthese in der Schilddrüse anregt. TH in der Zirkulation (frei oder Protein gebunden) üben eine negative Rückkopplung auf die TSH-produzierende Hypophyse und die hypophysiotropen TRH Neuronen aus.

Neben den TH können auch Signale des Energiestoffwechsels wie z.B. Fasten oder eine hochkalorische Ernährung als kritische Regulatoren auf die neuronale TRH-Ausschüttung wirken und den TH-Status beeinflussen (Fekete and Lechan 2014).

1.3 Wirkspektrum der Schilddrüsenhormone

TH spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation physiologischer und metabolischer Prozesse und sind essentiell für Wachstum, Entwicklung und Differenzierung. Größtenteils werden die Wirkungen des bioaktiven T₃ auf den Intermediärstoffwechsel über den kanonischen TR-abhängigen Signalweg vermittelt und die Expression der Zielgene direkt reguliert. Darüber hinaus wirken TH auf translationaler und posttranslationaler Ebene und können, wie bereits beschrieben, auch extranukleär ihre Wirkung entfalten.

Allgemein fördern TH anabole und katabole Reaktionen durch Modulation zentraler Stoffwechselprozesse und erhöhen somit den allgemeinen Substratflux (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die Wirkspektren von Schilddrüsenhormonen auf Zellebene
(Löffler 2014, Mullur et al. 2014, Mondal et al. 2016)

Stoffwechselprozesse	Steigerung der physiologischen Effekte
Allgemeiner Energieumsatz	Grundumsatz
	Thermogenese
	Sauerstoffverbrauch
	Aktivität Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
	Mitochondriale Entkopplung
Kohlenhydratstoffwechsel	Glukoneogenese
	Glykogenolyse
	Glykolyse
	Intestinale Resorption
Lipidstoffwechsel	Lipolyse und Fettmobilisierung
	Liponeogenese
	Synthese und Ausscheidung Cholesterin
Proteinstoffwechsel	Stimulation und Hemmung Translation und Transkription
	Protein-Turnover

Die Wirkungen der TH auf den Gesamtorganismus ergeben ein äußerst komplexes Bild und beeinflussen nahezu jedes Organsystem. Zu den wichtigsten Zielgeweben von TH zählen das zentrale Nervensystem, Knochen und Skelettmuskel, weißes und braunes Fettgewebe, Darm und Pankreas sowie Leber und das Herz-Kreislauf-System (Mullur et al. 2014).

Die physiologischen Effekte von TH auf das Herz- und Lebergewebe haben für diese Arbeit eine besondere Relevanz und werden in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Übersicht über die Wirkspektren von Schilddrüsenhormonen auf Organebene

(Danzi and Klein 2012, McAninch and Bianco 2014, Mullur et al. 2014, Senese et al. 2014, Vargas-Uricoechea et al. 2014)

Organystem	Steigerung der physiologischen Effekte
Herz-Kreislauf-System	Positiv inotrop Positiv chronotrop Systolische und diastolische Myokardfunktion Proliferation Kardiomyozyten Angiogenese
Leber	Cholesterinaufnahme, -synthese und -efflux Regulation Gallensäuresynthese Stimulation mitochondrialer Biogenese Glykogenolyse und Glukoneogenese Lipolyse und Liponeogenese Metabolisierung und Abbau von Schilddrüsenhormonen

Bei langandauernder Hyperthyreose:
Entwicklung einer Hypertrophie

1.4 Biologische Wirkung des Schilddrüsenhormonmetaboliten 3,5-T₂

Der Einsatz von TH als therapeutisches Mittel für Adipositas und deren sekundäre Begleiterkrankungen ist aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen (Herz-Kreislauf-System, HPT-Achse) in der Praxis nicht realisierbar. Als potentielle Regulatoren der Körperzusammensetzung rücken seit einigen Jahren TH-Derivate und -analoga in den Fokus der Wissenschaft. Insbesondere der „bioaktive“ TH-Metabolit 3,5-T₂ zeigt thermogene und kalorogene Effekte und wird als potentielles Gewichtsreduktionsmittel diskutiert (Moreno et al. 2008, Coppola et al. 2014, Coppola et al. 2016, Gnocchi et al. 2016).

Als eines der initialen Experimente konnte Horst *et al.* in Lebern hypothyreoter Ratten einen erhöhten Sauerstoffverbrauch messen, wenn diese kurzzeitig mit 1 pM des TH-Metaboliten 3,5-T₂ behandelt wurden (Horst et al. 1989). Weitere Untersuchungen zeigten die akute, extranukleäre Wirkung von 3,5-T₂ auf den mitochondrialen Stoffwechsel und die Stimulation der oxidativen Phosphorylierung und der mitochondrialen Atmung (Goglia et al. 1981, Lanni et al. 1992, O'Reilly and Murphy 1992, Lanni et al. 1994). Darüber hinaus wurde eine Untereinheit der Cytochrom C Oxidase im Mitochondrium als direkte Bindungsstelle für 3,5-T₂ identifiziert (Goglia et al. 1994, Arnold et al. 1998). Abbildung 2 im Abschnitt 1.1.3. stellt eine Übersicht der zellulären Effekte von 3,5-T₂ (orange markiert) dar, die partiell mit denen von klassischen TH überlappen.

Als endogen vorkommender Metabolit von TH, dessen detektierte Serumkonzentration in euthyreoten Probanden Assay-abhängig zwischen 0,01 und 0,3 nM variiert (Faber et al. 1982, Pinna et al. 1997, Pinna et al. 2002, Lehmpful et al. 2014), beeinflusst 3,5-T₂ systemisch den Energiestoffwechsel und die metabolische Aktivität. Zu endogenen 3,5-T₂-Gehalten im Serum und im Gewebe von Nagetieren liegen bis dato keine aussagekräftigen Ergebnisse vor.

Die chronische Gabe (4, 8 bzw. 12 Wochen) von 0,25 µg/g Körpergewicht (KG) 3,5-T₂ in Ratten, welche mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert wurden, aktivierte die hepatische Fettoxidation,

reduzierte die Lipidkonzentration in Leber und Serum und wirkte antisteatotisch (Lanni et al. 2005, Mollica et al. 2009, Padron et al. 2014). Die vergleichbare Dosis 3,5-T₂ erhöhte in hypothyreoten Ratten den Grundumsatz (Cimmino et al. 1996, Lanni et al. 1996, Moreno et al. 1997) und reduzierte in Nagetieren auf HFD das Körpergewicht und die Körperfettmasse (Lanni et al. 2005, de Lange et al. 2011, Grasselli et al. 2012). 3,5-T₂ verbesserte zudem die Glucose- und Insulintoleranz in Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten (Shang et al. 2013) und in HFD-gefütterten Wistarratten (de Lange et al. 2011, Moreno et al. 2011), wobei diese Beobachtungen in Ratten des Stammes Sprague-Dawley nicht bestätigt werden konnten (Vatner et al. 2015).

In den zitierten Rattenstudien wurden keine für TH bekannten thyromimetischen Effekte auf die HPT-Achse oder das Herz-Kreislaufsystem nach 3,5-T₂-Behandlung gezeigt. Dementsprechend wurde und wird der Einsatz von 3,5-T₂ als anti-lipidämische und hypokalorische Substanz diskutiert (Goglia 2014, Coppola et al. 2016).

Demgegenüber zeigten Studien *in vivo* und *in vitro* selektive thyromimetische Effekte von 3,5-T₂ und eine Beeinflussung der HPT-Achse durch den Metaboliten. 3,5-T₂ besitzt im Vergleich zu T₃ am TR eine bis zu 500-fach geringere Bindungsaffinität (Cheng et al. 1994, Ball et al. 1997). Supraphysiologische 3,5-T₂-Konzentrationen unterdrückten die TSH-Sekretion in Ratten und stimulierten die Dio1-Aktivität und die Genexpression des Wachstumshormons (GH) auf hypophysärer Ebene (Ball et al. 1997, Baur et al. 1997, Moreno et al. 1998, Padron et al. 2014). Es konnte darüber hinaus nach chronischer Gabe von 3,5-T₂ eine Vergrößerung des Herzens in Ratte und Maus beobachtet werden (Goldberg et al. 2012, Padron et al. 2014, Teixeira et al. 2016).

Der genaue Synthese- und Wirkmechanismus für 3,5-T₂ ist weitgehend unbekannt. In Knochenfischen wurde 3,5-T₂ als spezifischer Agonist für die lange Isoformvariante des TR β 1 identifiziert (Orozco et al. 2014). Demgegenüber stehen die extranukleären Wirkungen von 3,5-T₂, unabhängig von der Proteinbiosynthese (Gnocchi et al. 2016) (siehe Abb. 2).

Die Synthese von 3,5-T₂ aus T₃ wurde bisher *in vivo* in euthyreoten Ratten und Probanden gezeigt (Faber et al. 1982, Chopra et al. 1984, Moreno et al. 2002), der biochemische Beweis *in vitro* steht bisher jedoch aus (Piehl et al. 2008). Der Synthesort für 3,5-T₂ konnte bis dato nicht identifiziert werden, auch wenn eine extrathyroidale Bildung angenommen wird (Lehmpful et al. 2014).

Die Messung von endogenem 3,5-T₂ in Geweben, Plasma und Serum sowie in Zellsystemen ist theoretisch mit sensitiven Methoden wie der HPLC-Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) oder dem antikörperbasierten Immunoassay möglich (Lehmpful et al. 2014, Rathmann et al. 2015). Aufgrund der vorhandenen Spezies- und Gewebevielfalt ist dies praktisch immer noch eine analytische Herausforderung (Wang and Stapleton 2010, Ackermans et al. 2012).

1.5 Die Leber als zentrales Organ des Fremdstoff- und Steroidstoffwechsels

Die Leber ist ein Zielorgan für TH und für deren Metabolit 3,5-T₂. Darüber hinaus ist sie als zentrales Organ des Stoffwechsels auch für die Metabolisierung weiterer lipophiler Substanzen wie Fremdstoffe und Steroide verantwortlich. Im Zuge der hier vorgestellten Ergebnisse wird in diesem Abschnitt einleitend auf den Fremdstoffmetabolismus und die Steroid- und Cholesterinsynthese eingegangen.

Die Metabolisierung von Fremdstoffen in der Leber teilt sich in drei Phasen ein, welche eine entscheidende Bedeutung für die Detoxifizierung als auch Toxifizierung der Substanzen einnehmen. Phase I ist für die Funktionalisierung der lipophilen Stoffe und Einführung bestimmter Gruppen durch Oxidations-, Reduktions- oder Hydrolysereaktionen verantwortlich. Die Katalyse erfolgt überwiegend durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen und weiteren Oxidoreduktasen. In Phase II kommt es zu einer Kopplung von polaren Molekülen aus dem Intermediärstoffwechsel an funktionelle Gruppen der Fremdstoffe. Die Reaktionen erhöhen die Polarität und die modifizierten Substanzen können durch die gesteigerte Wasserlöslichkeit leichter über Galle oder Niere ausgeschieden werden. Als Konjugationspartner dienen unter anderem Glutathion, Uridindiphosphat (UDP)-Glucuronsäure, Acetyl-Coenzym-A, 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphatsulfat (PAPS), S-Adenosylmethionin oder Aminosäuren wie Glutamin. Die dritte Phase des Fremdstoffmetabolismus dient dem Export der Fremdstoff-Konjugate durch Transporter oder Effluxpumpen aus der Zelle und der anschließenden Exkretion über das renale oder biliäre System. Zu den Membrantransportsystemen gehören die Anionen-, Kationen- und ABC-Transporter. Bekannte Vertreter sind die organischen Anionentransporter (OAT) und die zur ABC-Familie gehörenden Multi-Drug Resistenz (MDR)-Transporter. Darüber hinaus spielen die basolateralen organischen Anionen-Transport-Polypeptide OATP eine bedeutende Rolle beim hepatischen *First-Pass*-Metabolismus (Xu et al. 2005). Zu dieser Familie zählen auch einige der bekannten TH-Transporter (Bernal et al. 2015) (Abb. 4).

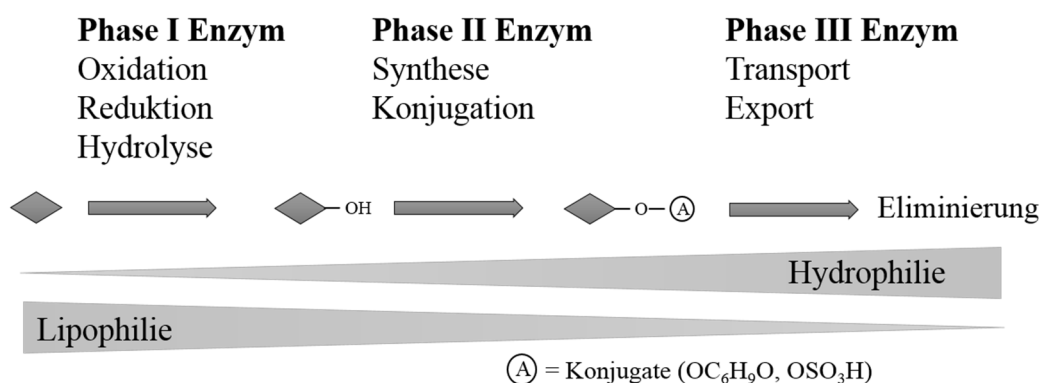


Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktion von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen

Lipophile Substanzen werden in hydrophile Substanzen (Symbol Raute) durch Phase I- und Phase II-Enzyme überführt und mithilfe von Phase III-Enzymen (Transporter) ausgeschieden.

Die Regulation der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme (FME) erfolgt größtenteils durch Transkriptionsfaktoren und nukleäre Rezeptoren, die endo- oder exogene Liganden mit spezifischen Merkmalen binden können.

Zu den bekanntesten Vertretern zählen der konstitutive Androstanrezeptor (CAR) und der Pregnan-X-Rezeptor (PXR). Anschließend folgt die Translokation des Ligand-Rezeptor-Komplexes in den Nukleus, die Heterodimerisierung und Wechselwirkung mit Cofaktoren und die Bindung an responsive Elemente der DNA mit abschließender transkriptioneller Aktivierung oder Inaktivierung der Genexpression von FME (Xu et al. 2005, Wallace and Redinbo 2013).

Gleichermaßen fungiert auch der LXR α und β als Transkriptionsfaktor und reguliert nach Bindung von Oxysterolen und oxidierten Cholesterinderivaten die Transkription von Zielgenen des Cholesterin-, Gallensäure- und Steroidstoffwechsels (Peet et al. 1998, Gabbi et al. 2014). LXRs spielen eine zentrale Rolle im hepatischen Lipidstoffwechsel und steuern u.a. die Expression der HMG-CoA-Reduktase und der Cholesterin-7 α -Hydroxylase (Cyp7a1), welche als Schrittmachereenzyme der hepatischen Cholesterinbiosynthese und Gallensäuresynthese gelten.

Interessanterweise überlappen sich partiell sowohl die DNA-Bindungsregionen als auch die Zielgene des LXR mit denen der TR und es konnte eine direkte Regulation der Expression von LXR α durch T₃ gezeigt werden (Berkenstam et al. 2004, Hashimoto et al. 2007). Für die Transkriptionsfaktoren Farnesoid X Rezeptor (FXR), Hepatozyten Nukleärer Faktor 4 α (HNF-4 α) und PXR, die an der Modulation des hepatischen Lipid- und Gallensäuremetabolismus beteiligt sind, wurde ebenfalls ein Zusammenhang zum TH-Status hergestellt (Breuker et al. 2010, Song et al. 2015, Wang et al. 2016).

Dieses komplexe Zusammenspiel zwischen den verantwortlichen Rezeptoren mit anderen nukleären Hormonrezeptoren und Transkriptionsfaktoren ist von entscheidender Bedeutung für die Funktion und Regulation der vielseitigen metabolischen Prozesse in der Leber.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die epidemische Verbreitung von Übergewicht und Adipositas mit den daraus entstehenden Begleiterkrankungen stellt im 21. Jahrhundert eine multidisziplinäre Aufgabe an die Gesellschaft und die Medizin dar. Wirksame Maßnahmen zur Prävention und Therapie sind langwierig und durch vorzeitige Gewichtszunahme nicht immer erfolgreich. Derzeit sind die hormonellen Kreisläufe und Mechanismen, die bei einer Gewichtszunahme des Körpergewichts beteiligt sind, unvollständig aufgeklärt.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der DFG-geförderten klinischen Forschergruppe 218/1 „Hormonal regulation of body weight maintenance“ und der darin integrierten „Maintain-Studie“ untersucht, inwiefern eine Aufrechterhaltung des Körpergewichts nach Gewichtsreduktionstherapie hormonelle Regelkreisläufe beeinflusst. In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (*DIfE*) Potsdam-Rehbrücke (AG Prof. Dr. Annette Schürmann, Dr. Wenke Jonas aus der Abteilung Experimentelle Diabetologie (DIAB)) wurde in verschiedenen Mausstudien getestet, inwieweit eine Änderung der Körperzusammensetzung nach Gewichtsabnahme und Gewichtszunahme den TH-Status beeinflusst.

In diesem Kontext wurde ein Mausmodell etabliert, bei dem die Tiere von Geburt an eine HFD erhalten und eine Diät-induzierte Adipositas entwickeln.

Nach einem Zeitraum von 20 Wochen unter HFD war dieses Mausmodell geeignet, um verschiedene Strategien zur Behandlung der induzierten Adipositas zu testen und ausgewählte Interventionsstudien durchzuführen.

Der TH-Metabolit 3,5-T₂ zeichnet sich durch seine metabolische Aktivität und seine lipidsenkende Wirkung aus. In verschiedenen Rattenstudien konnte die externe Gabe von 3,5-T₂ in Kombination mit einer fettreichen Diät die Entwicklung einer Steatose und weiterer hochfett-induzierten Komplikationen verhindern. 3,5-T₂ zeigte in diesem Zusammenhang keine für TH bekannten thyrotoxischen Nebenwirkungen (Lanni et al. 2005, Mollica et al. 2009, de Lange et al. 2011, Moreno et al. 2011).

Diesbezüglich wurde in diesem Projekt die Fragestellung formuliert:

Kann 3,5-T₂ in Mäusen mit einer von Geburt an Diät-induzierten Adipositas (HFD) einer weiteren Gewichtszunahme entgegensteuern und erzielt demnach einen therapeutischen Effekt, der für die Adipositas-therapie beim Menschen genutzt werden kann?

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von 3,5-T₂ hinsichtlich der Veränderung des Energiestoffwechsels und der Schilddrüsenhormonachse in euthyreoten Mäusen unter HFD und der Vergleich der Effekte in 3,5-T₂-behandelten Tieren unter Standarddiät (SD).

Mithilfe von vier verschiedenen Interventionsstudien in adipösen und in normalgewichtigen Mäusen wurden folgende Detailfragestellungen bearbeitet:

ZIELSETZUNG

- 1.) Welche Dosis von 3,5-T₂ erzielt in Mäusen unter HFD eine Änderung der Stoffwechselrate und metabolischer Parameter und sind diese Effekte mit T₃ vergleichbar?
- 2.) Hat 3,5-T₂ einen Einfluss auf die Schilddrüsenhormonachse in Mäusen unter HFD und SD?
- 3.) Inwieweit beeinflusst 3,5-T₂ den hepatischen Energiestoffwechsel und verändert das Transkriptom in der Leber?
- 4.) Hat 3,5-T₂ einen Einfluss auf das Herzgewicht der Mäuse und verändert die kardiale Gen- und Proteinexpression, ähnlich wie für T₃ beschrieben?

Um die Wirkungsweise von 3,5-T₂ in der Leber auf zellulärer Ebene im Detail zu charakterisieren, wurde ein Protokoll für die Isolation von primären Hepatozyten etabliert und die Effekte von 3,5-T₂ auf die Genexpression, den Sauerstoffverbrauch und den TH-Metabolismus untersucht. Darüber hinaus wurde die immortalisierte Myoblastenzelllinie H9c2 genutzt, um potentielle Effekte von 3,5-T₂ im kardialen Zellmodell durch die Expressionsanalyse verschiedener TH-responsiver Gene zu ermitteln.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte werden nachfolgend aufgelistet. Geräte, die für spezifische Methoden verwendet wurden, werden in den entsprechenden Methodenabschnitten erwähnt.

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipetten 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen, Falcon®	VWR, Darmstadt
Zellspachtel	TPP, Trasadingen, Schweiz
Sterilfilter 0,2 µm, Whatman	GE Healthcare, UK
Nylon Mesh 70 µm	Fisherbrand, Thermo Scientific, Waltham, USA
6-Well Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Nitrocellulose Western blotting membrane (Whatman®)	GE Healthcare, UK

Tab. 4: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Varioklav	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
DELFLIA Plateshaker	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Tissue Lyser	Qiagen, Hilden
Waage	Mettler-Toledo, Berlin
Waage CP 2201	Sartorius, Göttingen
Vortexer	A. Hartenstein, Würzburg
Ultra-Turrax T18	IKA, Staufen
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Western Blot Laufkammer	Peqlab, Darmstadt
iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München
Primus 96 MWG Biotech PCR Thermocycler	GE Healthcare, UK
Microplate Reader 3550 mit Inkubator	Bio-Rad Laboratories, München
Multimode Plate Reader	Tecan, Männedorf, CHE
Biohit Proline elektronische Mehrkanalpipetten	Sartorius, Göttingen
Perfusionspumpe	Ismatec, Wertheim

Gerät	Hersteller
Heraeus™ Megafuge™	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heracell™-Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wilovert inverses Mikroskop	Hund, Wetzlar
Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen
Mikrotom	Leica, München
Axioskop 2	Carl Zeiss, Jena
Axio Cam MRc5	Carl Zeiss, Jena
XFe96 Extracellular Flux Analyzer, Seahorse Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara, USA
XF Prep Station, Seahorse Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara, USA
Electrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare, UK
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories, München
Eppendorf concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpen LABOPORT®	KNF Neuberger, Freiburg
pH-Meter inoLab®	WTW, Weilheim
UV-Flächenstrahler	Benda, Wiesloch
AlphaImager HP system	ProteinSimple, San Jose, USA

3.2 Software und Datenbanken

Tab. 5: Software und Datenbanken

Software	Hersteller bzw. WebPage
Nucleotide NCBI National Center for Biotechnology	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore
BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat
Primer 3 Version 4.0	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Electronic-PCR	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/
EndNote X8	Thomson Reuters, New York, USA
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
SPSS Statistics 23	IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY, USA

Software	Hersteller bzw. WebPage
ImageJ 1.48	NIH USA
Microsoft Office 2013	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA/USA
Axio Vision Rel. 4.7	Carl Zeiss, Jena
Expression Console software	Affymetrix, Kalifornien, USA
Rosetta Resolver® software system	Rosetta Bio Software, Seattle, WA, USA

3.3 Antikörper und Reagenziensysteme

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind im Methodenteil Western Blot Analyse (Abschnitt 3.9.3) und Histologische Untersuchungen (Abschnitt 3.13) detailliert aufgeführt.

Tab. 6: Reagenziensysteme

Reaktionssystem (Kit)	Hersteller
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Darmstadt
RQ1 RNase-Free	Promega, Mannheim
Aurum™ Total RNA Mini Kit	Bio-Rad Laboratories, München
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad Laboratories, München
SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ambion® WT Expression Kit	Ambion/Life Technologies, Karlsruhe
GeneChip® WT Terminal Labeling and Controls Kit	Affymetrix, Kalifornien, USA
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, UK
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, München

3.4 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung allgemein verwendeter Lösungen und Puffer sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Methodenspezifische Puffer, Lösungen und Medien sind im jeweiligen Methodenabschnitt aufgelistet. Zur Herstellung wurde das mit der Anlage EASYpure UV™ (Barnstead International, USA) gewonnene Reinstwasser verwendet, das nachfolgend als dH₂O bezeichnet wird.

Tab. 7: Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

Puffer / Lösung	Zusammensetzung bzw. Herstellung
DEPC-Wasser	500 µl DEPC (Diethyl-Pyrocabonat) auf 0,5 L dH ₂ O geben, gut schütteln, nach Inkubation autoklavieren
20 x PBS	160 g NaCl, 4 g KCl, 28,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 4 g KH ₂ PO ₄ : in 1 L dH ₂ O, pH 7,5; Gebrauchslösung: 1:20 verdünnen mit dH ₂ O
Homogenisationspuffer	0,25 M Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 6 M NaOH in H ₂ O, pH 7,4

3.5 Lösung und Reinheitsgrad der Testsubstanzen

T₃ und 3,5-T₂ benötigen ein basisches Millieu, um sich in wässrigen Lösungen zu lösen. Für die Tierversuche wurden die Substanzen T₃ und 3,5-T₂ in physiologischer Kochsalzlösung mit 0,15 % NaOH gelöst. Der Reinigungsgrad wurde anschließend mittels LC-MS/MS untersucht und lag bei > 99,99 %. Für die Zellkulturexperimente wurden 3,5-T₂ und T₃ in einer Stocklösung von 10 mM in DMSO gelöst.

3.6 Tierexperimente

3.6.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierversuche wurden durch die zuständige Behörde des Ministeriums für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Landwirtschaft des Landes Brandenburg anerkannt. Die Tierexperimente wurden im Rahmen des DFG-geförderten Forschungsprojektes „*Hormonal regulation of body weight maintenance*“ (KFO 218/1) genehmigt und von Dr. Wenke Jonas (AG Prof. Dr. Annette Schürmann) aus der Abteilung experimentelle Diabetologie, Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (*DIfE*) unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die Zuchtpaare mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J (Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine, USA) wurden unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 22°C und einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus in der zentralen Tierhaltung des *DIfE* gehalten und erhielten standardisiertes Futter (Sniff, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Nach Absetzen wurden die männlichen Mäuse separiert und bekamen je nach Versuchsbedingung unterschiedliche Diäten.

Die Aufarbeitung der Gewebe als auch die nachfolgenden Analysen der dargestellten Ergebnisse erfolgten im Rahmen dieser Doktorarbeit am Institut für experimentelle Endokrinologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

3.6.2 Studiendesign

In Abhängigkeit des Versuchsdesigns erhielten die männlichen Tiere nach ca. 4 Lebenswochen bis zu einem Alter von 20 Wochen eine Standarddiät (SD) oder eine fettreiche Diät (HFD) *ad libitum*, um eine

Diät-induzierte Adipositas herbeizuführen (Tab. 8). Anschließend wurden die Tiere nach Diätgruppen separiert, und in Gruppen mit jeweils 6 - 8 Tieren eingeteilt.

Tab. 8: Zusammensetzung der Diäten vor Versuchsbeginn

Diätkomponenten	Standarddiät (SD)	Fetteiche Diät (HFD)
Fett (kcal %)	10	60
Kohlenhydrate (kcal %)	70	20
Protein (kcal %)	20	20
Cholesterin (mg/kg)	0,9	300,8

Research Diets (D12450B für SD, D12492 für HFD), New Brunswick, USA

In einer initialen Studie (Abb. 5A) wurde getestet welche Dosis 3,5-T₂ den Energieumsatz am Stärksten beeinflusste und metabolische Veränderungen in den Tieren unter HFD bewirkte. Dabei wurden den Mäusen über einen Zeitraum von 14 d täglich intraperitoneal (*i.p.*) 0,25 oder 2,5 µg/g Körpergewicht (KG) 3,5-T₂ injiziert. Die Kontrolltiere erhielten täglich *i.p.* eine physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %). Um die Wirkung von 3,5-T₂ mit denen von TH ausgehenden thyromimetischen Effekten vergleichen zu können, erhielten in einer vierten Versuchsgruppe Mäuse unter HFD täglich *i.p.* 0,03 µg/g KG T₃ für 14 d. Die eingesetzte Konzentration von T₃ wurde aus Vorstudien im Rahmen des Tierversuchsantrags an Mäusen abgeleitet (Prof. Dr. Ulrich Schweizer), in denen getestet wurde, welche *i.p.* verabreichte T₃-Konzentration Effekte auf den Energiestoffwechsel ausübt ohne den T₃-Serumspiegel zu beeinflussen. Im initialen Experiment zeigte sich, das nur die hohe Dosis 3,5-T₂ (2,5 µg/g KG) vergleichbar mit 0,03 µg/g T₃ metabolische Veränderungen im Tier bewirkte. Aus diesem Grund wurde diese Konzentration für die Versuchsdauer von 28 d in Mäusen unter HFD und unter SD eingesetzt (Abb. 5B und C).

Entgegen den Erwartungen konnte in den Langzeitversuchen eine Zunahme des Herzgewichtes festgestellt werden. Daraufhin wurden die Herzorgane stichprobenartig für histologische Untersuchungen in Paraffin eingebettet. In einem weiteren Experiment erhielten Mäuse unter HFD für 33 d 2,5 µg/g 3,5-T₂ und wurden 16 h vor dem Tod gefastet (Abb. 5D). Fokus dieses Versuchs war die Untersuchung des Glucose- und Insulinstoffwechsels am *DIfE*, welcher jedoch in dieser Arbeit nicht näher beleuchtet wurde. Die Herzorgane aus diesem Versuch wurden für Gen- und Proteinexpressionsanalysen entnommen.

Metabolische Parameter (u.a. Lipidgehalte Serum und Leber, Körperzusammensetzung mittels Magnetresonanztomographie (NMR) wurden am *DIfE* gemessen und die jeweilige Methode in (Jonas et al. 2015) publiziert. Eine Zusammenfassung und Bewertung dieser am *DIfE* erhobenen Ergebnisse befindet sich im Diskussionsabschnitt 5.1 (Tab. 30).

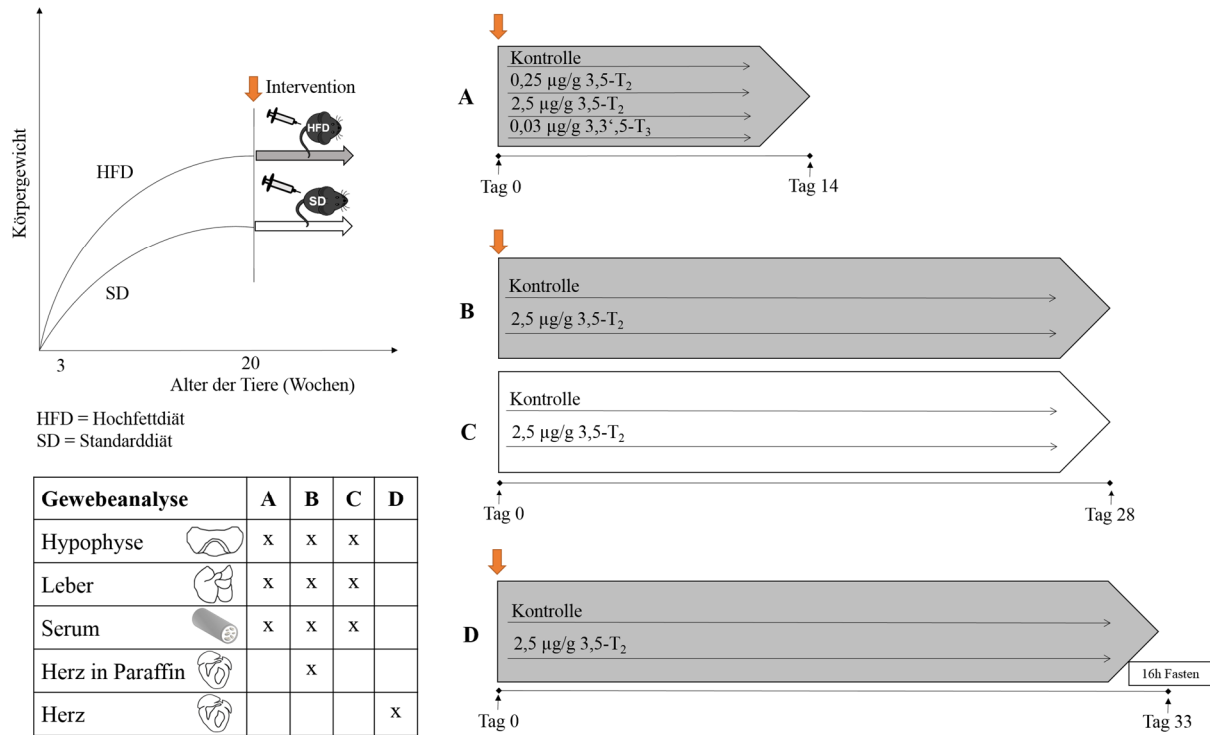


Abb. 5: Versuchsdesign Tierexperimente

Darstellung des verwendeten Mausmodells und Übersicht der am *Dife* durchgeführten Tierexperimente sowie Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Gewebe (A: Maus unter HFD, Intervention 14 d; B: Maus unter HFD, Intervention 28 d; C: Maus unter SD, Intervention 28 d; D: Maus unter HFD, Intervention 33 d).

3.7 Zellbiologische Methoden

3.7.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl der beiden verwendeten Zelltypen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:10 mit 0,4 % Trypanblau versetzt und unter den Rand eines Deckglases auf die Zählkammer pipettiert. Mittels Lichtmikroskop wurden die ungefärbten, lebenden Zellen innerhalb der acht Quadranten gezählt und der Zellzahldurchschnitt pro ml ermittelt.

3.7.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Alle verwendeten Medien sowie Zusätze für die Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten und H9c2-Kardiomyozyten sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Tab. 9: Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bestandteile Zellkultur und Herstellung Lösung bzw. Puffer	Hersteller
Dulbecco`s MEM (DMEM) mit NaHCO ₃ , 4,5 g/L L-Glutamin, 1 g/L D-Glucose	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) - Lösung: <i>EGTA wird in dH₂O aufgenommen und durch Zugabe von 1-2 Tropfen 1 M NaOH gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird auf 7,6 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.</i>	
Earle`s Balanced Salt Solution (EBSS)	Gibco, LifeTechnologies, Carlsbad, USA
EGTA-Puffer: <i>0,5ml 50 mM EGTA in 50 ml EBSS</i>	
Hanks`balanced salt solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
CLS Collagenase, Typ 1	Worthington Biochem. Co., Lakewood, USA
Kollagenase-Puffer: <i>0,3 mg/ml Kollagenase in 50 ml HBSS</i>	
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (10000 U/mL Pen, 10000 µg/mL Strep)	Biochrom, Berlin
Collagen G	Biochrom, Berlin
Kollagenmedium: <i>2,5 ml FCS, 0,5 ml 1 M Hepes, 0,5 ml Collagen G, 0,5 ml P/S in 50 ml DMEM-F12</i>	
Falcon™ Cell Strainer 70 µm Nylon	Fisher Scientific, Schwerte
TrypLE™ Express	Gibco, LifeTechnologies, Carlsbad, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
T ₃ und 3,5-T ₂ : <i>gelöst in DMSO als Stocklösung (10 mM)</i>	Henning Berlin GmbH

3.7.3 Primäre Hepatozyten

Für die Perfusion der Mauslebern wurden 3 Monate alte männliche C57BL/6N Mäuse verwendet. Die Tiere wurden unter Einhaltung des gängigen Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) in einem klimatisierten Raum unter 12-h-Tag-Nacht-Zyklus gehalten und erhielten Trockenfutter (Research Diets) und Trinkwasser *ad libitum*.

3.7.3.1 Isolierung

Die Zellkulturplatten (96-Well für Sauerstoffverbrauchsmessung, 6-Well für alle weiteren Analysen) wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit Kollagen-haltigem Medium beschichtet und bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und unter der Sterilbank für die Kultivierung der primären Hepatozyten getrocknet.

Für die Isolierung der primären Hepatozyten wurde unmittelbar nach der Kohlendioxid (CO₂)-Tötung den Mäusen der Bauchraum freigelegt und mit einer Kanüle die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) punktiert, welche durch ein Pumpensystem mit den Perfusionslösungen verbunden war. Als erstes wurde die Leber mit 20 ml EGTA-Puffer gespült, wobei durch Öffnung der Leberpfortader der Ablauf des Blutes und der Perfusionslösung gewährleistet werden konnte. Bei diesem Schritt trat eine Entfärbung der Leber von dunkelrot zu hellbraun auf und das in der Lösung enthaltene EGTA sorgte für die Komplexbildung der Ca²⁺-Ionen und Auflösung der Desmosomen. Anschließend erfolgte der Durchfluss von 50 ml der zweiten Perfusionslösung, welche die Kollagenase enthielt und für die Auflösung der extrazellulären Matrix und für die Freisetzung der Hepatozyten aus dem Leberparenchym verantwortlich war. Die Leber wurde ohne Gallenblase entnommen und in das Kulturmedium überführt. Unter der Sterilbank wurden die Hepatozyten aus ihrem Zellverband herausgelöst und im Kulturmedium durch einen Nylonfilter (70 µm Porengröße) filtriert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, resuspendiert (1x10 min und 2x5 min bei 43 rpm und 4°C) und in 20 ml Medium (DMEM mit 4,5 g/L Glucose) aufgenommen. Die suspendierten Zellen wurden abschließend gezählt und bei einer Lebendzellanzahl von > 70 % in 6-Well-Platten bei einer Dichte von 2*10⁵ Zellen pro ml ausgesät und im Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.7.3.2 Kultivierung und Behandlung

Das Medium der ausgesäten primären Hepatozyten wurde am Isolierungstag nach 4 h erneuert und am nächsten Tag durch ein 1 %-iges BSA-haltiges, FCS-freies Medium ersetzt (DMEM mit 1,5 g/L Glucose). Nach 24 h FCS-Fasten wurden die Zellen gewaschen und mit 3,5-T₂ (10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM) oder 100 nM T₃ für 24 h exponiert. Als Kontrolle diente das Kulturmedium mit 0,5 % DMSO (Tab. 10). Zur Untersuchung des TH-Metabolismus wurde PTU als Dio1-Inhibitor mit einer Konzentration von 1 µM und 10 µM initial ausgetestet. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden PTU-Konzentrationen hinsichtlich der Metabolitkonzentration. Aus diesem Grund wurden in weiteren Analysen die Zellen 1 h vor Exposition der Testsubstanzen mit 1 µM PTU prä-inkubiert und die Zellen im Anschluss für 24 h mit PTU und/oder den Testsubstanzen exponiert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche ohne PTU bzw. ohne Testsubstanzen mit dem DMSO-haltigen Medium 24 h inkubiert wurden.

Tab. 10: Übersichtsprotokoll für die Kultivierung und Behandlung von primären Hepatozyten

Tag 0 Kollagenbeschichtung Zellkulturplatten

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
Isolierung primäre Hepatozyten	FCS Depletion	Exposition	
Aussaat in Zellkulturplatten			
Mediumwechsel nach 4 h			
Medium: DMEM	DMEM	DMEM	
1 % Glutamin (Gln)	1 % Gln	1 % Gln	
4,5 g/L D-Glucose (D-Glc)	1,5 g/L D-Glc	1,5 g/L D-Glc	
10 % Fetales Kälberserum (FCS)	0 % FCS	0 % FCS	
1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)	1 % P/S	1 % P/S	
100 nM Natriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	100 nM Na ₂ SeO ₃	100 nM Na ₂ SeO ₃	
	1 % BSA	0,5 % DMSO	
		± PTU / 3,5-T ₂ / T ₃	24h → STOP

3.7.3.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Test

Mittels der MTT-Methode kann die Proliferation und Lebensfähigkeit von Zellen nach Inkubation der Testsubstanzen ermittelt werden. Bei dem Test wird der gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von Dehydrogenasen oder Oxidoreduktasen in Anwesenheit von Nicotinamadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) zu blau-violetten Formazankristallen reduziert und ist somit abhängig von der Stoffwechselrate und der NADPH-Produktion der Zelle (Berridge 1993). Nach Lyse der Zelle werden die gebildeten wasserunlöslichen Kristalle freigesetzt und können photometrisch erfasst werden.

Die primären Hepatozyten wurden laut Protokoll (Tab. 10) mit den Testsubstanzen behandelt und 200 µl MTT-Lösung (5 mg/ml MTT in PBS) ins konditionierte Medium gegeben und bei 37°C 1 ½ h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit 100 µl Lysispuffer (1165 µl 37%ige Salzsäurelösung in 50 ml Isopropanol) versetzt und 5 min unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl des Zellhomogenates auf eine 96er-Well-Mikrotiterplatte übertragen und die Absorption des umgesetzten Farbstoffs per Spektrometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte durch die Subtraktion des Leerwertes von den Messwerten und den Vergleich der Messwerte gegenüber der unbehandelten Kontrolle in % nach folgender Gleichung:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{(\text{Messwert Probe} - \text{Blindwert}) * 100}{(\text{Messwert Kontrolle} - \text{Blindwert})}$$

3.7.4 Kardiomyozytäre Zelllinie H9c2

3.7.4.1 Kultivierung, Differenzierung und Behandlung

Die H9c2-Kardiomyoblasten wurden ursprünglich aus embryonalem Gewebe des Ventrikelmyokards von BD1X-Ratten isoliert und weisen typische Charakteristika der Herzmuskelzellen auf. Beispielsweise können sie zu multinukleären Myotuben fusionieren (Kimes and Brandt 1976, Hescheler et al. 1991). Die Zelllinie wurde freundlicherweise vom Labor um Prof. M. Gotthardt (Max Delbrück Center for Molecular Medicine) zur Verfügung gestellt und als Kryostock gelagert.

Nach Auftauen der Kryokultur wurden die adhärent wachsenden undifferenzierten Myoblasten in T75-Flaschen in DMEM (4,5 g/L Glc, 10 % FCS) bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre gehalten. Für die einzelnen Experimente wurden Zellen bis maximal zur 18. Zellpassage verwendet.

Vor dem Start der Experimente wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, gezählt und in 6-Well-Zellkulturplatten mit 1*10⁵ Zellen pro ml Proliferationsmedium ausgesät (Tag 0). Bei einer Konfluenz von 80 % (Tag 1) wurde das Medium durch das Differenzierungsmedium (1 % FCS, 1,5 g/L Glucose) ausgetauscht und alle zwei bis drei Tage bis zur vollständigen Differenzierung erneuert. Die differenzierten H9c2-Zellen wurden am Tag 8 mit 3,5-T₂ (100 nM, 1 µM) oder 100 nM T₃ für 24 h exponiert. Als Kontrolle diente das Kulturmedium mit 0,5 % DMSO (Tab. 11).

Tab. 11: Übersichtsprotokoll für die Kultivierung, Differenzierung und Behandlung von H9c2-Zellen

Tag 0 Undifferenzierte H9c2	Tag 1 bei 80 % Konfluenz	Tag 8 Differenzierte H9c2	Tag 9
Aussaat in Zellkulturplatten	Mediumwechsel	Exposition	
Medium: DMEM 1 % Glutamin (Gln) 4,5 g/L D-Glucose (D-Glc) 10 % Fetales Kälberserum (FCS)	DMEM 1 % Gln 1,5 g/L D-Glc 1 % FCS 100 nM Na ₂ SeO ₃	DMEM 1 % Gln 1,5 g/L D-Glc 1 % FCS 100 nM Na ₂ SeO ₃ 0,5 % DMSO	
		± 3,5-T ₂ / T ₃	24h → STOP

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Organentnahme und Gewebepräparation

Die Organentnahme und Gewebepräparation erfolgte unter Leitung von Dr. Wenke Jonas am *DIFE*. Den Versuchstieren wurde 6 h vor Tötung der Futterzugang verwehrt. Nach Einleitung der Narkose mittels Isofluran erfolgte die Blutentnahme durch Punktion der *Vena cava*. Nach Tötung mittels Genickbruch wurden den Tieren die einzelnen Organe entnommen, diese unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

Das Herzgewebe aus dem 28-tägigen Versuch wurde nach Entnahme initial mit Formalin fixiert, durch eine Alkoholreihe entwässert und in Paraffinblöcken eingebettet (siehe Histologische Untersuchungen, Abschnitt 3.13).

3.8.2 Probenaufbereitung und Isolierung von RNA aus murinem Gewebe und Zellkulturhomogenat

Zur Bestimmung der Genexpression mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) im Gewebe als auch im Zellhomogenat wurde RNA extrahiert. Die Tabelle 12 zeigt die angewendeten Reagenzien, welche nach Angaben des Herstellers für die untersuchten Gewebe und Zellen verwendet wurden.

Tab. 12: Übersicht der angewendeten RNA Isolierungskits

Gewebe/ Zellhomogenat	Reagenzien
Leber	TRIzol reagent (Invitrogen, Karlsruhe)
Hypophyse	Aurum TM Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, München)
Herz	peqGold Trifast (Peqlab, Erlangen)
Primäre Hepatozyten und H9c2-Zelllinie	Aurum TM Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, München)

Das auf Trockeneis gelagerte Gewebe wurde mittels TissueLyser und Zugabe des Extraktions-Reagenz mechanisch zerkleinert und homogenisiert. Durch Zugabe von Chloroform mit anschließender Zentrifugation erfolgte die Trennung in eine Phenolchloroform-Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthält. Zur Präzipitation der RNA wurde die obere wässrige Phase mit eiskaltem Isopropanol versetzt. Nach Inkubation und Zentrifugation wurde die präzipitierte RNA mit 75 %-igem Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen, anschließend durch vortexen gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet luftgetrocknet und abschließend in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte eine DNase-Behandlung nach Angaben des Herstellers (RQ1 RNase-Free DNase) um potentielle kontaminierende genomische DNA zu entfernen.

Aufgrund einer geringeren komplexen Struktur im Vergleich zum oben beschriebenen Gewebe konnte die RNA von Zellen bzw. Hypophysen mit einer Säule aufgereinigt werden. Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurden die Hypophysen sowie die in 6-Well-Zellkulturplatten kultivierten Zellen mit Guanidium-Isothiocyanat und 2-Mercaptoethanol lysiert und mit dem Ultra Turrax homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol zum Lysat zur Herstellung optimaler Bedingungen erfolgte die Bindung der RNA an die Silicagel-Membran in der Säule. Nachfolgend wurden Kontaminationen durch mehrere Waschschrte und die genomische DNA durch RNase-freie DNase entfernt. Abschließend erfolgte die Elution der RNA von der Membran mit RNase-freiem Wasser.

3.8.3 Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Integrität

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgte mittels UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Aus der Extinktion der Lösung konnte die Nukleinsäure-Konzentration durch

folgende Gleichung berechnet werden, wobei 40 ng/μl ssRNA einer Absorptionseinheit (OD) von A260 entspricht.

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Die Qualität der RNA wurde durch das Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀ kontrolliert, wobei ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung steht.

Zur Kontrolle der Unversehrtheit der RNA erfolgte zusätzlich die Auftrennung der RNA-Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Tab. 13). Dabei wurde ein Formaldehyd enthaltendes Agarosegel verwendet. Die Elektrophorese der denaturierten und mit RNA-Ladepuffer versetzten Proben erfolgte bei 60 V in mit 1 x MOPS-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern. Unter UV-Licht wurden die RNA-Banden dargestellt und die RNA wurde als intakt bewertet, wenn die 18S- und die 28S-ribosomale Untereinheit klar erkennbar waren.

Tab. 13: Zusammensetzung RNA-Agarosegel

Puffer/Zutat	Zusammensetzung bzw. Herstellung
1 % RNA-Agarose-Gel	1 g Agarose in 90 ml dH ₂ O, 2,5 μl Ethidiumbromid, 6,5 ml 20x MOPS, 10,5 ml 37 % Formaldehyd
RNA-Ladepuffer	Spatelspitze Bromphenolblau, 720 μl 37 % Formaldehyd, 3,084 ml Formamid, 80 μl 500 mM EDTA pH 8,0, 4 ml 10x MOPS mit DEPC-H ₂ O auf 10 ml auffüllen
20 x MOPS Puffer	bei pH 7,0, 83,72 g MOPS, 8,2 g NaOAc, 3,4 g NaOH, 20 ml 0,5 M EDTA in 1 L dH ₂ O

3.8.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus der RNA erfolgte mittels dem iScript cDNA Synthese Kit nach Angaben des Herstellers. Folgender Mastermix wurde angesetzt, wobei 500 ng der gemessenen RNA eingesetzt und der Reaktionsmix auf 20 μl mit Wasser aufgefüllt wurde (Tab. 14). Die reverse Transkription erfolgte mittels Thermocycler bei folgendem Programm 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C und Abkühlung bis 4°C. Die cDNA wurde direkt im Anschluss verdünnt (1:3) und bis zur weiteren PCR-Analyse bei -20°C gelagert.

Tab. 14: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese

Komponente	Volumen pro Reaktion
5 x iScript Reaktionsmix	4 μl
iScript Reverse Transkriptase	1 μl
Wasser, nukleasefrei (Depc)	x μl
RNA Template 500 ng	x μl
Totales Volumen pro Ansatz	20 μl

3.8.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time PCR

Die Quantifizierung transkribierter Gene erfolgte mittels quantitativer real-time PCR (qPCR). Bei dieser speziellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird die Menge des entstandenen Produkts in Form von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit gemessen. Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR Green, der an doppelsträngiger DNA gebunden stärker fluoresziert als in freier Form. Dementsprechend verhält sich die Intensität der Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts (Livak and Schmittgen 2001). Für die Bestimmung der Expressionsstärke nutzt man die Zykluszahl, zu der sich das Fluoreszenzsignal gerade vom Hintergrund abhebt, dem sogenannten C_T -Wert (Threshold Cycle) (Abb. 6).

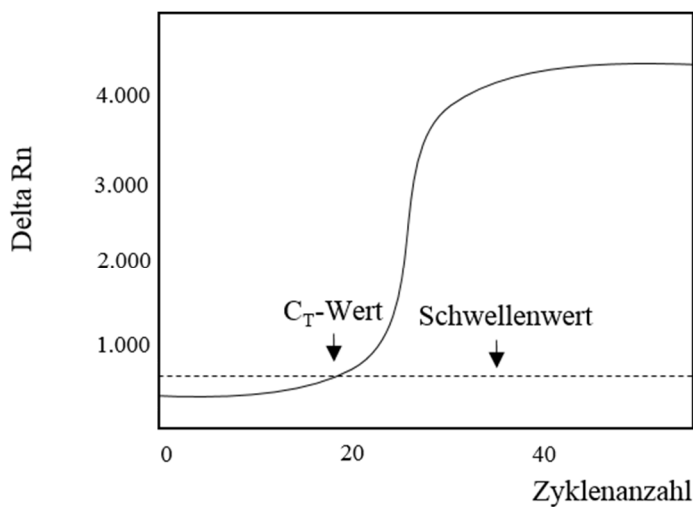


Abb. 6: Schematische Darstellung Amplifikations-Blot

Messung des Zeitpunktes bei dem sich das Fluoreszenzsignal (ΔRn) vom Hintergrund abhebt = Threshold Cycle (C_T) nach (Schmittgen and Livak 2008).

Mittels der qPCR kann dementsprechend eine absolute Quantifizierung stattfinden (Pfaffl 2001). Darüber hinaus und in folgender Arbeit angewendet kann die RNA-Templatmenge auch relativ quantifiziert werden. Dabei wird ein nicht reguliertes Gen (Housekeeping-Gen HKG), in diesem Fall Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (*HPRT*), als Referenz genutzt, auf das Zielgen bezogen und bietet somit die Möglichkeit zur Normierung der Expressionsergebnisse.

Pro PCR-Ansatz wurde 5 μ l cDNA (12,5 ng) jeder Probe mit 20 μ l des folgenden Mastermixes (Tab. 15) nach Angaben des Herstellers versetzt und in eine 96-Well-Platte pipettiert und abzentrifugiert.

Tab. 15: Mastermix für PCR-Ansatz

Komponente	Volumen pro Reaktion
SYBR-Green	12,5 μ l
Wasser	7 μ l
Primer 1 (100 nM)	0,25 μ l
Primer 2 (100 nM)	0,25 μ l
Totales Volumen pro Ansatz	20 μ l

Anschließend wurde folgendes Amplifizierungsprogramm im Thermocycler durchgeführt (Tab. 16).

Tab. 16: Übersicht Amplifizierungsprogramm

Vorgang	Temperatur und Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C, 15 min	
Amplifizierung	95°C, 30 sek (Denaturierung) X°C; 40 sek (X Annealingtemperatur siehe Tab. 17) 72°C, 25 sek und 3 min (Elongation)	} 39 Zyklen
Schmelzkurve	95°C 1 min, 54°C 1 min	
Abkühlung	bis 4°C	

Die abschließende Schmelzkurvenanalyse dient der Unterscheidung zwischen entstandenen PCR-Produkten und Primerdimeren anhand der Fragmentlänge und gibt daher Auskunft über die Spezifität der PCR-Reaktion. Die PCR-Produkte wurden stichprobenartig zur Qualitätskontrolle und Bestätigung der Produktgröße in dH₂O auf ein 2 %-iges DNA-Agarose-Gel (2 g Agarose in 98 ml SB-Puffer (Natriumborat) und 2,5 µl Ethidiumbromid) aufgetragen.

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mittels der $\Delta\Delta CT$ - Methode, bei der die Expression des Zielgens mit der eines Referenzgens (HKG) verglichen wird und dementsprechend Variationen der RNA-Ausgangsmenge ausgeglichen werden können. Folgende Gleichung diente zur Kalkulation der Zielgenexpression (Livak and Schmittgen 2001).

$$\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{HKG})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT\text{-Wert (Behandlung)} - \Delta CT\text{-Wert (Kontrolle)}$$

$$\text{Relative Genexpression:} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.8.6 Primerdesign

Die mRNA-Sequenzdaten der zu untersuchenden Gene wurden über die Datenbanken Nucleotide des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und BLAT search der UCSC Genome Informatics Group (UCSC) ermittelt. Mit dem Online-Programm Primer3web wurden die geeigneten Primer entworfen und die Sequenzen so gewählt, dass sie Intron-überspannend waren (Tab. 17). Mit den Programmen Primer-BLAST und ePCR.Reverse Search (NCBI) wurde abschließend die Ko-Amplifikation unerwünschter Fragmente und genomischer DNA kontrolliert und das Primerpaar gegen das gesamte Organismusgenom geprüft.

Tab. 17: Übersicht der Primersequenzen zur Amplifikation der Gene

Spezies	Gen-name	Primer Sequenz (5'→3')		Produkt-länge [bp]	Annealing-temperatur	UniGene-ID
		forward	reverse			
Maus	<i>Actc1</i>	CATGGAGAAGATC TGGCACC	CATCGCCAGAATC CAGAACA	230	58	NM_009608.4
Ratte	<i>Actc1</i>	CATGGAGAAGATC TGGCACC	GGGACGTTATGAG TCACACC	249	58	NM_009608.4
Ratte	<i>Atp2a2</i>	CTGACCCACGAGC TGTTAAT	CAGACTGCAATGC AAATGAG	232	58	NM_009722.3
Maus	<i>Atp2a2</i>	ACCTGCTTGTGCGG ATTCTT	GCGCTTCGATAGC GTTCTCT	180	62	NM_007504.2
Maus	<i>Coll1a1</i>	CAACAGTCGCTTC ACCTACA	ATTGGGGTGGAGG GAGTTTA	207	58	NM_007742.4
Maus	<i>Cpt1a</i>	CTACATCACCCCA ACCCATA	TTGGATGGTGTCT GTCTCCT	190	58	NM_013495.2
Maus	<i>Ctgf</i>	CCCAGACCCAACT ATGATGC	GCGATTTTAGGTG TCCGGAT	222	58	NM_010217.2
Maus	<i>Cyp7a1</i>	GATCCGTCTACGC ATGTTTC	CTTGGCCAGCACT CTGTAAT	206	58	NM_007824.2
Maus	<i>Dio1</i>	CCAGTACTTCTGGT TTGTCCTG	GAGGCAAAGTCAT CTACGAGTC	231	58	NM_007860.3
Maus	<i>Dio2</i>	CTCCAAGTGCCTCT TCCTGG	GACGTGCACCACA CTGGAAT	211	58	NM_010050.2
Maus	<i>G6pc</i>	ACTGTGGGCATCA ATCTCCTC	CGGGACAGACAG ACGTTACAGC	344	58	NM_008061.3
Maus	<i>Gpd1</i>	GCCACTTGAAGGC CAATAC	GAAAGTTGGGTGT CTGCATC	240	58	NM_010271.2
Maus	<i>Gpd2</i>	ATGAAGTGC GGAA CTACCTG	TTCCCACCTGCTA TTGTGAT	178	58	NM_001145820.1
Maus	<i>Hprt</i>	TGCGCTCATCTTAG GCTTTGT	GGCCAGACTTTGT TGGATTTG	144	62	NM_013556.2
Ratte	<i>Hprt</i>	TTATGGACAGGAC TGAAAGACTTG	CAGCAGGTCAGCA AAGAACTTATA	113	58	NM_013556.2
Maus	<i>Hsd17b7</i>	CTAATTACGTCACG GGCCAA	AGGAGGAGAGAT CGTCATGG	246	58	NM_010476.3
Maus	<i>Idi1</i>	GGATACCCTTGGGA AGAGGTTGA	TCCGGATTCAGGG TTACATTCT	142	58	NM_145360.2
Maus	<i>Kcne1</i>	AGGAGACAGCTGA ACAGGGC	CTTTCTCCTGCCA GGCATCT	219	62	NM_008424.3
Maus	<i>Me1</i>	GTCTTCCAAATATG GCATGAAT	ATAACAACCAAGT GAGCAATCC	249	58	NM_008615.2
Maus	<i>Myh6</i>	TATAAAGGGGCTG GAGCACT	AGGCGTTCCCTTCT CTGACTT	208	58	NM_010856.4
Maus	<i>Myh7</i>	GCCCTTTGACCTCA AGAAAG	ATGTCCTCGATCT TGTCGAA	183	58	NM_080728.2
Ratte	<i>Myh7</i>	GGAGCTCACCTAC CAGACAGA	CTCAGGGCTTCAC AGGCATCC	308	58	NM_080728.2
Maus	<i>Nppa</i>	TGAAAAGCAAACCT GAGGGCT	GGGCTTAGGATCT TTTGCGA	191	58	NM_008725.3
Maus	<i>Nppb</i>	GACCAAGGCCTCA CAAAAGA	AAAGAGACCCAG GCAGAGTC	234	58	NM_008726.5
Maus	<i>Nr1i3</i>	CCGTGTTGCCTCTG CTCACA	GGTTAGGGACCGG AAGAGC	101	62	NM_009803.5
Maus	<i>Nrfl</i>	CGCCACAGGAGGT TAATTCAGA	CGACCTGTGGAAT ACTTGAGC	127	58	NM_010938.4
Maus	<i>Pck1</i>	GTGCTGGAGTGGA TGTTTCGG	CTGGCTGATTCTC TGTTTCAGG	258	58	NM_011044.2
Maus	<i>Pln</i>	CAGAAAAGTGGCC AGCTAAG	GCGAGTGAGGTAT TGCACTT	212	58	NM_023129.5
Ratte	<i>Pln</i>	AACAGTCTGCATT GTGACGA	CGAGCGAGTAAG GTATTGGA	171	58	NM_023129.5
Maus	<i>Ppargc1a</i>	ATCAAGGTCCCA GGCAGTA	TTCTCGTCTCTTT GCGGTA	207	62	NM_008904.2

Spezies	Gen-name	Primer Sequenz (5'→3')		Produkt-länge [bp]	Annealing-temperatur	UniGene-ID
		forward	reverse			
Maus	<i>Scd1</i>	GCTGGGCAGGAAC TAGTGAG	GAAGGCATGGAA GGTTCAAA	190	58	NM_009127.4
Maus	<i>Serpina7</i>	TGGACAGCAGCTG AAACCAT	ACGAAAAGGATTT GCCCACT	238	62	NM_177920.5
Maus	<i>Slc22a7</i>	TTGGAGTTAGAGT GGCTGGA	TTAGAAGCCATCG TGCAGAC	205	62	NM_144856.2
Maus	<i>Sqle</i>	CCCTCTGGTGTGA TTCGAC	TACATCCTCTTCA AGCCCCA	229	58	NM_009270.3
Maus	<i>Sult1a1</i>	GCCCCACGGATCA TTAAGAC	CCAAGAAGCTTTC CCAGGTG	178	62	NM_133670.1
Maus	<i>Sult5a1</i>	TTCCACTTCCACCG AATAGC	TAGTAGAGCGAGG TTCCTGG	193	62	NM_020564.3
Maus	<i>Tfam</i>	TCCAAGCCTCATTT ACAAGC	CCAAAAAGACCTC GTTACAGC	106	58	NM_009360.4
Maus	<i>Tgfb1</i>	CGGCAGCTGTACA TTGACTT	GTGTTGTTGTAG AGGGCAA	153	58	NM_011577.2
Maus	<i>Thra</i>	AAACGCAAGCTGA TTGAGCA	CCGGCATGGAGAC AATAGGT	217	62	NM_178060.4
Maus	<i>Thrb</i>	GGACTCTGACTTG GACATGG	GCTTTGTCCCCAC ACACTAC	165	58	NM_009380.3
Maus	<i>Thrsp</i>	CAGTCATGGATCG GTACTCC	TCTTGAGCATGGT GAAGTAGG	150	58	NM_009381.2
Maus	<i>Trhde</i>	ATGCTGCTATGGA GAACTGG	CCTTCAACCACAC ATCTTCC	180	58	NM_146241.2
Maus	<i>Trhr</i>	GCCACTGTGCTTTA TGGATT	CCATAAAAGGGCA AACAGAA	219	58	NM_013696.2
Maus	<i>Tshb</i>	GGGTATTGTATGA CACGGGATA	ATTTCCACCGTTC TGTAGATGA	107	58	NM_009432.2
Maus	<i>Ugt2b37</i>	CTTCGCTTCACTGC AGGTTA	GCCCATGTGCTCA GCTAAGG	240	62	NM_053215.3

Die Primerpaare (Invitrogen) wurden nur dann für die PCR-Analysen verwendet, wenn sie im DNA-Agarose-Gel eine einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe aufwiesen und in der RNA- und H₂O-Kontrolle keine Nebenprodukte vorzufinden waren.

3.8.7 Transkriptomanalyse

Die Analyse der murinen hepatischen Transkriptome unter SD und HFD nach 3,5-T₂-Behandlung erfolgte mittels Affymetrix-Microarray-Technologie in der Abteilung für Funktionelle Genomforschung der Universitätsmedizin Greifswald durch Dr. Georg Homuth und Janine Golchert. Validierung der globalen Genexpressionsdaten, Dateninterpretation und Hypothesengenerierung wurden von mir selbstständig durchgeführt.

Die Isolierung der hepatischen Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des TRIzol® Reagenz in Anlehnung an das Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987).

Eine detaillierte Beschreibung von RNA-Extraktion und Microarray-Analyse befindet sich im Supplement-Teil 1 in (Lietzow et al. 2016). Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurde die gereinigte RNA unter Nutzung von Ambion® *WT Expression Kit* und GeneChip® *WT Terminal Labeling Kit* in cDNA umgeschrieben, Biotin-markiert und mit dem GeneChip® *Mouse Gene 1.0 ST*

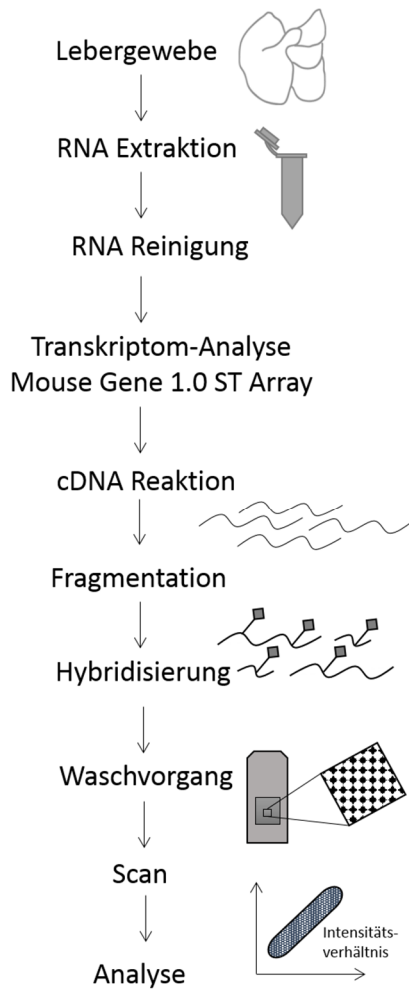


Abb. 7: Schematische Darstellung der Transkriptomanalyse

Array hybridisiert. Anschließend folgte der Waschvorgang und die Färbung der Arrays mit Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin unter Nutzung der Fluidics Station 450 (Affymetrix Inc.). Das Laser-induzierte Fluoreszenz-Signal konnte anschließend mit dem GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix Inc.) detektiert und das Scan-Bild mittels der *GeneChip® Command Console® Software* (AGCC) als CEL-Datei gespeichert werden (Abb. 7).

Die Qualitätskontrolle der Hybridisierung erfolgte durch visuelle Inspektion der Scan-Bilder unter Nutzung der AGCC-Software sowie durch Überprüfung der exogen zugefügten Markierungs- und Hybridisierungs-Kontrollen mit Hilfe der *Affymetrix® Expression Console™ Software*. Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle wurde die Datenauswertung mittels kommerzieller *Pipelines* der Rosetta Resolver® Software durchgeführt. Die Array-Daten wurden dafür per *Robust Multi-array Average* (RMA) normalisiert, die verschiedenen Bedingungen untereinander verglichen und statistisch nach folgenden Kriterien ausgewertet: One-way ANOVA mit stufenweiser Korrektur des Signifikanzniveaus nach Benjamini und Hochberg (False Discovery Rate) ($p \leq 0,05$) und Signal-Korrektur-Statistik

(*Affymetrix Ratio Builder Tools*) ($p \leq 0,05$). Nur Gene mit einem p-Wert $\leq 0,05$ und einem Fold Change $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$ wurden als signifikant differentiell exprimiert bewertet und in die weitere Auswertung einbezogen. Dabei diente die *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) Software der Identifizierung potentiell involvierter Signalwege, welche literaturbasierend nachfolgend analysiert wurden.

3.9 Biochemische Methoden

3.9.1 Isolierung von Protein aus Gewebe – und Zellextrakten

Für die Proteinextraktion wurde das Gewebe auf Eis in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit einer Stahlkugel unter Verwendung des Tissue Lyser pulverisiert. Anschließend wurde eine Spatelspitze des Gewebepulvers in 400 µl Homogenisationspuffer + 1 mM DTT aufgenommen und mittels Ultraschallstab homogenisiert. Für die Proteindetektion von Serca2 (Ca^{2+} -ATPase) mittels Western Blot wurde anstelle des Homogenisationspuffers RIPA-Puffer (Radio immunoprecipitation assay buffer) verwendet. Nach Zentrifugation (4°C, 15 min, 13.000 g) wurde die zytosolische Fraktion abgenommen, das Pellet in 200 µl Puffer + 1 mM DTT aufgenommen und mittels Ultraschall gelöst.

Für die Proteingewinnung aus Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten wurden diese mit eiskaltem PBS gewaschen und in 300 µl Homogenisationspuffer mit 1 mM Dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich) mit Hilfe eines Gummischabers aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der weitere Ablauf erfolgte analog zur Proteinisolierung im Gewebe, wobei keine Auftrennung in Proteinfractionen erfolgte.

3.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Die Proteinbestimmung in den Gewebe- und Zell-Lysaten erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Dieses Verfahren beruht auf der Anfärbung von Proteinen durch den sauren Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250, dessen Absorptionsmaximum bei 470 nm liegt und sich in Gegenwart von Proteinen zu einer Wellenlänge von 595 nm verschiebt. Die Änderung der Extinktion resultiert aus der Komplexbildung zwischen dem anionischen Farbstoff und den kationischen, nichtpolaren Seitenketten der Proteine und kann photometrisch gemessen werden.

Gemäß Herstellerangaben erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gewebe- und Zell-Lysaten unter Anwendung des Bradford-Protein Assay-Reagenz der Firma Bio-Rad Laboratories. Dazu wurden in Dreifachbestimmung 5 µl der Proteinprobe in einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt, mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt und 50 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben. Nach anschließender Inkubation im Plattenschüttler wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration mit der mitgeführten Standardreihe eines definierten Standards (1,38 µg/µl, Bio-Rad) bestimmt. Die Kalibrierung und Berechnung erfolgte über die Standardgerade und Erstellung einer linearen Regressionsgleichung, wobei nur ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,99$ in die Analyse einbezogen wurde.

3.9.3 Western Blot Analyse

Die Western-Blot-Methode dient zur Immundetektion von Proteinen. Mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) werden die Proteingemische aufgetrennt und unter Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und immobilisiert (Towbin et al. 1979). Anschließend wird das SDS ausgewaschen und es folgt die immunchemische Detektion mittels spezifischer Antikörper.

Das Gewebehomogenat (Pelletfraktion) wurde auf eine einheitliche Proteinmenge (je nach Verfügbarkeit 50 bis 100 µg) eingestellt und mit 4 x SDS-Probenpuffer und dem Reduktionsagens β-Mercaptoethanol versetzt und bei 95°C 5 min denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Anlegung eines elektrischen Feldes in einem SDS-Gel bei einer Spannung abhängig vom jeweiligen Geltyp (Sammelgel 80V, Trenngel 120V) (Tab. 18). Als Proteinmarker diente der PageRuler von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA).

Das Detergenz SDS bindet in der Elektrophoresekammer die Proteine über deren hydrophobe Reste und die Polypeptide werden unter den stark reduzierenden Bedingungen entfaltet und mit einer nach außen

negativen Ladung überzogen. Das Polyacrylamidgel besteht aus einem oberen, weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel. Bei ersterem werden die negativ geladenen Polypeptide aufkonzentriert und im unteren Gelteil werden die Proteine nach der Molekülgröße aufgetrennt. In einer Blottingapparatur erfolgte anschließend der Transfer mittels semi-dry-Verfahren auf einer Nitrocellulose-Membran bei 25 V und 25 min. Durch das Anfärben der Membran mit Ponceau-Rot wurde überprüft, ob die aufgetrennten Proteine des SDS-Gels effektiv auf die Nitrocellulosemembran transferiert worden sind. Nach Absättigung freier Bindungsstellen mit Milchpulver (5 % in Tris-gepufferte Kochsalzlösung) wurde die Membran mit dem Protein-spezifischen primären Antikörper in geeigneter Verdünnung mit 5 % Milchpulverlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Um nicht-gebundene primäre Antikörper zu entfernen, wurde am Folgetag die Membran mit Puffer (TBS-T) gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 1 h versetzt. Der polyklonale Zweitantikörper ist gegen den im Immunkomplex gebundenen Erstantikörper gerichtet und mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, horse radish peroxidase) kovalent konjugiert. Um überschüssige Antikörper-Enzym-Komplexe zu entfernen wurde die Membran mehrmals in Puffer gewaschen und anschließend mit dem Detektionsreagenz ECL (enhanced chemiluminescence system) inkubiert. Bei der Chemilumineszenzreaktion (ECL) katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol. Die dabei auftretende Lichtemission wurde mittels der Exposition eines Fotofilms (Kodak) visualisiert. Die Expositionszeit war dabei abhängig von den Proben und dem Antikörper.

Die Lichtintensität ist proportional zur detektierten Proteinmenge und zeigte sich anhand der Färbungsintensität der spezifischen Proteinbanden. Die Proteinmenge messbar an den Grau-Intensitäten der Banden wurde mit der Software ImageJ densitometrisch ausgewertet, in einen Zahlenwert transformiert und mit dem Referenzprotein (β -Aktin) normalisiert.

Tab. 18: Zusammensetzung SDS-Gel

	Sammelgel 10 % ¹	Sammelgel 15 % ²	Trenngel 5 % ^{1,2}
H ₂ O	2,5 mL	-	2 mL
Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	-
Sammelgelpuffer	-	-	1 mL
20 % Gellösung	5 mL	7,5 mL	1 mL
APS 10 % ³	100 μ l	100 μ l	40 μ l
Temed ⁴	10 μ l	10 μ l	4 μ l

¹ Antikörper Car, Serca2, β -Actin; ² Antikörper Pln, Cyt C ³ Ammonium Persulfate, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA ⁴ Tetramethylethylenediamine, Sigma Aldrich, Steinheim

MATERIAL UND METHODEN

Tab. 19: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper der Western-Blot-Analyse

Primärantikörper	Hersteller	Kat.Nr.	Verdünnung	Klonität
CAR 1/2	SantaCruz Biotechnology	M-127	1:200	polyklonal
SERCA2 ATPase	Abcam	2A7-A1	1:2500	monoklonal
Phospholamban	Thermo Fisher Scientific	MA3-922	1:500	monoklonal
Cytochrom C	Abcam	33484	1:2000	polyklonal
β-Aktin	Rockland	600-401- 886	1:3000	polyklonal
Sekundärantikörper	Hersteller	Kat.Nr.	Verdünnung	Klonität
HRP-conjugated anti-rabbit IgG	Dako	P0448	1:2000	polyklonal
HRP-conjugated anti-mouse IgG	SantaCruz Biotechnology	SC-2005	1:2000	polyklonal

Tab. 20: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
4 x SDS Probenpuffer	2 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 4 ml 100 % (w/v) Glycerol, 1,6 g (w/v) SDS, 2 mL (w/v) 100 % β-Mercaptoethanol, 100 µl 2 % (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 0,1 % (v/v) SDS, 0,5 % (v/v) Na-Deoxycholat
20 % Gellösung	162,3 mL 30 % Acrylamid, 65 mL 2 % Bisacrylamid, 22,7 mL dH ₂ O
Sammelgelpuffer	2 mL 20 % SDS, 50 mL 1 M Tris-HCl (0,5 M) in 100 ml dH ₂ O, pH 6,8
Trenngelpuffer	45,42 g Tris Base (1,5 M), 5 ml 20 % SDS (0,4 %) in 150 mL dH ₂ O, pH 8,8
10 x SDS Laufpuffer	288g 1,92 M Glycin, 60,6 g 0,25 M Tris, 20 g 1 % (w/v) SDS in 2 L dH ₂ O
10 x Transferpuffer	30 g Tris, 142 g Glycin, dH ₂ O ad 1 L
10 x TBS-T	25 mM Tris; 125 mM NaCl; 0,3 % Tween 20; (pH 8,0)
20 x PBS	160 g NaCl, 4 g KCl, 28,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 4 g KH ₂ PO ₄ , dH ₂ O ad 1 L, pH 7,5
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S, 3 % Trichloressigsäure, 3 % Sulfosalicylsäure
Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-T

3.10 Bestimmung der Dio1-Aktivität

Die Aktivität der Dio1 ließ sich mit zwei verschiedenen im Labor für experimentelle Endokrinologie etablierten Assays bestimmen. Im Lebergewebe konnte ein nicht-radioaktiver Dio1-Assay eingesetzt werden (Renko et al. 2012) und eine Einsparung von radioaktivem Material und speziell synthetisiertem Tracer, in diesem Fall radioaktiv markiertes rT_3 , mit limitierter Halbwertszeit erreicht werden.

Die Dio1-Aktivität in primären Hepatozyten wurde aufgrund der geringen Signalstärke und des limitierten Proteingehalts mit einem radioaktiven Dio1-Assay ermittelt, der die freigesetzte Menge des radioaktiven Iods vom markierten Tracermolekül misst (Leonard and Rosenberg 1978).

3.10.1 Radioaktiver Dio1-Assay

Die Quantifizierung der Deiodaseaktivität resultiert aus der Freisetzung von radioaktiv-markiertem Iodid (^{125}I) aus einer definierten Menge an radioaktiv markiertem revers Triiodothyronin (^{125}I - rT_3). Dabei kann gleichzeitig die Aktivität der Dio1 und Dio2 bestimmt werden. 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU) wird dabei als spezifischer Inhibitor der Dio1 eingesetzt und dementsprechend kann die Aktivität der Dio2 differenziert von der Dio1 betrachtet werden.

Die Aktivitätsmessung der Proben erfolgte im Triplikat als ungehemmter und PTU-gehemmter Ansatz. Über eine Sephadex LH-20 Säule (Sigma Aldrich, Steinheim) wurde das markierte ^{125}I - rT_3 durch Adsorptionschromatographie aufgereinigt, der Tracer im Stickstoff-Strom eingedampft und die Aktivität im Gamma-Counter überprüft. Es folgte die Zusammensetzung des Substratmix nach folgendem Protokoll (Tab. 21).

Tab. 21: Zusammensetzung Substratmix des radioaktiven Dio1-Assays

Komponente	Volumen pro Reaktion
1 M KPO_4 -Puffer + 10 mM EDTA	10 μ l
1 M DTT	2 μ l
40 mM NaOH	0,41 μ l
1 mM rT_3	0,1 μ l
dH ₂ O	37,49 μ l
Totales Volumen pro Ansatz	50 μ l

Anschließend wurde der aufgereinigte Tracer in der berechneten Substratmixmenge gelöst. 50 μ l des Tracer-Substrat-Mixes wurden zu 40 μ l der eingestellten Proteinproben (0,25 μ g/ μ l) mit jeweils 10 μ l dH₂O oder PTU gegeben und bei 37°C und 60 min inkubiert. Die Zugabe von 50 μ l BSA-Lösung stoppte die Aktivität der Deiodasen. Den H₂O-Kontrollproben, welche nur 10 μ l dH₂O und 50 μ l Tracer-Substrat-Mix enthielten, wurde erst jetzt 40 μ l des Proteinhomogenates zugesetzt. Anschließend wurden die Proteine mit 400 μ l eiskalter 10 %-iger Trichloressigsäure ausgefällt. Nach Durchmischung und 5-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde 480 μ l des Überstandes auf die mit 10 %-iger Essigsäure gespülten Dowex-50W-X2-Säulen gegeben. Die freigewordenen ^{125}I -Anionen wurden über die Säule

mit 2 ml 10 %-iger Essigsäure eluiert und in einem Zählröhrchen aufgefangen. Die Messung der radioaktiven Aktivität erfolgte im Gammacounter (LKB Wallac 1277 Gammamaster).

Die Gesamtaktivität der 5'-Deiodasen berechnete sich aus den Proben, die mit dH₂O versetzt wurden, hingegen die Aktivität der Dio2 in den mit PTU-versetzten Ansätzen ermittelt wurde. In den primären Hepatozyten wurde keine Dio2-Aktivität gemessen. Die Enzymaktivität der Dio1 berechnete sich aus der Differenz von Gesamtaktivität und Dio2-Aktivität nach folgender Formel:

$$= \frac{2 \times \text{nmol}_{\text{rT}_3} \times 1000 \times 1000 \times (\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Kontrolle}})}{\text{cpm}_{\text{Tracer-Substratmix}} \times 100 \% \times \text{mg}_{\text{Protein}} \times \text{min} \times 480/550}$$

nmol_{rT₃}: Menge an eingesetztem unmarkiertem rT₃

cpm: Impule (counts) pro Minute

cpm_{Probe}: ¹²⁵I- Freisetzung durch Deiodierung

cpm_{Kontrolle}: ¹²⁵I- Freisetzung durch nicht-enzymatische Deiodierung

min: Inkubationszeit bei 37°C

mg_{Protein}: Menge an eingesetztem Protein

cpm_{Tracer-Substratmix}: Aktivität des Tracer-Substratgemisches (zwischen 30.000 - 80.000 cpm)

Faktor 480/550: 480 µl von 550 µl Gesamtvolumen werden auf die Säule übertragen

Der Faktor 2 in der Formel berücksichtigt die Tatsache, dass im phenolischen Ring des rT₃ nur die 5'-Position radioaktiv markiert wurde, wodurch nur 50 % der Aktivität durch die ¹²⁵I-Freisetzung erfasst werden konnte.

3.10.2 Nicht-radioaktiver Dio1 Assay

Die Dio1-Aktivität im Lebergewebe der Mäuse wurde mit dem nicht-radioaktiven Dio1-Assay gemessen, der auf den Iodidnachweis nach Sandell-Kolthoff basiert. Unter sauren Bedingungen wird dabei die katalytische Fähigkeit von Iodid auf die Redox-Reaktion von gelbem Cerium (Ce⁴⁺) und Arsen (As³⁺) zu farblosem Ce³⁺ und As⁵⁺ photometrisch vermessen (Sandell and Kolthoff 1937). Zum Start der Reaktion wurde 40 µl des Proteinhomogenats mit einem Gehalt von 20 oder 40 µg (abhängig von der Aktivität) aus dem Lebergewebe mit 10 µl H₂O oder PTU (10 mM) als Kontrollen vorgelegt und 50 µl des vorbereiteten Substratmix hinzugegeben (Tab. 22).

Tab. 22: Zusammensetzung Substratmix des nicht-radioaktiven Dio1-Assays

Komponente	Volumen pro Reaktion
1 M KPO ₄ -Puffer, pH 6,8	10 µl
1 M DTT	4 µl
1 mM rT ₃	1 µl
dH ₂ O	35 µl
Totales Volumen pro Ansatz	50 µl

Das Gemisch wurde anschließend bei 37°C für 120 min inkubiert, die Reaktion auf Eis abgestoppt und die Proteine durch 5-minütige Zentrifugation bei 15.000 g und 4°C ausgefällt. Für die Iodquantifizierung wurden 75 µl des resultierenden Überstands auf eine Dowex W50-X2 Harz-Säule gegeben und die Reaktion mit 100 µl 10 %-iger Essigsäure abgestoppt. Es folgte die Elution des freien Iodids aus den Säulen unter Anlegung eines Vakuums. 50 µl des verdünnten Eluats (je nach Aktivität 1:2,1:4 oder 1:8) wurde anschließend in eine Mikrotiterplatte übertragen und die Sandell-Kolthoff-Reaktion durch Zugabe von jeweils 50 µl Ceriumpuffer (22 mM (NH₄)₄Ce(SO₄)₄, 0,44 M H₂SO₄) sowie 50 µl Arsenit-Puffer (25 mM NaAsO₂, 0,8 M NaCl, 0,5 M H₂SO₄) per elektronischer Multikanalpipette gestartet. Die Absorptionsänderung (ΔOD) vom Startpunkt der Reaktion und nach 21 min wurde bei 415 nm mittels Plattenphotometer gemessen. Die Aktivitätsbestimmung in pmol/(min*mg Protein) erfolgte durch die Subtraktion der PTU-Kontrollen von der ΔOD und die Berechnung mittels polynomischer Funktion basierend auf der linearen Regression und mitgeführten Iodidstandardkurven (Renko et al. 2012).

3.11 Bestimmung der Konzentration von Schilddrüsenhormonen und deren Metaboliten im murinen Gewebe und in Zellkulturüberständen und -homogenaten mittels LC-MS/MS

Die Erhebung der Daten via LC-MS/MS erfolgte im Rahmen der Protokoll- und Methodvalidierung von Dr. Daniel Rathmann und Dr. Carolin S. Hoefig. Die präanalytische Aufarbeitung der Leber- und Serumproben aus dem 14-tägigen Versuch wurde von Franziska Wohlgemuth durchgeführt (Jonas et al. 2015). Die Leber- und Serumextraktion des 28-tägigen Versuchs als auch die Extraktion von Zellkulturüberständen und -homogenaten wurden selbstständig ausgeführt. Die Proben wurden von Dr. Daniel Rathmann / Dr. Carolin Hoefig bzw. Dr. Keith Richards mittels der LC-MS/MS 5500 (Labor Prof. Dr. Hannelore Daniel, Technische Universität München) bzw. LC-MS/MS 6500 (Institut für experimentelle Endokrinologie, Charité) vermessen.

Jeweils 10 pmol der internen Standards ¹³C₆-T₃, ²H₅-T₄, ¹³C₆- 3,3'-T₂ (Isoscience, King of Prussia, USA), ¹⁵N-3,5-T₂ (Thomas S. Scanlan, OHSU, Portland, USA) wurden in DMSO gelöst und als Standardmix in der jeweiligen Extraktion verwendet.

3.11.1 Extraktion von Schilddrüsenhormonen und 3,5-T₂ aus Lebergewebe

Für die Extraktion der TH und 3,5-T₂ aus dem Lebergewebe wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode (LLE) angewandt, bei der das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten zweier Stoffe und die resultierende Bildung zweier nicht-löslicher Phasen ausgenutzt wird, um Substanzen in einer Phase, in der sie besser gelöst werden, anzureichern.

Der Zellaufschluss des auf Trockeneis gelagerten Lebergewebes (ca. 100 mg) erfolgte durch die Zugabe von 400 µl Homogenisationspuffer und Zerkleinerung mittels Dounce-Homogenisator. Anschließend wurde zu dem Homogenat 50 µl 100 %-iger Essigsäure gegeben, mit internem Standardmix versetzt und zur Equilibrierung bei 37°C für 30 min inkubiert.

Die Proteine wurden durch die Zugabe von eiskaltem Aceton (ca. 1500 µl) gefällt und die Proben im Anschluss gemischt, 15 min bei -20°C inkubiert und für 10 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden mittels Vakuumpkonzentrator auf ca. 600 µl Endvolumen eingedampft und mit 1 µl 30 %-iger Salzsäure angesäuert. Es folgte eine Delipidation durch zweifache Cyclohexanbehandlung. Dabei wurden jeweils 540 µl Cyclohexan zu den Proben gegeben, diese durchmischt und 2 min bei 2.000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere Cyclohexanphase wurde anschließend verworfen und die untere Phase mit 5 µl 30 %-iger Salzsäure versetzt. Dann folgte die dreifache Essigsäureethylester-Extraktion. Dabei wurde zur Lösung jeweils 1 ml Essigsäureethylester gegeben und die Proben für die Phasentrennung gemischt und 2 min bei 2.000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere Essigsäureethylesterphase wurde anschließend unter Vakuum bei 45°C bis zur vollständigen Trocknung eingedampft und die Proben in 30 µl dH₂O-Methanol-Essigsäure-Gemischs (1 % Essigsäure in dH₂O und Methanol (90:10 (v/v))) gelöst, gemischt und bei -20°C für die LC-MS/MS-Analyse aufbewahrt.

3.11.2 Extraktion von Schilddrüsenhormonen und 3,5-T₂ aus Seren

Die terminale Blutentnahme bei den Mäusen erfolgte durch Punktion der *Vena cava*. Das Blut wurde anschließend 15 min bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -80°C gelagert. Für die Extraktion der TH und 3,5-T₂ wurde die Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction) genutzt, bei der durch säulenchromatographische Probenaufreinigung eine Anreicherung des Analyten erreicht wird.

Zu 98 µl Serum wurde der Standardmix pipettiert, kurz gemischt und die Proben 5 min auf Eis inkubiert. Die Proteinfällung erfolgte durch die Zugabe von 300 µl Ameisensäurem Acetonitril (1 % Ameisensäure in Acetonitril (1:3 (v/v))). Im Anschluss wurden die Proben durchmischt, 45 min auf Eis inkubiert, nochmals durchmischt und 7 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde auf die HybridSPE Kartuschen gegeben und unter Vakuum abgesaugt. Dabei treten insbesondere die für Matrixeffekte verantwortlichen Phospholipide in Wechselwirkung mit der Zirkonium-beschichteten Festphase aus Kieselgel und werden auf der Kartusche festgehalten.

Das Eluat wurde anschließend bis zur Trocknung bei 45°C eingedampft und die Proben mit 30 µl dH₂O-Methanol-Essigsäure-Gemischs gelöst, gemischt und bei -20°C für die LC-MS/MS-Analyse aufbewahrt.

3.11.3 Extraktion von Schilddrüsenhormonen und deren Metaboliten aus Zellkulturüberständen und -homogenaten

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) wurde für die Extraktion der TH und deren Metabolite aus Zellkulturüberständen und -homogenaten verwendet (Piehl et al. 2008, Rathmann et al. 2015).

Das konditionierte Medium wurde aus den 6-Well Zellkulturplatten abgenommen und bei 1000 g 10 min bei 4°C zentrifugiert, um potentielle Zellrückstände zu entfernen. 400 µl des Überstands wurden

anschließend mit 5 µl 30 %-iger Salzsäure und internem Standardmix versetzt, gemischt und bei 37°C 30 min inkubiert. Zu den Überständen wurde 1 ml einer tert-Butylmethylether/Isopropanol-Lösung gegeben und die Proben für 5 min gemischt und im Vakuumkonzentrator bis zur Trocknung bei 45°C eingedampft. Die Extraktion mit tert-Butylmethylether/Isopropanol wurde anschließend noch einmal wiederholt und die extrahierten Pellets mit 100 µl dH₂O-Methanol-Essigsäure-Gemischs gelöst, gemischt und bei -20°C für die LC-MS/MS-Analyse aufbewahrt.

Für die Extraktion aus Zellhomogenaten wurden die Zellen mit 200 µl Homogenisationspuffer lysiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Zellhomogenat mit 20 µl 100 %-ige Essigsäure und internem Standardmix versetzt und bei 37°C 30 min inkubiert. Es folgte die Proteinpräzipitation mit 600 µl eiskaltem Aceton und der anschließenden Durchmischung und Inkubation bei -20°C über Nacht. Die Proben wurden bei 20.000 g und 4°C 7 min zentrifugiert und der Überstand mit 1 µl 30 %-iger Salzsäure versetzt. Die Cyclohexanbehandlung zur Delipidation und die Essigsäureethylester-Extraktion erfolgten nach dem Extraktionsprotokoll für Lebergewebe. Die Proben wurden in zweifacher Wiederholung mit 540 µl Cyclohexan versetzt, durchmischt, zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Im Anschluss wurde zu dem Cyclohexangemisch 5 µl 30 %-iger Salzsäure pipettiert. Es folgte die Extraktion mit 1 ml Essigsäureethylester in dreifacher Wiederholung. Die Proben wurden final unter Vakuum bis zur vollständigen Trocknung eingedampft und in 50 µl dH₂O-Methanol-Essigsäure-Gemischs rekonstituiert und bei -20°C für die LC-MS/MS-Analyse gelagert.

3.11.4 LC-MS/MS Analyse

Für die Analyse von TH und deren Metabolite aus Mausleber und Mausserum sowie aus Zelllysaten- und Zellkulturüberständen wurden nachfolgende gerätespezifische Instrumenten- und Arbeitsparameter verwendet (Tab. 23, Tab. 24, Tab. 25).

Tab. 23: LC-MS/MS Instrumentenparameter

	Gewebeanalyse	Zellkulturanalyse
Massenspektrometer (MS)	QTRAP®5500 MS (AB SCIEX, Darmstadt)	QTRAP®6500 (MS) (AB SCIEX, Darmstadt)
CUR (V)	35	45
Gas1/Gas2 (psi)	60/50	55/70
Temperatur (°C)	400	600
Ionensprayspannung (IS)	5500	4500
Kollision-induzierte Dissoziation (CAD) (psi)	2	2
Anfangspotential (V)	10	10
Verweilzeit (dwell) (ms)	50	10
Modus	MRM (Multiple Reaction Monitoring)	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

MATERIAL UND METHODEN

	Gewebeanalyse	Zellkulturanalyse
Autosampler	SIL-30AC Autosampler (Shimadzu, Duisburg)	PAL HTC-xt Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz)
HPLC-Pumpe	1200 HPLC System (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn)	1260 quartäre HPLC System (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn)
Laufmittel mobile wässrige Phase	0,6 % Essigsäure/ 5 % Acetonitril	0,1 % (v/v) Ameisensäure in H ₂ O
Laufmittel mobile organische Phase	0,6 % Essigsäure/ 95 % Acetonitril	0,1 % (v/v) Ameisensäure in Methanol
Laufzeit (min)	10	10
Flussrate (µl/min)	300	900
Säule	Synergi Polar-RP 80-Å Säule, 150 x 2mm (Phenomenex, Aschaffenburg)	HSS 2,5 µm 3,0 x 100 mm Säule (Waters, Milford, MA, USA)
Vorsäule	Guard Cartridge System, 4.0mm x 2.0mm (Phenomenex, Aschaffenburg)	
Temperatur (°C)	40	40
Ionenquelle	TurbolonSpray Positive Elektrosprayionisation	Turbo Spray IonDrive Positive Elektrosprayionisation
Datenauswertung	Bio Analyst version 1.5. Software (AB SCIEX, Darmstadt)	Analyst 1.6.2 Software Multiquant 2.1.1 Software (AB SCIEX, Darmstadt)

Tab. 24: LC-MS/MS Arbeitsparameter der Metabolite und internen Standards für Leber- und Serumanalyse

Analyt	(m/z) Q1	(m/z) Q3	DP	CE	CXP
3,5-T ₂	525,8	151,9	101,0	125,0	26,0
		479,9		29,0	14,0
T ₃	651,8	479,0	116,0	51,0	24,0
		605,7		29,0	18,0
T ₄	777,7	350,9	50,0	53,0	10,0
		731,6		33,0	22,0
² H ₅ -T ₄	782,7	201,0	111,0	97,0	14,0
		736,5		37,0	20,0

MATERIAL UND METHODEN

Analyt	(m/z) Q1	(m/z) Q3	DP	CE	CXP
¹³ C ₆ -T ₃	657,8	203,1	101,0	103,0	18,0
		611,8		31,0	16,0
¹⁵ N-3,5-T ₂	535,9	362,1	91,0	43,0	10,0
		488,9		39,0	14,0

Legende: (m/z): Masse-Ladungs-Verhältnis; (m/z) Q1: m/z des Ausgangsions im 1. Quadropol; (m/z) Q3: m/z des am stärksten ausgeprägten Ions im 3. Quadropol; DP: Declustering Potential; CE Kollisionsenergie; CXP Ausgangspotenzial der Kollisionszelle.

Tab. 25: LC-MS/MS Arbeitsparameter der Metabolite und internen Standards für die Zellysat- und Überstandsanalyse

Analyt	(m/z) Q1	(m/z) Q3	DP	CE	CXP
T ₀	274	118,1	51	25	6
		215,1			
3-T ₁	399,9	341,0	96	23	14
		353,9			
3,3'-T ₂	525,8	381,9	116	27	18
		479,9			
3,5-T ₂	525,8	479,8	91	27	18
		353,0			
T ₃	651,7	478,9	131	33	24
		605,6			
T ₄	777,6	604,7	121	37	28
		731,6			

Analyt	(m/z) Q1	(m/z) Q3	DP	CE	CXP
¹³ C ₆ -T ₄	783,6	611	106	33	20
		738			
¹³ C ₆ -T ₃	657,7	203,1	80	30	20
		611,8			
¹³ C ₆ -3,3'-T ₂	531,8	359,0	116	29	18
		485,7			

Legende: (m/z): Masse-Ladungs-Verhältnis; (m/z) Q1: m/z des Ausgangsions im 1. Quadropol; (m/z) Q3: m/z des am stärksten ausgeprägten Ions im 3. Quadropol; DP: Declustering Potential; CE Kollisionsenergie; CXP Ausgangspotenzial der Kollisionszelle.

3.12 Bestimmung der Konzentration von Steroidhormonen in der Leber mittels GC-MS/MS

Die Analyse der Steroidhormone der Lebern wurde im Department of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg von Andreas Landin (AG Prof. Dr. Claes Ohlsson) mittels GC-MS/MS durchgeführt. Die detaillierte Methodenbeschreibung ist der Publikation (Nilsson et al. 2015) zu entnehmen.

3.13 Histologische Untersuchungen

3.13.1 Masson-Trichrom-Goldner-Färbung des Herzgewebes

Die entnommenen Herzen wurden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (*DIfE*) in 4 %-iger Formaldehydlösung in PBS (Roth) fixiert und für die Anfertigung von Gewebeschnitten für 24 h in kaltem Leitungswasser gewaschen. Die Entwässerung erfolgte mit einem Entwässerungsautomaten über eine aufsteigende Alkoholkonzentration. Die Herzen wurden jeweils horizontal in drei Gewebestücken geschnitten und in Paraffin eingebettet.

Die Trichrom-Färbung des Herzgewebes nach Masson-Goldner (Goldner 1938) sollte Aufschluss über potentielle Veränderungen von Bindegewebskomponenten durch die Behandlung der Mäuse mit 3,5-T₂ geben. Durch den kombinierten Einsatz von Eisenhämatoxylin, Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin, Wolframatophosphorsäure-Orange und Lichtgrün-Färbelösung (Tab. 26) können mit dieser Methode Zell- und Gewebeanteile im Herzgewebe visualisiert und zwischen Muskel- und Kollagenfasern, Zellkernen sowie Erythrozyten unterschieden werden.

Aus den Herzparaffinblöcken wurden mit dem Mikrotom 2 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt und auf beschichtete Glasobjektträger transferiert. Zuerst wurden die in Küvetten gestellten Präparate mit Xylol (Roth, Karlsruhe) (3 x 10 min) entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe (Ethanol 100 %, 96 %, 70 %, 40 %) rehydriert und mit dH₂O gespült (2 x 5 min). Es folgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Weigert (1,5 min) und ein 10-minütiger Spülvorgang in Leitungswasser. Zunächst wurden die Schnitte mit Masson Goldner I (Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin) 6 min gefärbt, 1 min mit Essigsäure gespült und für 3 min mit Masson Goldner II (Wolframtophosphorsäure-Orange) bis zur vollständigen Entfärbung der Bindegewebsanteile behandelt. Nachdem die Präparate erneut mit Essigsäure gespült wurden, folgte die Gegenfärbung mit Masson-Goldner III (Lichtgrün) für 13 min. Nach der Trichromfärbung wurden die Schnitte mit Essigsäure (2 x 5 min) ausgewaschen und mittels aufsteigender Alkoholkonzentration (96 %, 100 %) dehydriert und mit Xylol geklärt und abschließend mit Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Das Resultat der Färbung zeigte schwarzbraun gefärbte Zellkerne, schwach orangefarbene bis rote zytoplasmatische Strukturen, hellrote Muskelfaseranteile, leuchtend rot gefärbte Erythrozyten und grün gefärbtes Bindegewebe (Kollagen). Die gefärbten Präparate wurden im Anschluss lichtmikroskopisch ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

Tab. 26: Verwendete Lösungen für Masson-Trichrom-Goldner-Färbung

Lösung	Zusammensetzung
Weigerts Eisenhämatoxylin	Lösung A: 5 g Hämatoxylin in 500 ml 96 % Ethanol Lösung B: 5,8 g Eisen(III)-chlorid (FeCl ₃) in 495 ml dH ₂ O, + 5ml 37 %-ige HCL Unmittelbar vor der Färbung Lösung A und B mischen.
Masson Goldner I	88 ml 0,2 %-ige Essigsäure mit 7 ml Masson-Lösung und 2 ml Azophloxinlösung
Masson Goldner II	3 g Wolframtophosphorsäure und 2 g Orange G in 100 ml dH ₂ O
Masson-Goldner III	0,1 g Lichtgrün in 100 ml dH ₂ O welches mit 0,2 ml Eisessig versetzt wurde

3.13.2 Immunhistologische Färbung der Kardiomyozyten H9c2

Mit der immunhistochemischen Analyse werden Proteine mittels spezifischer primärer Antikörper markiert und mit sekundären Antikörpern unter Anwendung von Immunfluoreszenz visualisiert. Die H9c2-Moyblasten wurden in 12-Well-Zellkulturplatten mit oder ohne Differenzierungsmedium 7 d auf sterilisierten Deckgläsern nach Versuchsprotokoll kultiviert (Tab. 11). Die differenzierten und undifferenzierten Zellen wurden im Anschluss 10 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit 0,1 M PBS dreimal gewaschen. Es folgte die einstündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 150 µl Mouse IgG Reagent MKB 2213 in PBSTHS (0,5 % Triton, 10 %

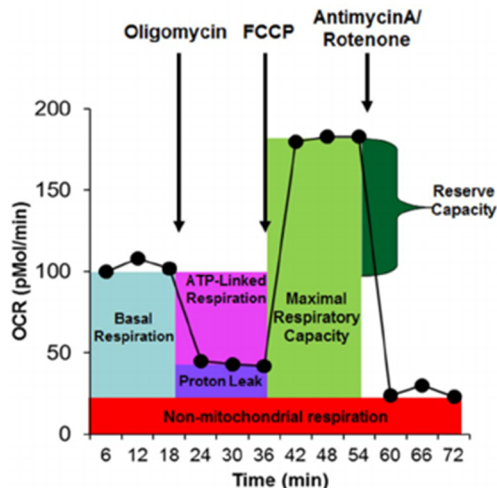
HorseSerum-Mix) und die Inkubation über Nacht bei 4°C mit 150 µl des verdünnten Primärantikörpers Serca2 (Abcam, 1:200 in PBSTHS). Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Cy3 Anti Mouse IgG (Jackson/Immuno Research Lab. INC (1:1000) mit 0,1 M PBS-0,25 M NaCl) 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschgänge und die spezifische DNA-Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma Aldrich, 1:30.000). Abschließend wurden die Präparate erneut gewaschen, auf Objektträger transferiert und mit ImmuMount (Shandon, USA) eingedeckt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Anwendung spezieller Filter wurde der Cy3-gekoppelte Antikörper Serca2 bei einer Wellenlänge von 570 nm angeregt und die mit DAPI markierten Zellkerne bei 460 nm detektiert. Zur mikroskopischen Untersuchung und Bilddokumentation wurde das Axioskop2 mit AxioCam von Carl Zeiss und entsprechender Software verwendet.

3.14 Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels Seahorse XF Analyzer

Mittels des Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF lässt sich simultan die Sauerstoffverbrauchs- und Azidifizierungsrate in lebenden Zellen bestimmen. Hierdurch erhält man Informationen über die zwei Hauptenergiestoffwechselwege, mitochondriale Atmung und Glykolyse.

Über fluoreszenzbasierte Sensoren wird der Sauerstoffverbrauch der Zelle (gemessen als Oxygen consumption rate, OCR) als Messgröße für die oxidative Phosphorylierung ermittelt. Darüber hinaus kann über die extrazelluläre Ansäuerung in Form von Protonen (bezeichnet als Extracellular Acidification Rate, ECAR) Rückschluss auf die glykolytische Aktivität der Zelle gezogen werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 3,5-T₂ auf die mitochondriale Atmung primärer Hepatozyten untersucht, jedoch keine Protokolletablierung zur Messung von ECAR durchgeführt.



Ziel der Seahorse-Messung war die Untersuchung, inwieweit 3,5-T₂ nach 24-stündiger Stimulation in primären Hepatozyten die mitochondriale Atmung verändert. Dabei wird die Sauerstoffverbrauchsrate vor und nach Zugabe spezifischer Inhibitoren der Atmungskette gemessen. Initial wurde die basale mitochondriale Atmung ermittelt, die sich nach Abzug der nicht-mitochondrialen Atmung berechnen ließ. Es folgte die Hemmung der F₀-Untereinheit der ATP-Synthase (Komplex V) durch Oligomycin und die Bestimmung der verbrauchten Sauerstoffmenge, welche für den ATP-Umsatz und das Protonen-Leck eingesetzt wird.

Abb. 8: Darstellung Seahorse-Assay

Quelle Seahorse Biosciences

Im Anschluss wurde das Protonophor FCCP (Cyanid-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazon) genutzt, um die Atmungskette zu entkoppeln und die maximale Kapazität der Atmungskette unabhängig vom Protonengradienten zu ermitteln. Zuletzt wurden Antimycin A und Rotenon injiziert, welche die Atmungskettenkomplexe III und I hemmen und zu einem kompletten Einbruch des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs führen.

Primäre Hepatozyten wurden nach der Isolierung mit einer Dichte von 10.000 Zellen/Well einer kollagen-beschichteten 96er Well-Zellkulturplatte (XF cell culture microplate, Seahorse Biosciences) kultiviert und nach dem gleichen Versuchsprotokoll behandelt, welches für die Stimulation mit 3,5-T₂ in 6-Well Zellkulturplatten angewandt wurde (Tab. 10). Für die Kultivierung der Zellen im 96er Wellformat wurden 100 µl Medium eingesetzt. Für die Titration der Zellzahl wurde das Protokoll ohne Stimulantien mit entsprechender Zellanzahl durchgeführt.

Die Analyse des Proteingehaltes mittels Micro BCA Protein-Assay-Kit (laut Herstellerangaben, Thermo Fisher Scientific) zeigte keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen (T₃, 3,5-T₂). Für die Messung im Seahorse Bioanalyzer wurde die Sensorplatte mit XF Calibrant über Nacht bei 37°C präinkubiert.

Die Zusammensetzung des Assaymediums und der verwendeten Inhibitoren-Konzentrationen (nach Protokoll von Diana Wilhelms, AG Michael Schupp, CCR, Charité) sind nachfolgend dargestellt:

150 ml DMEM 5030 mit 1 % 200 mM L-Glutamine und 0,4 % 2,5 M Glucose. Inhibitoren: 3 µM Oligomycin, 0,5 µM FCCP, 0,5 µM Antimycin A, 1,5 µM Rotenon verdünnt in Assaymedium.

Zunächst wurde die mit Zellen beladene 96-Well-Platte mit erwärmtem Assaymedium gewaschen und bei einem Endvolumen von 175 µl pro Well 1 h bei 37°C in CO₂-freier Atmosphäre inkubiert. Inzwischen wurde die Sensorplatte mit 25 µl je Port der vorbereiteten Inhibitoren beladen, wobei Antimycin A und Rotenon als Kombination in einen gemeinsamen Port gegeben wurden. Es erfolgte eine 20-minütige Kalibration der Sensorplatte im Gerät mit anschließendem Austausch der Zellkulturplatte zum Start der Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs. Diese erfolgte über eine Dauer von 18 min pro Parameter (basale Atmung, ATP Produktion, Protonenleck, maximale Atmung, Reservekapazität), wobei alle 3 min im Wechsel das Medium durchmischt und anschließend für 3 Minuten die OCR gemessen wurde. Anschließend wurden Zellkultur- und Sensorplatte zusammengesetzt und die Sauerstoffkonzentration in den Wells über die Zeit zu Beginn und nach den jeweiligen Injektionen gemessen. Bei der Auswertung der erhobenen Daten wurde den Angaben des Herstellers gefolgt. Die OCR wurde dabei aus der Steigung des O₂-Partialdrucks gegen die Zeit berechnet und in pmol/min angegeben.

3.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen SPSS und GraphPad Prism. Zuerst wurde ermittelt, ob die einzelnen Stichproben einer Normalverteilung folgen. Es zeigte sich nach Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests (SPSS) dass nicht immer normalverteilte Stichproben vorlagen. Die statistische Absicherung erfolgte dementsprechend mittels nicht-parametrischer Tests (GraphPad Prism). Alle untersuchten Parameter wurden mit einer Stichprobenanzahl von mindestens 5 Tieren pro Gruppe durchgeführt (genaue Probenanzahl befindet sich in der Abbildungsunterschrift). Die Daten aus drei unabhängigen Versuchen (jeweils in Triplikaten) dienten zur statistischen Auswertung der Zellkulturstudien. Die Untersuchungen im Seahorse Bioanalyzer erfolgten mit 6 Replikaten pro Versuchsansatz. Die densitometrische Auswertung von Western-Blot-Untersuchungen erfolgte nur bei einer Stichprobenanzahl von mindestens 4 Tieren pro Gruppe im Verhältnis zu einer geeigneten Kontrolle.

Statistische Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe wurden bei mehr als zwei Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test und nachfolgendem Dunn's Posttest ermittelt. Mit dem parameterfreien U-Test nach Mann Whitney wurden statistische Unterschiede zwischen den Medianen von zwei Untersuchungsgruppen identifiziert. Alle Daten wurden bei einem p-Wert $< 0,05$ als signifikant verschieden zur Kontrollgruppe eingestuft. Es erfolgte keine Adjustierung für multiples Testen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch die Angabe von Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*).

4 Ergebnisse

Im Rahmen der interdisziplinären Forschergruppe KFO 218/1 wurde die Wirkung von 3,5-T₂ auf den metabolischen Phänotyp in Mäusen getestet, die von Geburt an eine Hochfettdiät (HFD) oder Standarddiät (SD) erhielten. Phänotypische Parameter wurden unter der Leitung von Dr. Wenke Jonas (*DIfE*) erhoben und die Ergebnisse mit unserem Institut analysiert und ausgewertet (Jonas et al. 2015). Die Resultate, welche nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind, werden im Diskussionsabschnitt 5.1 näher erläutert und diskutiert. Zur besseren Einordnung der nachfolgenden Ergebnisse wird folgend eine kurze Zusammenfassung gegeben.

Die 14- bzw. 28-tägige Behandlung mit 0,25 beziehungsweise 2,5 µg/g KG 3,5-T₂ (nachfolgend als µg dargestellt) hatte in HFD-Mäusen keinen Einfluss auf das Körpergewicht. Dieses Resultat steht in Kontrast zu den in der Einleitung beschriebenen Rattenstudien, welche eine Gewichtsreduktion mit 0,25 µg 3,5-T₂ nach chronischer Gabe demonstrieren konnten (Lanni et al. 2005, de Lange et al. 2011, Grasselli et al. 2012). Demgegenüber konnte jedoch nach Behandlung von 2,5 µg 3,5-T₂ eine signifikante Steigerung des Gesamtenergieumsatzes als auch der Körpertemperatur gemessen werden. Vergleichbar mit der 83-fach geringeren T₃-Dosis beeinflusste die hohe Konzentration von 3,5-T₂ (2,5 µg) verschiedene Parameter des Fettstoffwechsels. Sowohl die Körperfettmasse als auch die subkutanen Fettpolster wurden nach 14- bzw. 28-tägiger Intervention reduziert und die fettfreie Masse erhöht. Hinsichtlich der Serumwerte zeigte wiederum nur die hohe Dosis 3,5-T₂, vergleichbar mit der T₃-Behandlung, eine Reduktion von Cholesterin und Triglyceriden. In der Leber reduzierte 2,5 µg 3,5-T₂ nach 14- bzw. 28-tägiger Behandlung die Triglyceridwerte und steigerte zudem die Citratsynthaseaktivität (siehe Tab. 30 in Diskussion).

4.1 Wirkung von 3,5-T₂ auf die hepatische Expression ausgewählter Gene und Enzyme des Energiestoffwechsels in Mäusen unter Hochfettdiät

In Bezug auf den Energiehaushalt stellt die Leber eines der wichtigsten Zielorgane für TH dar. Aus diesem Grund wurde aus dem Lebergewebe der behandelten HFD-Mäuse mittels qPCR die Expression von TH-responsiven Genen analysiert, welche eine Rolle im Energie- und Fettstoffwechsel spielen.

Die Genexpression der zytosolischen Malat-Dehydrogenase (*Me1*, Malic Enzyme) wurde durch die 14-tägige Behandlung mit 2,5 µg 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD gesteigert. Die Behandlung mit T₃ konnte diese Regulation der mRNA gleichermaßen beeinflussen (Abb. 9A). Das Enzym ist an der Bereitstellung von NADPH für die Fettsäuresynthese beteiligt und im Citratzyklus involviert.

Die Genexpression der Cholesterol-7-alpha-hydroxylase (*Cyp7a1*), Stearoyl-CoA desaturase (*Scd1*), Carnitine palmitoyltransferase Ia (*Cpt1a*) und Thyroid hormone-inducible hepatic protein (*Thrsp*, auch Spot14), welche Schlüsselenzyme des Gallensäure- und Lipidstoffwechsels darstellen, konnte durch die Intervention von 3,5-T₂ nicht signifikant reguliert werden. Es zeigte sich jedoch, dass 2,5 µg 3,5-T₂

einen ähnlichen Trend in der Regulation der Expression von *Scd1* und *Cyp7a1* aufwies wie die T_3 -Behandlung, welche die Transkriptmenge von *Cyp7a1* leicht erhöhte und *Scd1* signifikant reduzierte. (Abb. 9A). Die Analyse der Genexpression der Acetyl-CoA-Carboxylase (*Acc1*) und der Fettsäure-Synthase (*Fasn*) wurden durch 3,5- T_2 als auch T_3 nicht signifikant reguliert ($p > 0,5$) (keine graphische Darstellung).

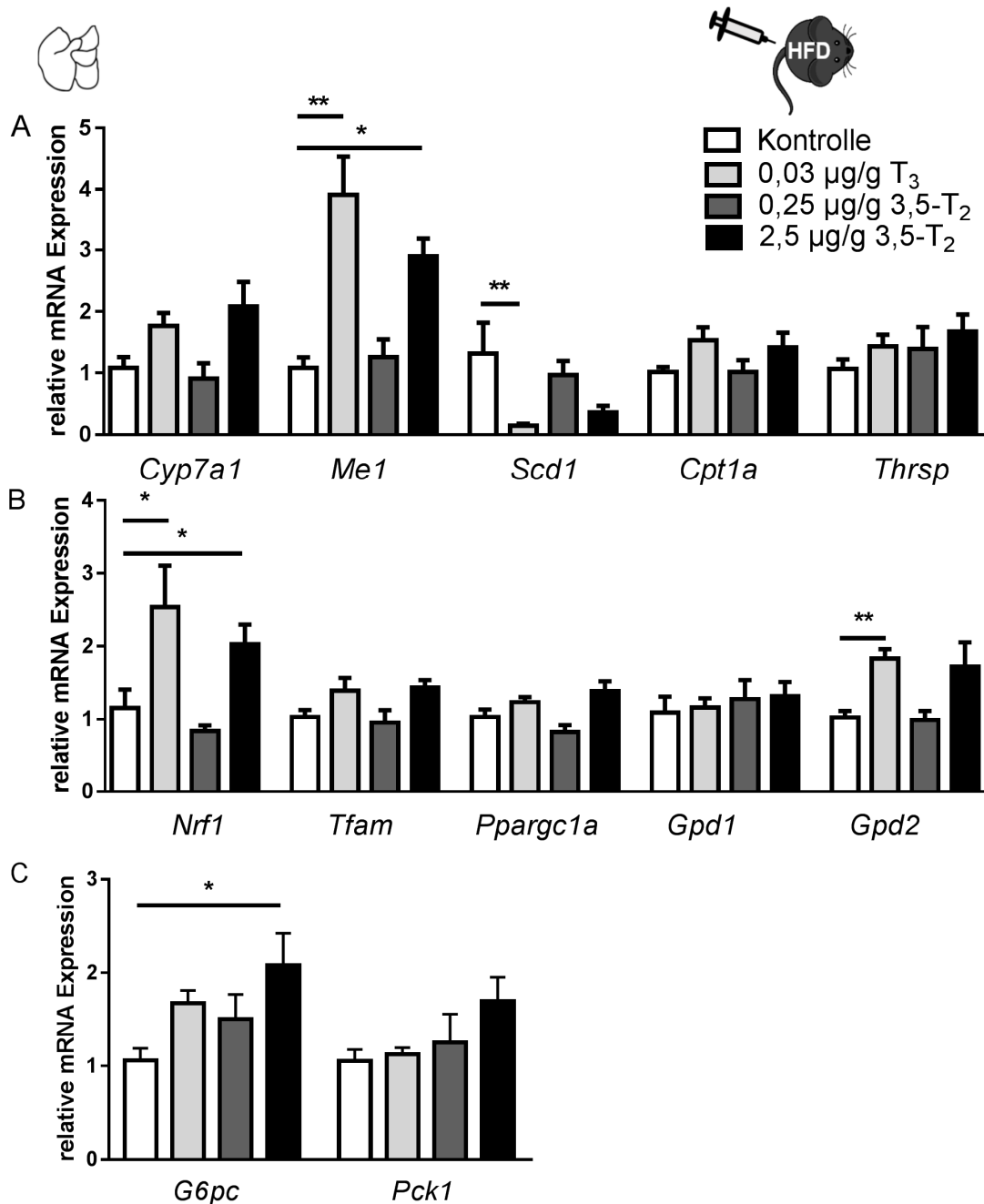


Abb. 9: Regulation der hepatischen Genexpression in Mäusen unter HFD nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5- T_2 oder T_3

(A) Gene des hepatischen Fettstoffwechsels (B) Gene der mitochondrialen Biogenese und des mitochondrialen Stoffwechsels (C) Gene, die Schlüsselenzyme der Glukoneogenese codieren. Die Mittelwerte \pm SEM ($n=6-8$) der relativen Expressionswerte ($2^{-\text{ddCt}}$) sind dargestellt. Die mittels qPCR erhobenen Expressionsmuster wurden auf *HPRT* normalisiert und mit der Kontrollgruppe verglichen * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis Test).

Die Messung der hepatischen Citratsynthaseaktivität am *DifE* (Tab. 30), den Schrittmacher des Citratzyklus, gibt einen Hinweis auf die Wirkung von 3,5-T₂ auf den mitochondrialen Stoffwechsel.

Die Expressionsanalyse von Genen der mitochondrialen Biogenese zeigt, dass die Genexpression des Nuclear respiratory factor 1 (*Nrf1*) signifikant positiv durch 2,5 µg 3,5-T₂ und T₃ reguliert wurde. Die Expressionsmuster weiterer mitochondrialer Parameter (Mitochondrial transcription factor A (*Tfam*), Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha (*Pparg1a*), Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (*Gpd1*)) wurden durch 3,5-T₂ nicht signifikant beeinflusst. Die Transkription der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 2 (*Gpd2*) wurde in der T₃-Gruppe erhöht, dieser Trend zeigte sich auch bei 2,5 µg 3,5-T₂, erreichte jedoch keine Signifikanz (Abb. 9B).

Die Analyse der Expression des Proteins Cytochrom C (Cyt C), welches in den Mitochondrien bei der oxidativen Phosphorylierung eine entscheidende Rolle als Elektronentransportmolekül spielt, wies nach der 14-tägigen T₃-Behandlung keine Änderung in den Lebern von HFD-Mäusen auf. Die hohe Dosis 3,5-T₂ erhöhte indes die hepatische Cyt C-Proteinexpression (Abb. 10).

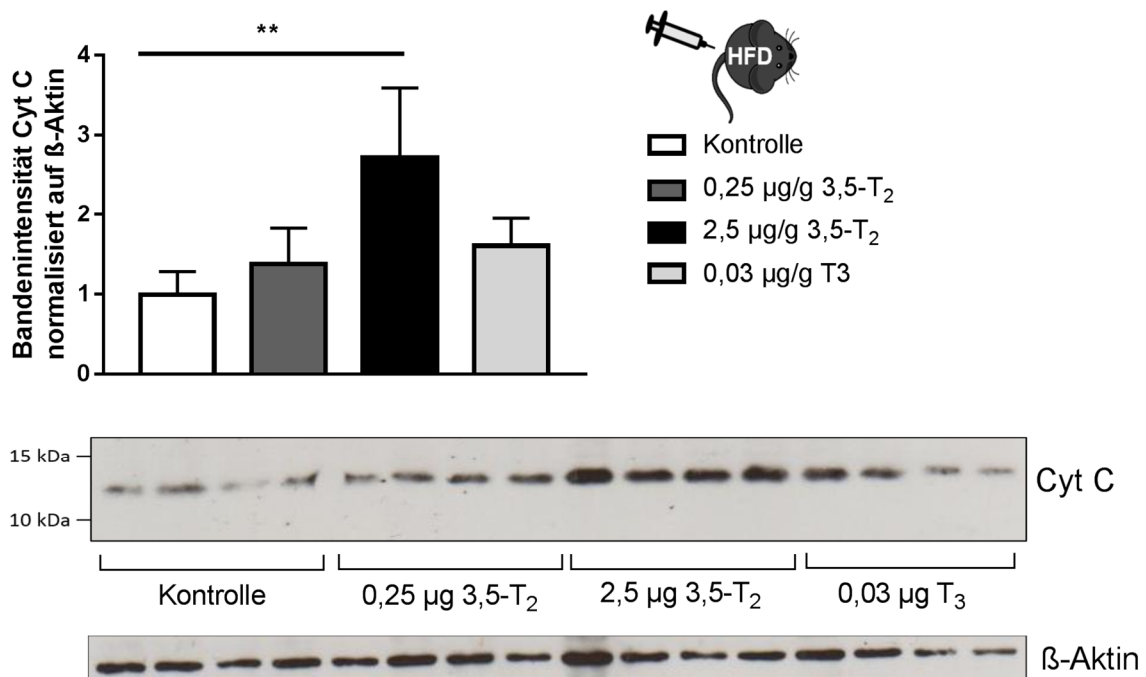


Abb. 10: Hepatische Proteinexpression von Cytochrom C nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD

Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der Bandenintensität (*p < 0,05, Kruskal-Wallis Test) sowie eines repräsentativen Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen Cyt C (12 kDa) und β-Aktin (Referenzprotein) (n=4).

Die Gene *G6pc* (Glucose-6-phosphatase) und *Pck1* (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) codieren Schlüsselenzyme der Glukoneogenese. Die zweiwöchige Behandlung von 2,5 µg 3,5-T₂ erhöhte die Expression von *G6pc*, nicht aber die Transkriptmenge von *Pck1*. T₃ hatte keinen Einfluss auf die Expression beider Gene in der Leber von Mäusen unter HFD (Abb. 9C).

4.2 Einfluss von 3,5-T₂ auf die Schilddrüsenhormon-Achse

Für den Einsatz von 3,5-T₂ als potentiell „anti-lipidämisches“ Gewichtsreduktionsmittel ist der Ausschluss von thyromimetischen Nebenwirkungen, wie sie für TH bekannt sind, von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurde auf verschiedenen Ebenen getestet, inwieweit 3,5-T₂ in Mäusen unter SD und HFD den hypothalamisch-hypophysären-thyreoidalen Regelkreis beeinflusst und die Ergebnisse mit der T₃-Gruppe verglichen.

Die Behandlung mit T₃ bewirkte in der Hypophyse von Mäusen unter HFD eine Änderung im Expressionsprofil der TH-responsiven Gene Thyrotropin-releasing hormone receptor (*Trhr*), Thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme (*Trhde*), Deiodase 2 (*Dio2*) und Thyroid stimulating hormone beta (*Tshb*).

Gleichermaßen verringerten sich die Transkriptkonzentrationen von *Trhr*, *Dio2* und *Tshb* und es erhöhte sich die Transkriptmenge von *Trhde* um das 8-fache nach 14-tägiger Behandlung mit 2,5 µg 3,5-T₂. Als extrazelluläre Peptidase inaktiviert *Trhde* das Neuropeptid *Trh* und trägt einen entscheidenden Beitrag zur Feedback-Regulation bei (Bauer 1988).

Darüber hinaus reduzierte sich beim direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-Test, p = 0,004) die Expression von *Tshb* bereits mit der geringen Dosis von 0,25 µg 3,5-T₂. Keine der Behandlungen änderte die Expression des Thyroid hormone receptor beta (*Thrb*) (Abb. 11). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die 28-tägige 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter HFD und SD beobachtet werden (Abb. 12).

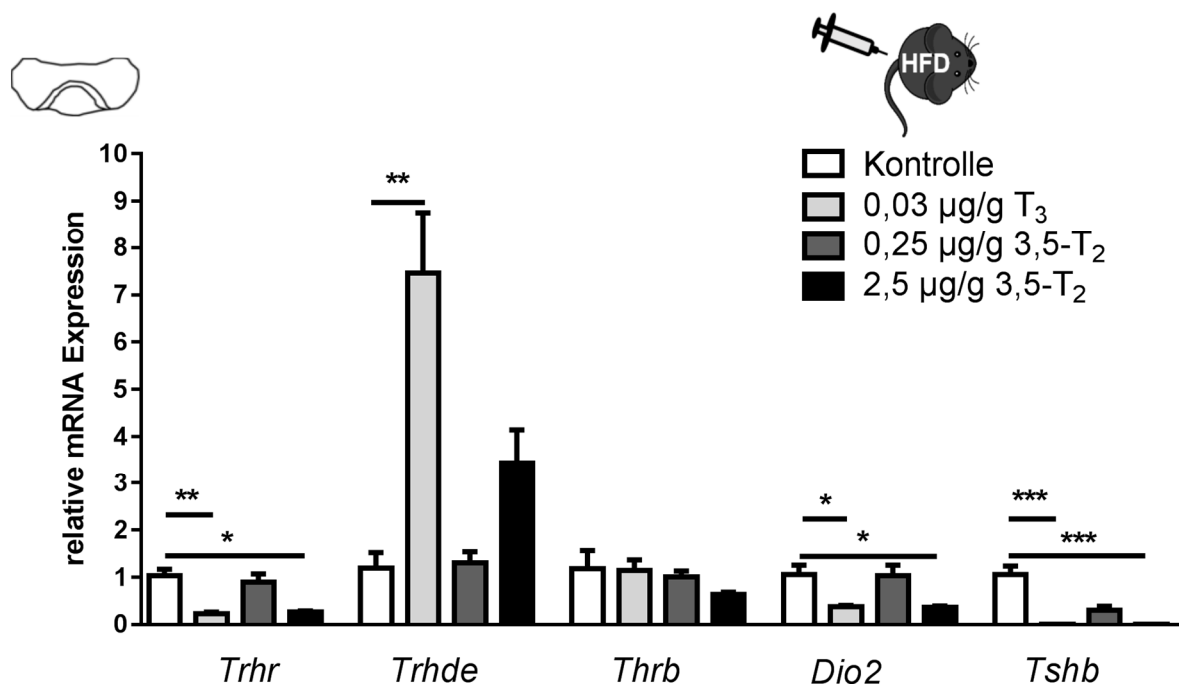


Abb. 11: Expression TH-responsiver Gene in der Hypophyse von Mäusen unter HFD nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ oder T₃

Die Mittelwerte ± SEM (n=5-7) der relativen Expressionswerte (2^{-ddCt}) sind dargestellt. Die mittels qPCR erhobenen Expressionsmuster wurden auf *HPRT* normalisiert und mit der Kontrollgruppe verglichen *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis Test).

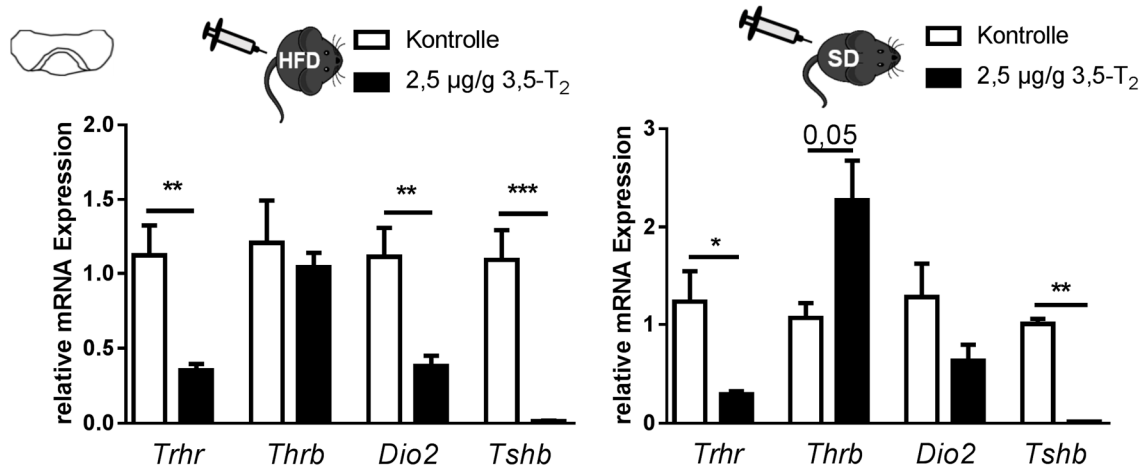


Abb. 12: Expression TH-respoviver Gene in der Hypophyse von Mäusen unter HFD und SD nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂

Die Mittelwerte \pm SEM (n=5-7) der relativen Expressionswerte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) sind dargestellt. Die mittels qPCR erhobenen Expressionsmuster wurden auf *HPRT* normalisiert und mit der Kontrollgruppe verglichen *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Mann-Whitney Test).

Die Änderung der hypophysären Genexpression lässt bereits nach 14-tägiger 3,5-T₂-Gabe eine negative Feedbackregulation der hypophysären TSH-Sekretion und der thyreoidalen TH-Synthese erkennen. Aus diesem Grund wurden mittels LC-MS/MS die totalen Serumkonzentrationen von T₃ und T₄ gemessen. Die Injektion von 0,03 µg T₃ reduzierte den T₄-Serumgehalt, konnte erwartungsgemäß jedoch keine Änderung der T₃-Serumkonzentration bewirken. Sowohl die zwei- als auch die vierwöchige Behandlung mit 2,5 µg 3,5-T₂ in Mäusen unter SD oder HFD reduzierte die T₄ und T₃-Konzentration im Serum. Interessanterweise bewirkte auch die 10-fach geringere 3,5-T₂-Dosis (0,25 µg) eine signifikante Verringerung der TH-Werte (Abb. 13A und B).

Entgegen den publizierten Daten in Mensch und Ratte (Faber et al. 1982, Chopra et al. 1984, Moreno et al. 2002) konnte durch die externe Gabe von T₃ kein erhöhter Serumgehalt an 3,5-T₂ erreicht werden. Konzentrationsabhängig zeigte sich ein Anstieg der 3,5-T₂-Konzentration im Serum der 3,5-T₂-behandelten Mäuse unter SD und HFD (Abb. 13C).

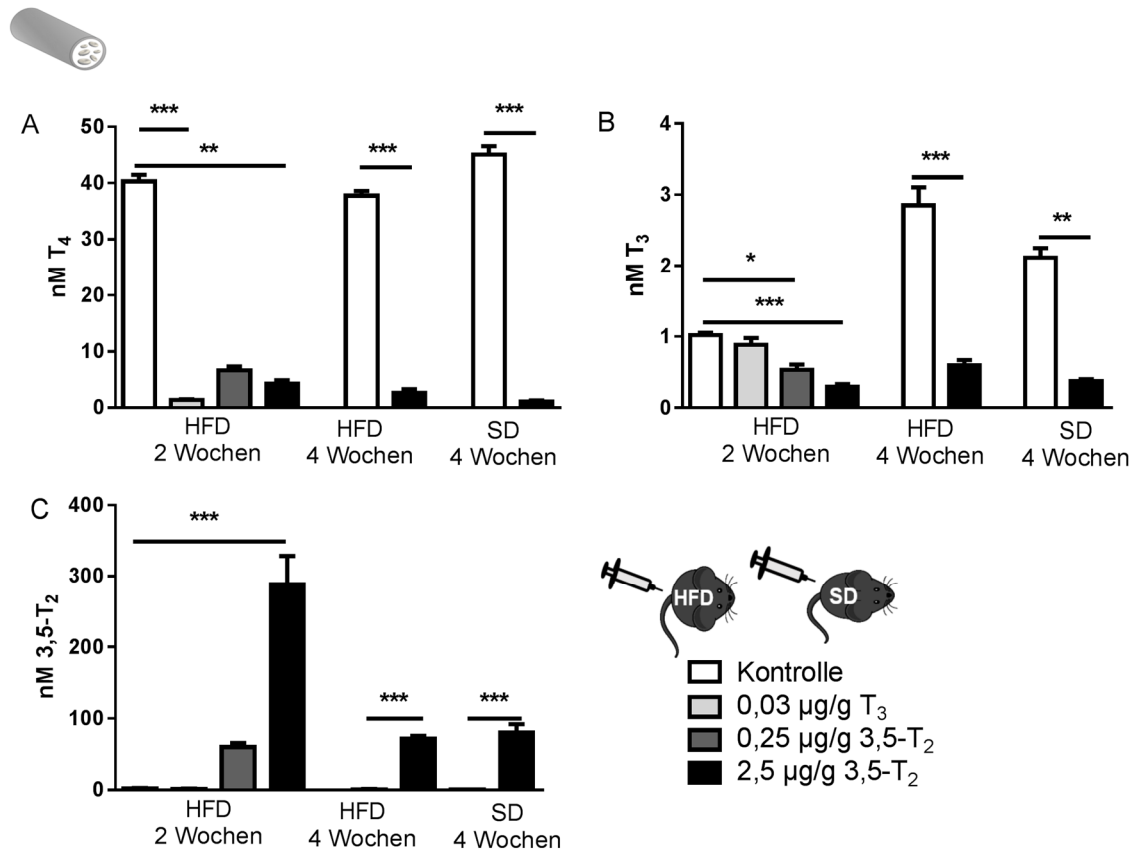


Abb. 13: Serumkonzentration von T₄, T₃ und 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD und SD nach 14- und 28-tägiger Behandlung mit T₃ oder 3,5-T₂

(A-C) Analyse erfolgte mittels LC MS/MS-Methode (QTRAP®5500). Die Gruppen (n=5-7) unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis bzw. Mann-Whitney Test).

Vergleichbar mit der T₃-Injektion reduzierte 2,5 µg 3,5-T₂ sowohl nach 14- als auch 28-tägiger Behandlung signifikant den hepatischen T₄-Gehalt in Mäusen unter HFD oder SD. Der direkte Vergleich zur Kontrollgruppe (Mann-Whitney-test, p=0,0006) zeigte, dass ebenfalls 0,25 µg 3,5-T₂ nach zwei Wochen den T₄-Spiegel in der Leber von Mäusen unter HFD verringerte (Abb. 14A).

Entsprechend der Serumanalyse reduzierten sowohl 0,25 als auch 2,5 µg 3,5-T₂ signifikant die hepatische T₃-Konzentration. Die T₃-Behandlung konnte keine signifikante Änderung des T₃-Spiegels in der Leber hervorrufen (Abb. 14B).

Abbildung 14C zeigt zudem eine konzentrationsabhängige Akkumulation von 3,5-T₂ in der Leber nach zweiwöchiger 3,5-T₂-Gabe in Mäusen unter HFD. Die 28-tägige 3,5-T₂-Injektion bewirkte ebenfalls einen signifikanten Anstieg von 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD oder SD, wobei die detektierte Konzentration um Faktor 10 geringer war als nach 14-tägiger Behandlung (Abb. 14C). Diese Unterschiede könnten durch Optimierungen des Extraktionsprotokolls zwischen den einzelnen Messungen erklärt werden.

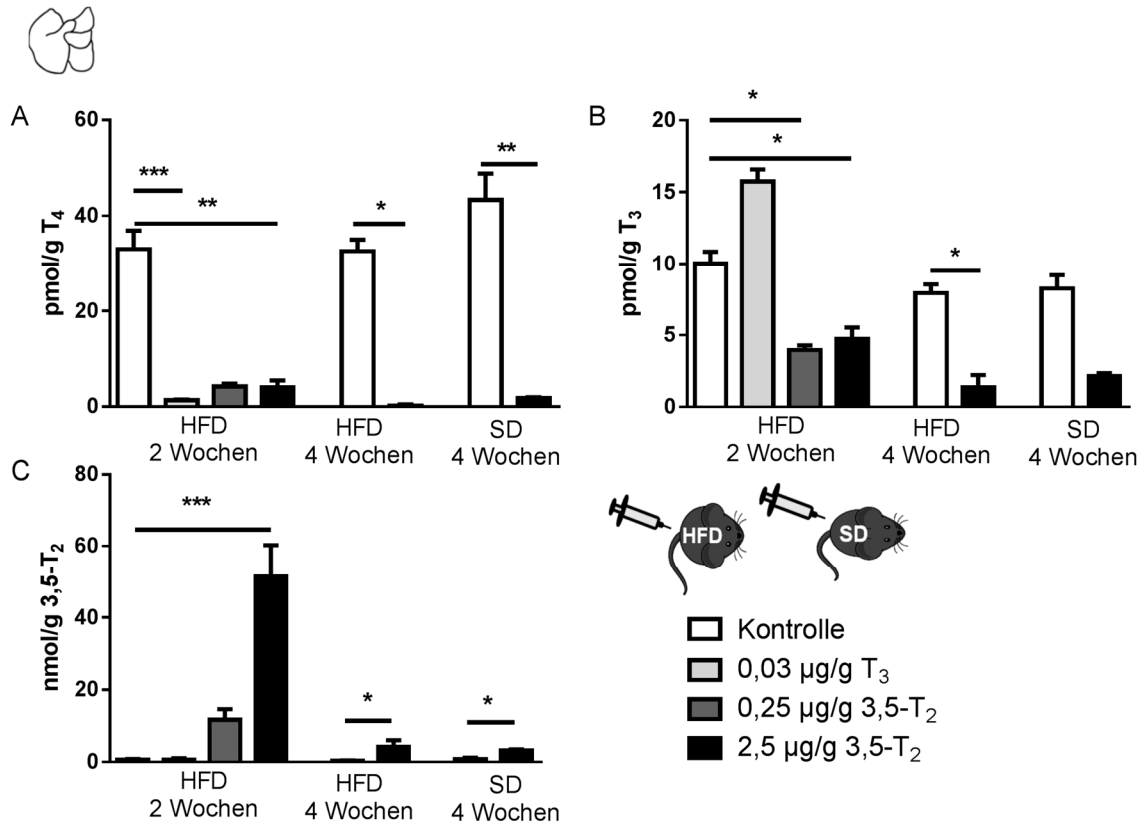


Abb. 14: Hepatische Konzentration von T₄, T₃ und 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD und SD nach 14- und 28-tägiger Behandlung mit T₃ oder 3,5-T₂

Die Analysen erfolgten mittels LC MS/MS (QTRAP®5500). Die Gruppen (n=5-7) unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis bzw. Mann-Whitney Test).

Die Reduktion der hepatischen TH-Gehalte nach 3,5-T₂-Gabe gibt einen eindeutigen Hinweis auf eine erweiterte negative Feedbackregulation der Schilddrüsenhormonachse bis hin zum Zielorgan Leber. Folglich wurden zwei Parameter des hepatischen TH-Metabolismus analysiert.

Die Erhöhung der hepatischen Dio1 gilt als Marker für eine hyperthyreote Stoffwechsellage (Streckfuss et al. 2005). Vergleichbar mit der T₃-Gruppe steigerte 2,5 µg 3,5-T₂ die mRNA Expression als auch die Aktivität der Dio1 (Abb. 15A und B).

Darüber hinaus führte die Behandlung mit 2,5 µg 3,5-T₂ in Mäusen unter SD und HFD zu einer verringerten Genexpression des Thyroxin-bindenden Globulins (*Serpina 7*) (Abb. 15C), welches als TH-Transportprotein im Blut eine Rolle spielt und von der Leber sezerniert wird (Vranckx et al. 1990).

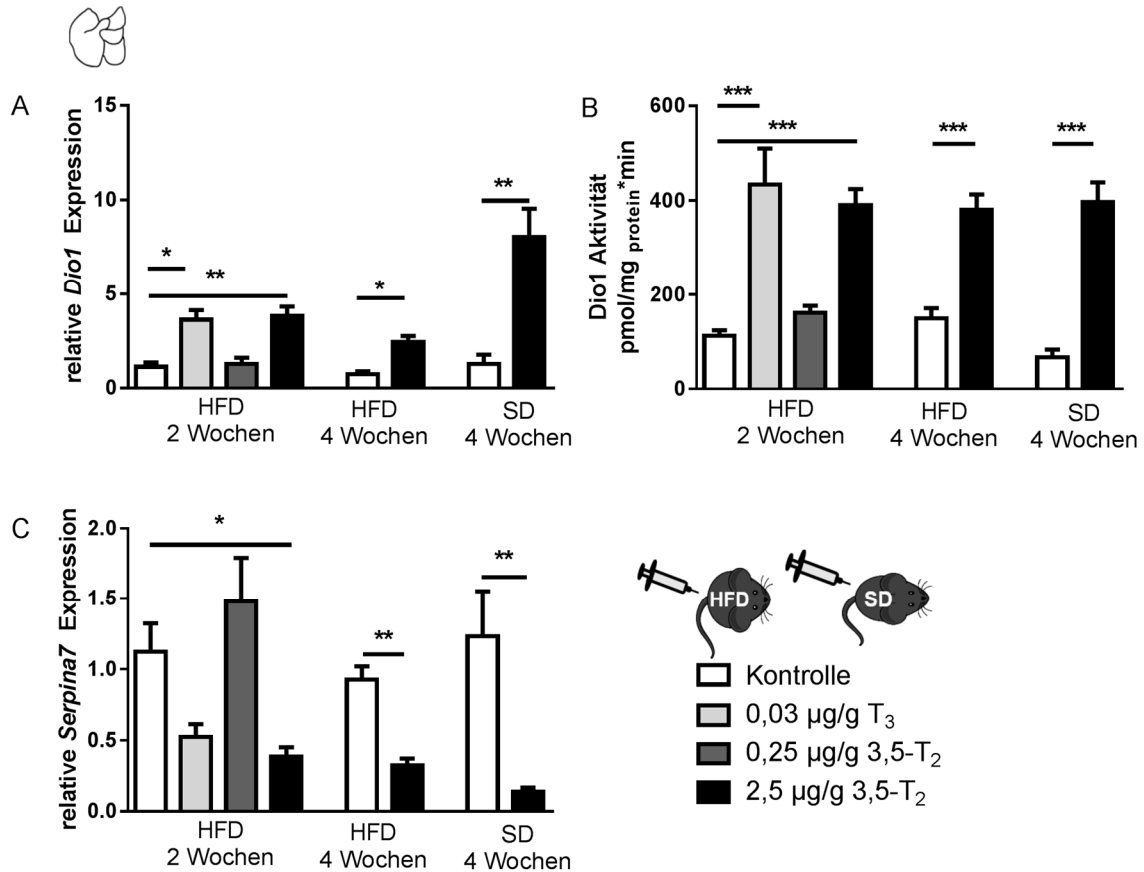


Abb. 15: Hepatische Expression und Aktivität der Dio1 und Expression von Serpina7 in Mäusen unter SD und HFD nach 14 und 28-tägiger Behandlung mit T₃ oder 3,5-T₂

Die Gruppen (n=6-8) unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis bzw. Mann-Whitney Test).

4.3 Kardiale Effekte von 3,5-T₂

4.3.1 Wirkung von 3,5-T₂ im Herzgewebe von Mäusen unter Hochfettdiät

Entgegen den Erwartungen führte die 28- als auch 33-tägige Behandlung mit 2,5 µg 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD zu einem signifikanten Anstieg des Herzgewichtes um 26 % und in Mäusen unter SD stieg das Gewicht um 9 % an (Abb. 16A). Die Herzen aus dem 28-tägigen Versuch wurden in Paraffin zur weiteren histologischen Analyse fixiert. Das Herzgewebe aus dem Versuch mit 33-tägiger Behandlungsdauer diente zur Gen- und Proteinexpressionsanalyse (Abb. 16B und C).

Mittels qPCR wurden kardiale Gene analysiert, die als TH-responsiv bezeichnet werden. 3,5-T₂ bewirkte eine gesteigerte Genexpression der Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (*Serca2*, *Atp2a2*) und führte zur Reduktion der mRNA-Expression von Phospholamban (*Pln*) (Abb. 16B). Vergleichbar mit den regulierten Gentranskripten war die Proteinexpression von *Serca2* leicht erhöht und für *Pln* konnte ein Trend zu einem reduzierten Proteingehalt im Herzgewebe festgestellt werden (Abb. 16C).

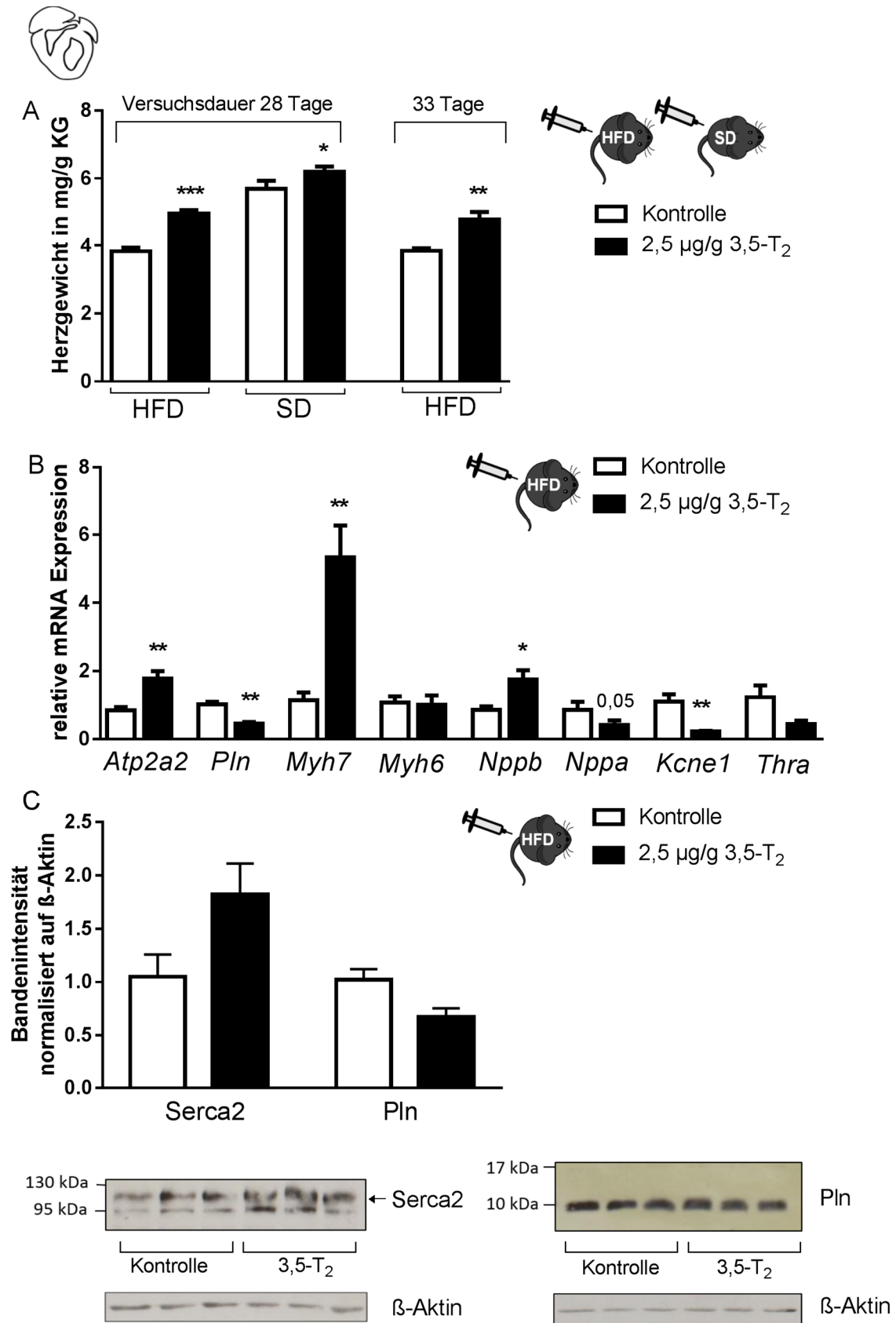


Abb. 16: Herzgewicht und kardiale Gen- und Proteinexpression nach 3,5-T₂-Behandlung

(A) Herzgewicht nach 28- bzw. 33-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD und SD. (B) Genexpressionen von *Atp2a2*, *Pln*, *Myh6*, *Myh7*, *Nppb*, *Nppa*, *Kcne1* und *Thra* im Herzgewebe von Mäusen unter HFD nach 33-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂.

Fortsetzung Abb.unterschrift 16: Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Mann-Whitney Test). (C) Kardiale Proteinexpression von Serca2 (Ca^{2+} -ATPase) und Phospholamban (Pln) nach 33-tägiger Behandlung mit 3,5- T_2 in Mäusen unter HFD. Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der Bandenintensität sowie eines repräsentativen Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen Serca2 (110 kDa), Pln (6 kDa) und β -Aktin (Referenzprotein). Aufgrund der geringen Tieranzahl pro Gruppe ($n=3$) wurde keine statistische Auswertung der Bandenintensität vorgenommen.

Für Serca2 existieren im Herzen zwei Isoformen, die gewebespezifisch unterschiedlich exprimiert werden (Wu et al. 1995). Dementsprechend können im Herzgewebe nach Visualisierung zwei Banden im dargestellten Western Blot auftreten. Die obere Bande (110 kDa) diente zur Quantifizierung (Abb. 16C).

Interessanterweise und gegensätzlich zu den beschriebenen Effekten von TH (Dillmann 1990) erhöhte 3,5- T_2 die Expression der schweren Kette des β -Myosins (*Myh7*), veränderte jedoch nicht die Transkript-Menge der schweren Kette des α -Myosins (*Myh6*). Weiterhin führte die Gabe von 3,5- T_2 zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP, *Nppb*), sowie zu einer schwachen Verringerung des Gen-Transkripts ($p=0,05$) des atrialen natriuretischen Peptids (ANP, *Nppa*) (Abb. 16B). Die endokrinen Effekte dieser natriuretischen Peptide bestehen in der Steigerung der Vasodilation und Hemmung der sympathischen Innervation der Widerstandsgefäße. Darüber hinaus beeinflussen sie die Natriuresis und Diurese (Cea 2005).

Die Behandlung mit 3,5- T_2 reduzierte zudem die Transkriptmenge der Kaliumkanal- β -Untereinheit (*Kcne1*). Dieses Membranprotein spielt in der Repolarisation des kardialen Aktionspotentials eine Rolle (Le Bouter et al. 2003). Die Transkriptmenge der Deiodasen und des TR β konnte aufgrund einer zu geringen Expressionsstärke (*Dio1* Ct=n.d., *Dio2* Ct>36, *Dio3* Ct>35, *Thrb* Ct>36) nicht quantifiziert werden, die Transkriptmenge des TR α (*Thra*) wurde durch 3,5- T_2 nicht signifikant verändert (Abb. 16B).

Um Unterschiede im kollagenen Faseranteil zwischen den Behandlungsgruppen festzustellen, wurden die eingebetteten Herzen der HFD-Mäuse einer Masson-Trichrom-Goldner-Färbung unterzogen. Die kollagenen Faserbündel sind grün-blau angefärbt, Zellkerne erscheinen schwarz und Zytoplasma, Muskelfibrillen sowie Erythrozyten sind rot angefärbt. Der Vergleich der histologischen Präparate zeigte starke interindividuelle Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen hinsichtlich des Kollagenanteils im Herzen. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den 3,5- T_2 -behandelten Tieren traten vermehrt grün angefärbte Faseranteile auf (siehe exemplarisch Abb. 17A).

Die Resultate aus der Expressionsanalyse von Genen, die für die Struktur des kardialen Bindegewebes eine bedeutende Rolle spielen, wiesen ebenfalls eine starke interindividuelle Variabilität auf. Die Behandlung mit 3,5- T_2 führte in den Mäusen unter HFD zu keiner signifikanten Änderung der Transkriptmengen von Transforming growth factor beta 1 (*Tgfb1*), Cardiac muscle alpha actin (*Actc1*), Collagen type I, alpha 1 (*Colla1*) und Connective tissue growth factor (*Ctgf*) (Abb. 17B).

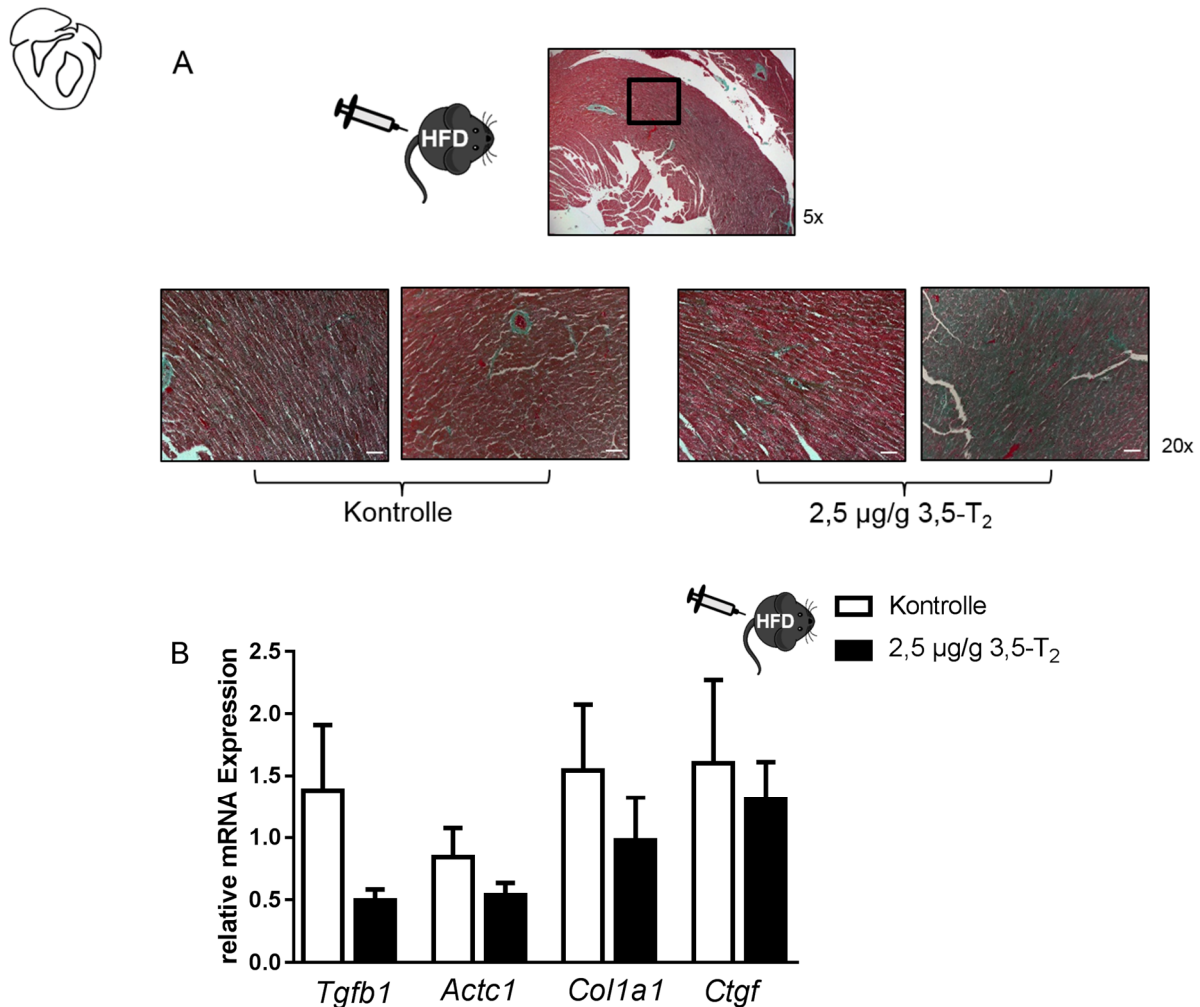


Abb. 17: Masson-Trichrom-Goldner-Färbung und Expression fibroserelevanter Gene im Herzgewebe nach 3,5-T₂-Behandlung

(A) Masson-Trichrom-Goldner Färbung in Herzen von Mäusen unter HFD und SD mit oder ohne 28-tägiger 3,5-T₂-Behandlung. Die histologischen Präparate (n=2) zeigen rot gefärbte Erythrozyten, Muskelfasern und Keratin, grün angefärbte Kollagen bzw. Bindegewebsfasern und schwarze Zellkerne (Maßstabsbalken 50 µm). Die obere Abbildung zeigt exemplarisch den Ausschnitt im Septum des Herzpräparates (5x), welcher in 20-facher Vergrößerung mikroskopisch genauer analysiert wurde. (B) Genexpressionen von *Tgfb1*, *Actc1*, *Col1a1* und *Ctgf* im Herzgewebe von Mäusen unter HFD nach 33-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂. Keine statistische Signifikanz zwischen der Kontroll- und der 3,5-T₂-Gruppe, p-Wert > 0,05 (Mann Whitney Test).

4.3.2 Effekte von 3,5-T₂ in differenzierten H9c2 - Kardiomyozyten

Die Analyse des murinen Herzgewebes nach der 33-tägigen Behandlung mit 3,5-T₂ zeigte Veränderungen der Transkriptmenge einzelner Gene, die als TH-responsiv gelten. Zur Validierung der Ergebnisse *in vitro* wurde die Zelllinie H9c2 als entsprechendes Modellsystem für die kardialen Effekte von 3,5-T₂ genutzt. Die Expression der kardialen regulatorischen leichten Myosinkette (*MyI2*) stellte ein Marker für die erfolgreiche Differenzierung der Myoblasten zu multinukleären Myotuben dar (Abb. 18).

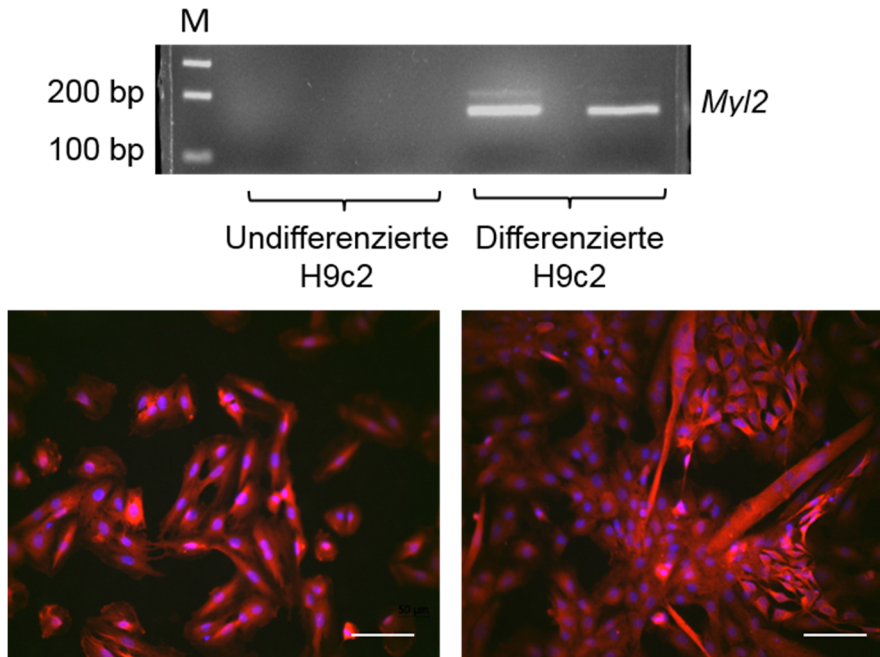


Abb. 18: Validierung und Differenzierung H9c2-Zellen

Das Agarose-Gel-Bild zeigt die Expression des Differenzierungsmarkers *Myl2* in undifferenzierten und differenzierten H9c2-Zellen. Die Bandengröße liegt bei 162 bp, links außen befindet sich der Größenmarker (M). Die histologischen Bilder zeigen undifferenzierte und differenzierte H9c2-Zellen nach immunohistochemischer Färbung mit Serca2 APTase (Abcam) und Cy3 Antimouse IgG als sekundärer Antikörper. DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindol) diente zur Färbung des Zellkerns (blau) (Maßstabsbalken 100 µm).

Mittels der LC-MS/MS-Methode wurde getestet, ob differenzierte H9c2-Zellen 3,5-T₂ oder T₃ aufnehmen können. Die 24-stündige Stimulation mit 3,5-T₂ oder T₃ führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung des Gehaltes der Testsubstanzen. Die Inkubation mit 1 µM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ hatte einen Anstieg von 14 nM 3,5-T₂ bzw. 11 nM T₃ in der Zelle zur Folge und dementsprechend dienten diese Konzentrationen für weitere Genexpressionsstudien. Etwa 70 % der eingesetzten Metabolitkonzentration war nach 24 h im Zellkulturüberstand detektierbar (Abb. 19). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass H9c2-Zellen 3,5-T₂ und T₃ bis zu einer bestimmten Konzentration aufnehmen, die Metabolite jedoch auch exportiert oder extrazellulär angereichert werden können.

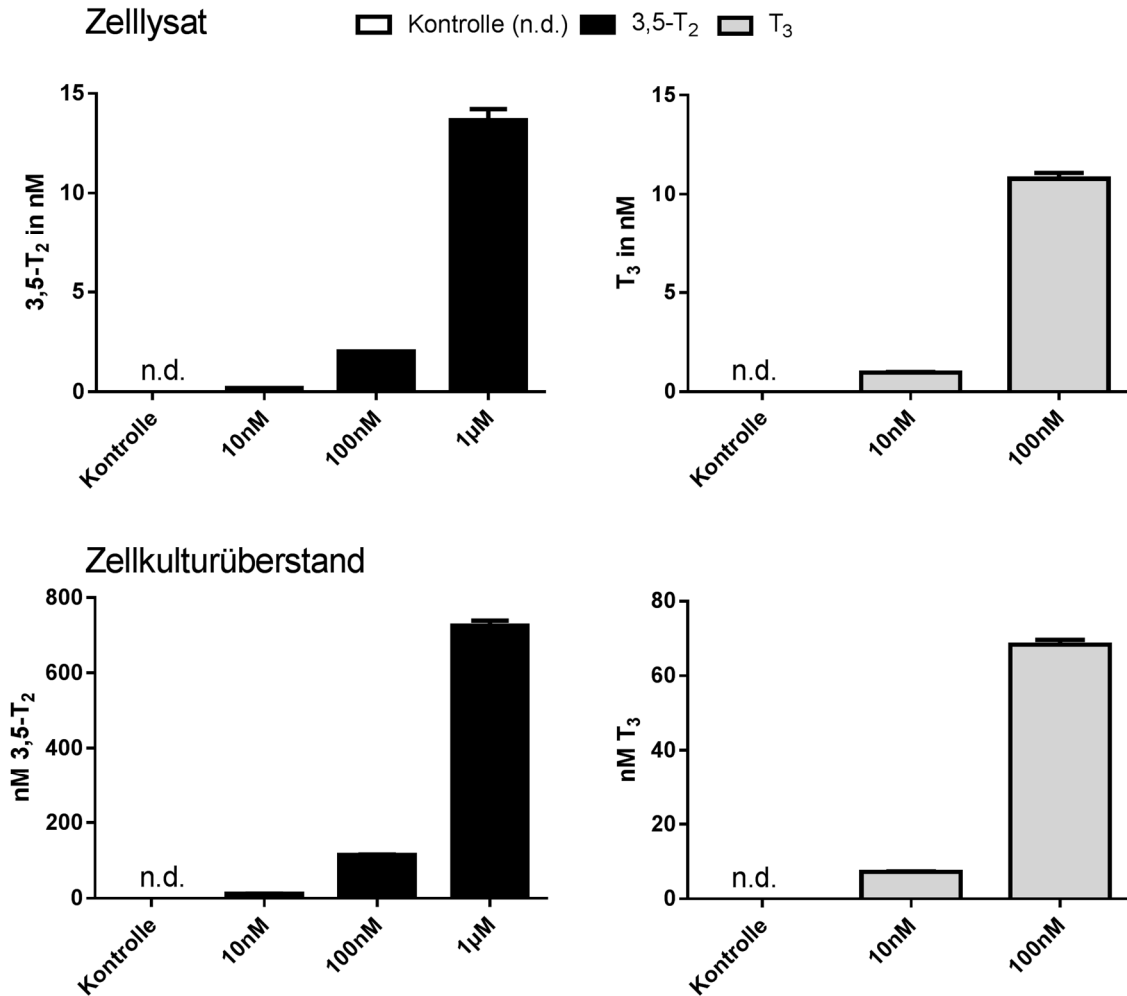


Abb. 19: Konzentration von 3,5-T₂ und T₃ im Zelllysate und -überstand von differenzierten H9c2-Zellen

H9c2-Zellen wurden mit aufsteigender Konzentration 3,5-T₂ oder T₃ 24 h behandelt. Mittels LC MS/MS (QTRAP®6500) (Dr. Daniel Rathmann bzw. Dr. Keith Richards) wurden die 3,5-T₂- und T₃-Gehalte in Zelllysaten und Zellkulturüberständen ermittelt (n=1, Triplikate). Keine Detektion der Metabolite wird als n.d. (nicht detektiert) gekennzeichnet.

Die Expressionsanalyse TH-responsiver Gene zeigte, dass sowohl 3,5-T₂ als auch T₃, vergleichbar mit den *in vivo* Ergebnissen, die Transkriptmenge von *Atp2a2* (*Serca2*) erhöhte. Es wurden keine signifikanten Änderungen der Genexpression von *Pln* und *Myh7* beobachtet, jedoch zeigte sich ein Trend zu einer gesteigerten mRNA-Menge des Gens *Myh7*. Die Expression von *Actc1*, entscheidend für die Molekularstruktur der Myotuben, wurde durch 1 µM 3,5-T₂, nicht aber durch 100 nM T₃ reduziert (Abb. 20). Geringere Konzentrationen von 3,5-T₂ hatten auf die Expression der untersuchten Gene keine Auswirkung und wurden nicht abgebildet. In den differenzierten Rattenkardiomyozyten konnte im Gegensatz zum murinen Herzgewebe keine Expression der Gene *Myh6*, *Nppb* und *Nppa* detektiert werden.

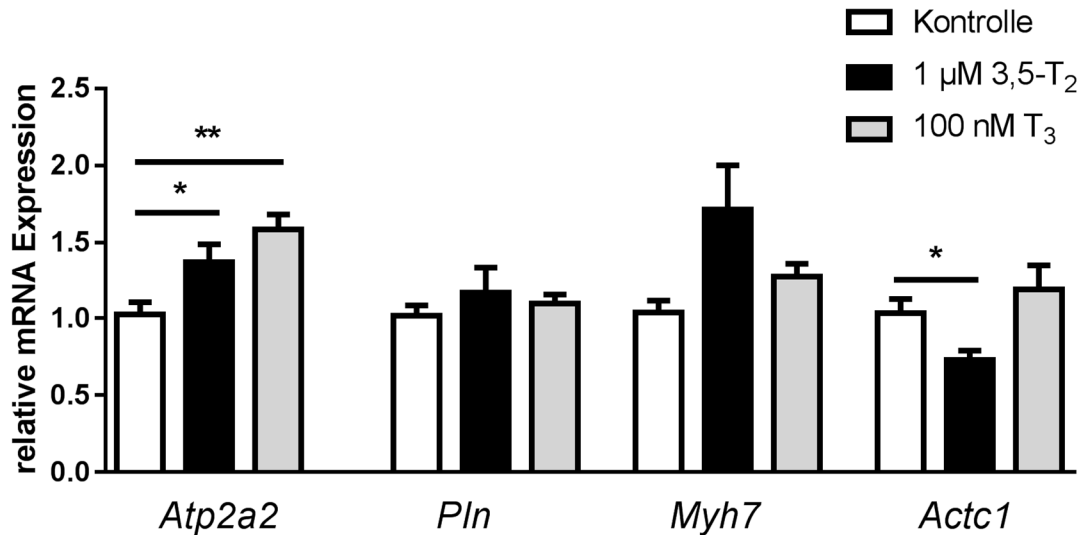


Abb. 20: Genexpression von *Atp2a2*, *Pln*, *Myh7* und *Actc1* in differenzierten H9c2-Zellen

Die Mittelwerte \pm SEM (n=3, jeweils Triplikate) der relativen Expressionswerte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) sind dargestellt. Die mittels qPCR erhobenen Expressionsmuster wurden auf *HPRT* normalisiert. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01 (Kruskal-Wallis Test).

4.4 Wirkung von 3,5-T₂ auf den hepatischen Fremdstoff- und Steroidmetabolismus

In Kooperation mit Dr. Georg Homuth und Janine Golchert von der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung) wurde das hepatische Transkriptom in Mäusen unter SD und HFD nach 3,5-T₂-Behandlung analysiert. Ziel der Untersuchung war die Feststellung weiterer Signalwege, die durch 3,5-T₂ in der Leber verändert werden und klassischerweise nicht als TH-responsiv definiert sind.

4.4.1 3,5-T₂ reguliert die Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme

Bei der Auswertung der Transkriptomdaten zeigte sich, dass ein überwiegender Teil der durch 3,5-T₂ regulierten Gene Fremdstoff-metabolisierende Enzyme (FME) codieren, welche sich in Phase I-, Phase II-Enzyme und Phase III-Transporter unterteilen und die Inaktivierung und Elimination lipophiler körpereigener Substanzen oder Fremdstoffe regulieren.

Tabelle 27 gibt einen Überblick über die regulierten Transkripte nach 2,5 µg 3,5-T₂ oder 0,03 µg T₃-Behandlung in Mäusen unter HFD und SD. Die Gabe von 0,25 µg/g 3,5-T₂ hatte nach zwei Wochen keinen signifikanten Einfluss auf das hepatische Transkriptom in HFD-Mäusen und die Gruppe wurde deshalb nicht aufgeführt.

ERGEBNISSE

Tab. 27: Übersicht der regulierten FME codierenden Transkripte in Lebern von 3,5-T₂ oder T₃-behandelten Mäusen unter SD oder HFD

Fold changes mit einem p-Wert ≤ 0,05 der positiv exprimierten Gen-Transkripte sind Fett und der negativ exprimierten Transkripte kursiv dargestellt (n=3) (Daten aus Transkriptomanalyse, siehe Anhang Tab. 34, Tab. 35, Tab. 36).

Primärer Genname		Mäuse unter HFD			Mäuse unter SD
		0,03 µg/g T ₃	2,5 µg/g 3,5-T ₂	2,5 µg/g 3,5-T ₂	2,5 µg/g 3,5-T ₂
		Versuchsdauer 14 d		Versuchsdauer 28 d	
		Fold change	Fold change	Fold change	Fold change
Phase I- Enzyme	<i>Cyp2b9</i>				54,2
	<i>Cyp17a1</i>			3,5	3,9
	<i>Cyp39a1</i>			2,9	
	<i>Cyp51</i>			2,8	
	<i>Cyp2b13</i>				2,8
	<i>Cyp2c39</i>				2,5
	<i>Ces4a</i>		2,5		2,4
	<i>Cyp2c38</i>				1,7
	<i>Ces1f</i>			<i>-1,6</i>	
	<i>Ces1g</i>		<i>-1,9</i>		
	<i>Cyp46a1</i>			<i>-2,0</i>	
	<i>Cyp2c37</i>				<i>-2,0</i>
	<i>Cyp1a2</i>		<i>-2,1</i>		
	<i>Ces2a</i>			<i>-2,2</i>	
	<i>Cyp2u1</i>			<i>-2,2</i>	<i>-2,2</i>
	<i>Cyp2d9</i>			<i>-2,4</i>	
	<i>Cyp2c29</i>		<i>-3,2</i>		<i>-2,5</i>
<i>Cyp2c44</i>		<i>-3,0</i>	<i>-3,9</i>	<i>-3,5</i>	
<i>Cyp4a12a</i>			<i>-9,8</i>	<i>-5,3</i>	
<i>Cyp4a12b</i>			<i>-10,3</i>	<i>-6,5</i>	
Phase II- Enzyme	<i>Sult5a1</i>	3,2	4,4	4,4	4,5
	<i>Ugt2b37</i>	5,5	4,6	2,8	2,2
	<i>Papss2</i>				1,8
	<i>Ugt2b38</i>				<i>-1,6</i>
	<i>Gstm1</i>				<i>-1,6</i>
	<i>Sult1b1</i>			<i>-1,7</i>	
	<i>Gstm6</i>		<i>-2,6</i>	<i>-2,1</i>	<i>-1,7</i>
	<i>Gstp1</i>				<i>-1,7</i>
	<i>Mgst3</i>		<i>-2,5</i>		<i>-1,8</i>
	<i>Gsta4</i>		<i>-2,2</i>	<i>-2,0</i>	<i>-2,5</i>
	<i>Gpx6</i>		<i>-3,0</i>	<i>-3,2</i>	
	<i>Gsta2</i>		<i>-4,0</i>	<i>-4,1</i>	<i>-5,1</i>
Phase III- Transporter	<i>Slc22a7</i>	2,8	4,8	5,3	6,2
	<i>Slc22a27</i>			3,9	5,8
	<i>Slc25a30</i>		2,7	2,7	4,3
	<i>Slc22a5</i>				2,4
	<i>Slc25a45</i>		1,9	1,7	2,1
	<i>Slc15a2</i>				2,1
	<i>Slc22a29</i>				2,1
	<i>Slc13a3</i>			2,1	
	<i>Slc16a13</i>				2,0
	<i>Slc23a1</i>				1,9
	<i>Abca3</i>		1,7	1,8	1,8
	<i>Slc25a42</i>				1,6
	<i>Slc17a2</i>				<i>-1,5</i>
	<i>Slco2a1</i>				<i>-2,2</i>
	<i>Slc39a4</i>		<i>-2,6</i>	<i>-3,7</i>	
	<i>Abcc3</i>		<i>-3,8</i>	<i>-6,5</i>	<i>-4,7</i>

Insgesamt lässt sich erkennen, dass die längere Behandlungsdauer (14 d vs. 28 d) von 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD die Anzahl der regulierten Gene von FME ansteigen lässt. Die Transkriptomanalyse in der Leber von Mäusen, welche eine SD erhielten, wies eine größere Anzahl signifikant geänderter Gen-Transkripte auf als in den Mäusen unter HFD (Tab. 27). Die drei FME codierenden Gene Sulfotransferase family 5A, member 1 (*Sult5a1*), UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B37 (*Ugt2b37*) und Organic anion transporter 2 (*Slc22a7*) wurden als einzige Transkripte durch die Behandlung mit 0,03 µg T₃ signifikant stärker reguliert als in der Kontrollgruppe. Diese drei Gene waren ebenfalls in den Lebern der 3,5-T₂-Gruppe höher exprimiert und dienten deshalb zur Validierung der Microarraydaten mittels qPCR. Die Gabe von 0,25 µg/g 3,5-T₂ hatte keine Auswirkung auf die Expression (Abb. 21).

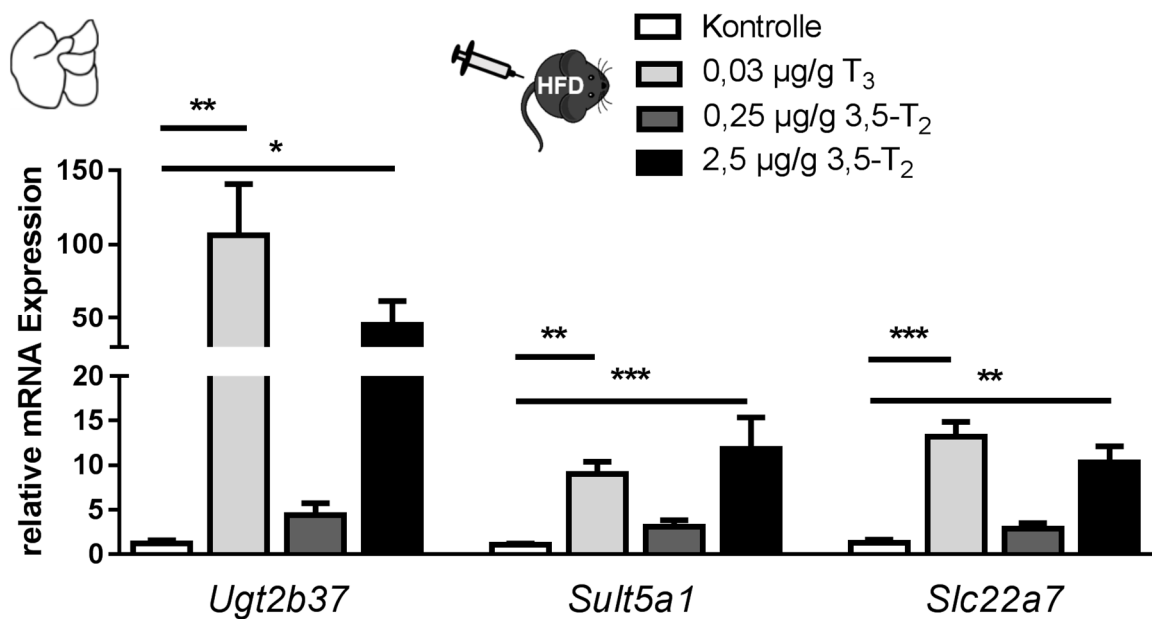


Abb. 21: Expressionen der Gene *Ugt2b37*, *Sult5a1* und *Slc22a7* in der Leber von Mäusen unter HFD nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ oder T₃

Mittels qPCR ermittelte relative Expressionswerte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) sind als Mittelwerte \pm SEM (n=5-7) dargestellt. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis Test).

Eine systematische Literatursuche ergab, dass diverse durch 3,5-T₂ differentiell exprimierte Gene in Mäusen unter HFD und SD zu potentiellen Zielgenen des Transkriptionsfaktors CAR (konstitutiver Androstanrezeptor) gehören oder durch CAR-Aktivatoren (z.B. TCPOBOP) reguliert wurden (Tab. 28). Diesbezüglich wurde mittels qPCR und Western Blot untersucht, ob 3,5-T₂ die Gen- und Proteinexpression von CAR (*Nr1i3*) veränderte. Weder 3,5-T₂ noch T₃ haben nach 14-tägiger Behandlung in HFD-Mäusen einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von *Nr1i3* (CAR) (Abb. 22). Die entsprechenden Western Blot-Analysen konnten für den 14-tägigen Versuch eine signifikante Erhöhung der CAR Proteinexpression durch 3,5-T₂ oder T₃ im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnen (Abb. 22).

Tab. 28: Potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors CAR

Die Pfeile markieren die Richtung der Regulation der Expression von CAR-Zielgenen nach 3,5-T₂-Behandlung. Leere Felder kennzeichnen keine Regulation der Genexpression durch 3,5-T₂ (Daten aus Transkriptomanalyse siehe Anhang Tab. 34, Tab. 35, Tab. 36)

Genname	FME	Regulation in HFD	Regulation in SD	Referenz
<i>Cyp2b9</i>	Phase I		↑↑	(Sueyoshi et al. 1999)
<i>Cyp39a1</i>	Phase I	↑		(Beilke et al. 2009)
<i>Cyp1a2</i>	Phase I	↓		(Tolson and Wang 2010)
<i>Cyp2c29</i>	Phase I	↓	↓	(Jackson et al. 2004, Smetanina et al. 2011)
<i>Ces2a</i>	Phase II	↓		(Zhang et al. 2012, Jones et al. 2013)
<i>Sult5a1</i>	Phase II	↑	↑	(Aleksunes and Klaassen 2012)
<i>Ugt2b37</i>	Phase II	↑	↑	(Richardson et al. 2008)
<i>Gsta2</i>	Phase II	↓	↓	(Roques et al. 2013)
<i>Slc22a7</i>	Phase III	↑	↑	(Jigorel et al. 2006)
<i>Abcc3</i>	Phase III	↓	↓	(Staudinger et al. 2013)

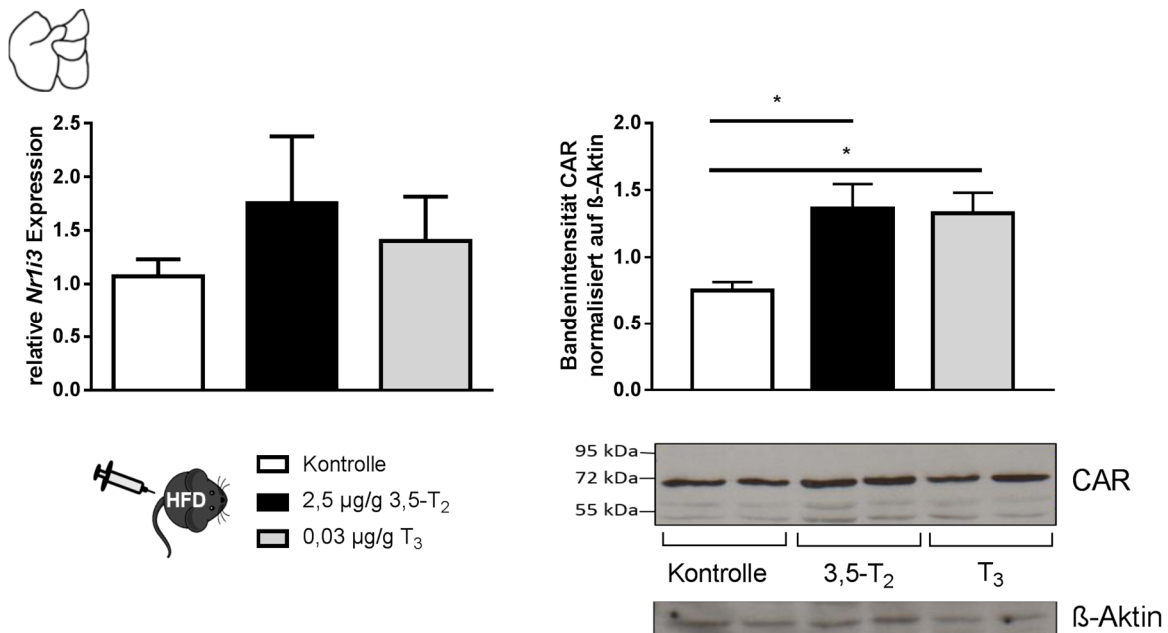


Abb. 22: Analyse der hepatischen Expression von CAR nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ oder T₃ in Mäusen unter HFD

Graphisch dargestellt ist die Genexpression (n=5-7) und die nukleäre Proteinexpression (densitometrische Auswertung mit n=4) von CAR (*Nr1h3*) nach 14-tägiger 3,5-T₂ oder T₃-Behandlung in Mäusen unter HFD. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05 (Kruskal-Wallis Test). Das untere Feld zeigt ein repräsentatives Western Blot Experiment (n=2) mit spezifischen Antikörpern gegen CAR (68kDa) und β-Aktin (Referenzprotein).

Die Analyse der Lebern aus den 28-tägigen Versuchen verzeichnete eine Reduktion der Expression von *Nr1h3* in Mäusen unter HFD und wies keine Änderung der Transkriptmenge in 3,5-T₂-behandelten Mäusen unter SD auf. Der Effekt von 3,5-T₂ auf die hepatische CAR-Proteinmenge nach 14 d konnte in den Versuchen mit 28-tägiger Behandlungsdauer in Mäusen unter HFD oder SD nicht bestätigt werden (Abb. 23A und B).

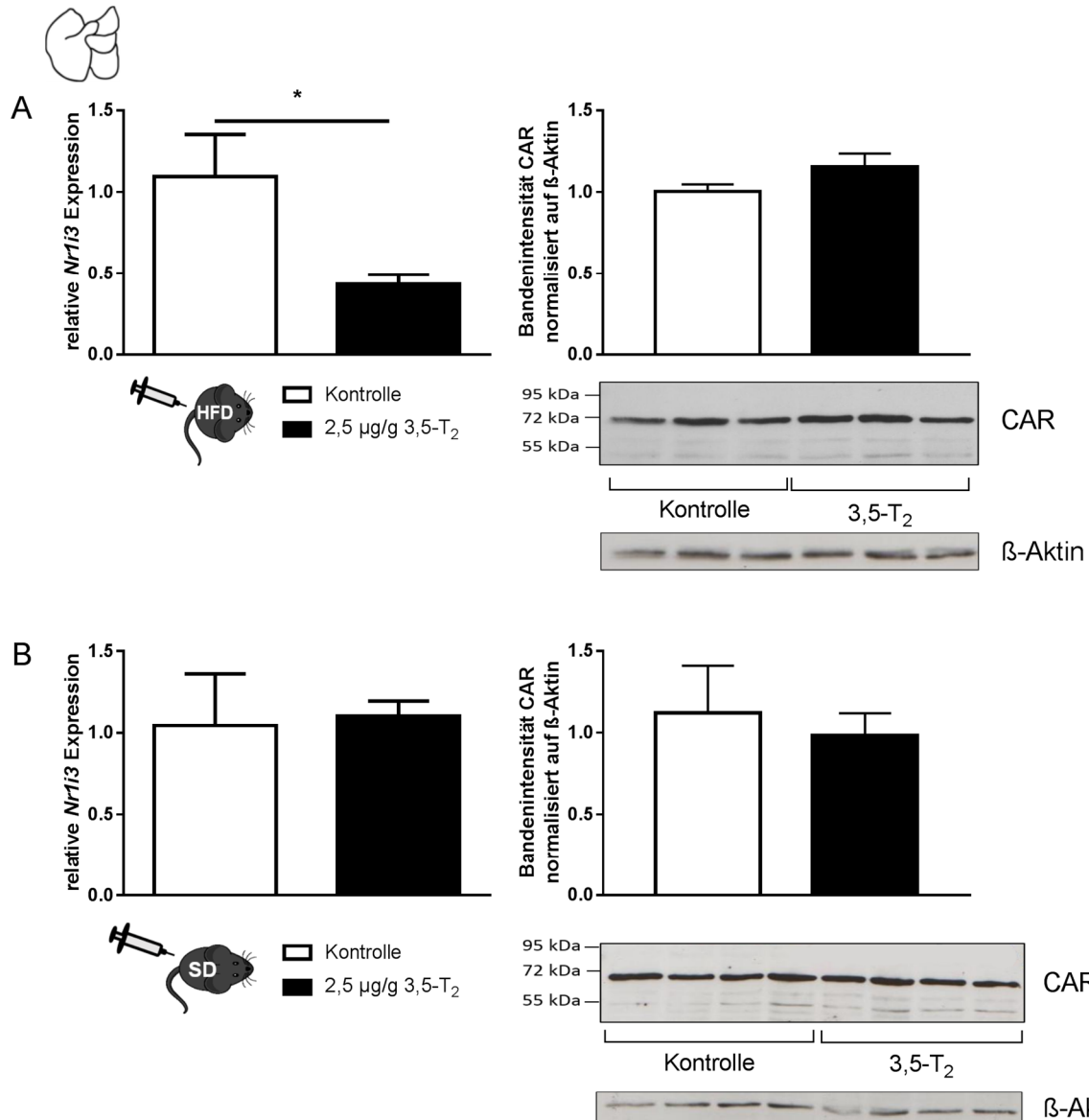


Abb. 23: Analyse der hepatischen Expression von CAR nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ oder T₃ in Mäusen unter HFD und SD

(A) Graphisch dargestellt ist die Genexpression (n=5-7) und die nukleäre Proteinexpression von CAR (*Nr1i3*) (n=3) nach 28-tägiger 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter HFD. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05 (Kruskal-Wallis Test). Das untere Feld zeigt einen repräsentativen Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen CAR (68kDa) und β -Aktin (Referenzprotein). Aufgrund der geringen Tieranzahl pro Gruppe (n=3) wurde keine statistische Auswertung der Bandenintensität vorgenommen.

(B) Genexpression (n=5-7) und nukleäre Proteinexpression von CAR (*Nr1i3*) (n=4) nach 28-tägiger 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter SD. Das untere Feld zeigt einen repräsentativen Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen CAR (68kDa) und β -Aktin (Referenzprotein). Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe, p > 0,05 (Mann-Whitney Test).

4.4.2 Effekte von 3,5-T₂ auf den Cholesterin- und Steroidstoffwechsel

Die detaillierte Analyse der Transkriptomdaten ergab, dass die 28-tägige Behandlung mit 2,5 µg 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD die Expression von Genen veränderte, die eine bedeutende Rolle in der Cholesterin- und Steroidbiosynthese spielen. In den Lebern von Mäusen, die nur 14 d mit 3,5-T₂ bzw. T₃ behandelt wurden oder eine Standarddiät erhielten konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Abbildung 24 gibt eine Übersicht der Gene, die an der Cholesterinbiosynthese beteiligt sind und deren Expression durch die 28-tägige 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter HFD im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht wurde (Abb. 24).

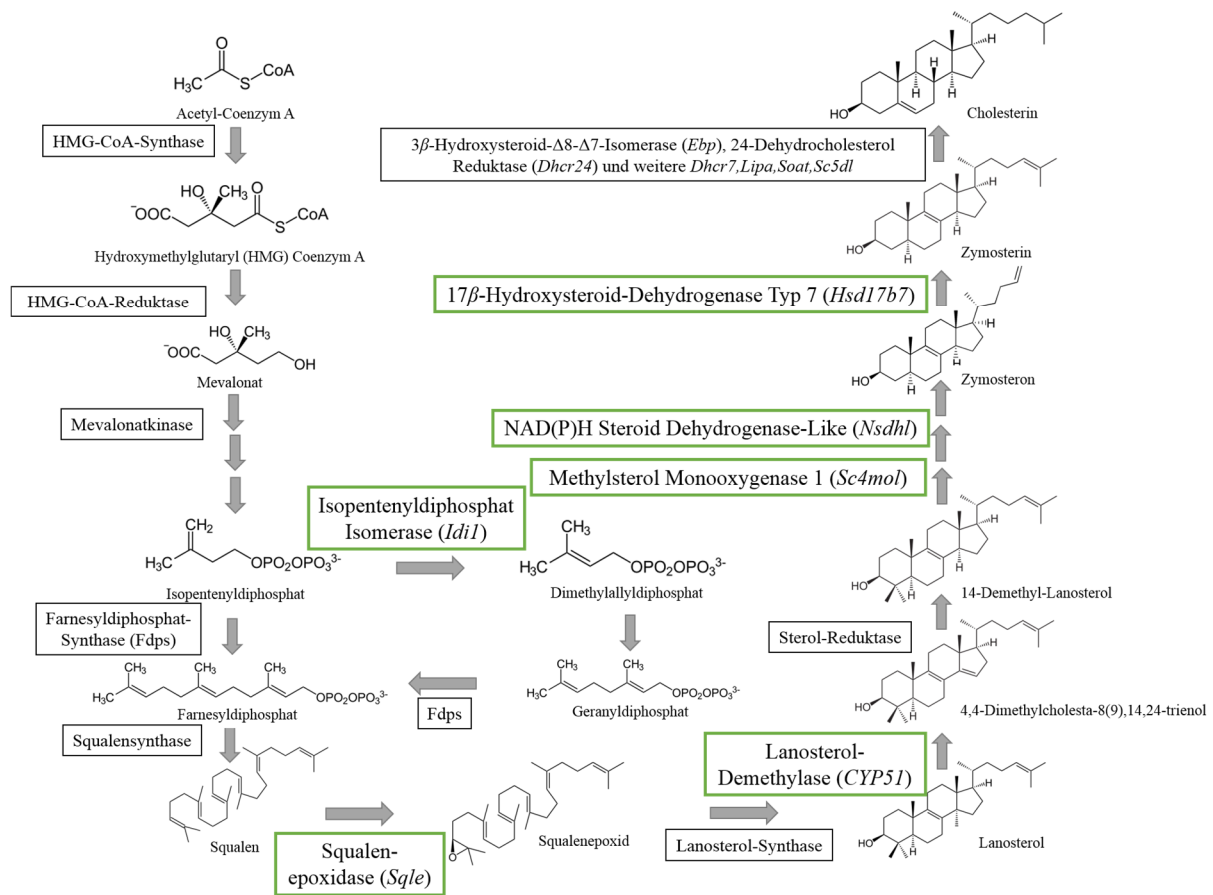


Abb. 24: Schematische Darstellung der Cholesterinbiosynthese

Angelehnt an Cholesterol Biosynthesis (Mus musculus) [wikipathways.org](http://www.wikipathways.org). Genexpressionen in der Leber, die durch die 28-tägige Behandlung von 2,5 µg/g 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD signifikant reguliert wurden, sind in grün dargestellt (Daten aus Transkriptomanalyse siehe Anhang Tab. 35).

Die Ergebnisse aus der Microarray-Analyse (*Idi1* fold change: 3,2; *Sqle* fold change: 4,8; *Hsd17b7*: fold change: 1,8) wurden repräsentativ für die Gene *Idi1*, *Sqle* und *Hsd17b7* mittels qPCR validiert. Es konnte eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus beiden Analyseverfahren verzeichnet werden. Eindeutig lässt sich erkennen, dass 3,5-T₂ nur in den Mäusen unter HFD eine signifikant positive Regulation der Gen-Transkripte bewirkt, hingegen in Mäusen unter SD keine Änderung auftrat (Abb. 25)

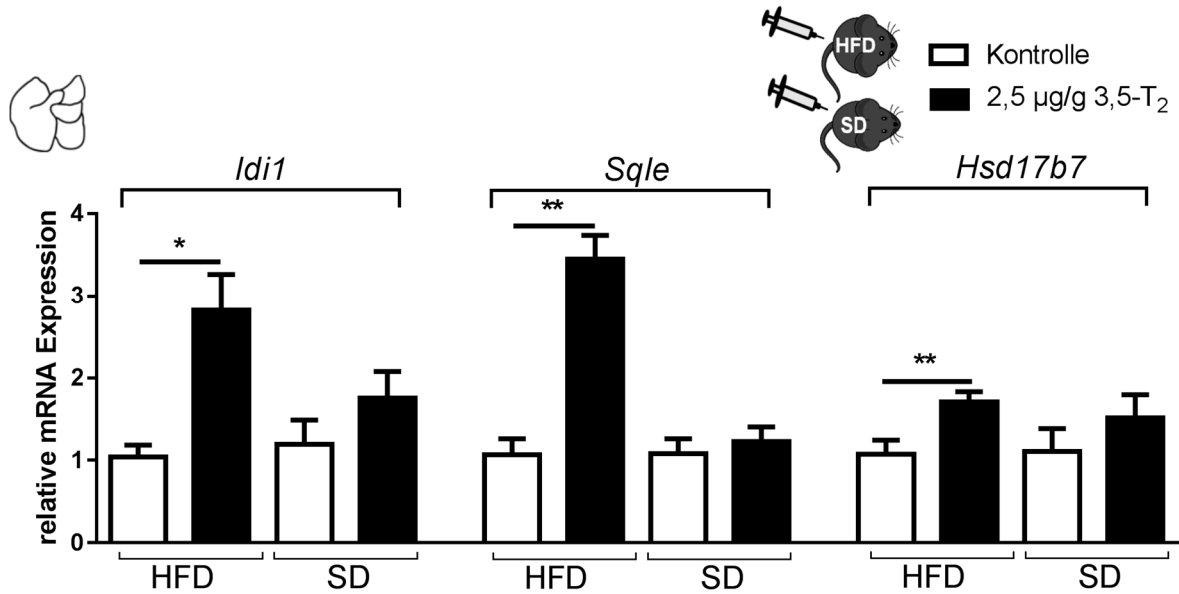


Abb. 25: Expression der Gene *Idi1*, *Sqle* und *Hsd17b7* in der Leber von Mäusen unter HFD oder SD nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂

Mittels qPCR ermittelte relative Expressionswerte ($2^{-\text{ddCt}}$) sind als Mittelwerte \pm SEM (n=5-7) dargestellt. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01 (Mann-Whitney Test).

Darüber hinaus konnten zwei weitere Gene identifiziert werden, die im Gallensäurestoffwechsel involviert sind (Beilke et al. 2009, Lorbek et al. 2012) und nur in Mäusen unter HFD aber nicht unter SD durch 3,5-T₂ reguliert wurden. Die Expression von Cytochrome P450 Family 39 Subfamily A Member 1 (*Cyp39a1*) war signifikant erhöht (2,85 fold) und die Transkriptmenge von Cytochrome P450 Family 46 Subfamily A Member 1 (*Cyp46a1*) mit 3,5-T₂ reduziert (-1,95 fold). T₃ hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster dieser zwei Gene (Tab. 27).

Interessanterweise konnte eine erhöhte mRNA-Menge für die Steroid-17 α -Hydroxylase (*Cyp17a1*) und ein geringerer Expressionswert der Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 6 (*Hsd17b6*) in Mäusen nach vierwöchiger 3,5-T₂-Behandlung detektiert werden (Anhang Tab. 35 und Tab. 36). *Cyp17a1* ist ein Schlüsselenzym der Androgen-Biosynthese und *Hsd17b6* spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung und Inaktivierung von Androgenen und Östrogenen (Auchus 2004, Luu-The and Labrie 2010).

In Mäusen unter SD wurde die hepatische Expression zweier Gene des Sexualsteroid-Metabolismus, Steroid-5 α -Reduktase (*Srd5a1*) und Hydroxysteroid 3-Beta Dehydrogenase (*Hsd3b2*), durch 3,5-T₂ signifikant herunterreguliert. In Mäusen unter HFD waren diese Gene nach 3,5-T₂-Gabe nicht differentiell exprimiert (Anhang Tab. 36).

Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9 (*Cyp2b9*) wurde mittels Microarrayanalyse als das Gen identifiziert, welches durch die 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter SD am stärksten (fold change: 54) exprimiert wurde, jedoch sich die Transkriptmenge in der Leber von Mäusen unter HFD nicht veränderte (Tab. 27). *Cyp2b9* gilt als Zielgen von CAR und ist für die Biotransformation exogener und endogener Substanzen, wie Steroidhormone, Prostaglandine und Fettsäuren verantwortlich

(Sueyoshi et al. 1999). Abbildung 26 fasst die Gene zusammen, die an der Steroidhormonsynthese beteiligt sind und nach der 3,5-T₂-Behandlung differentiell exprimiert worden sind.

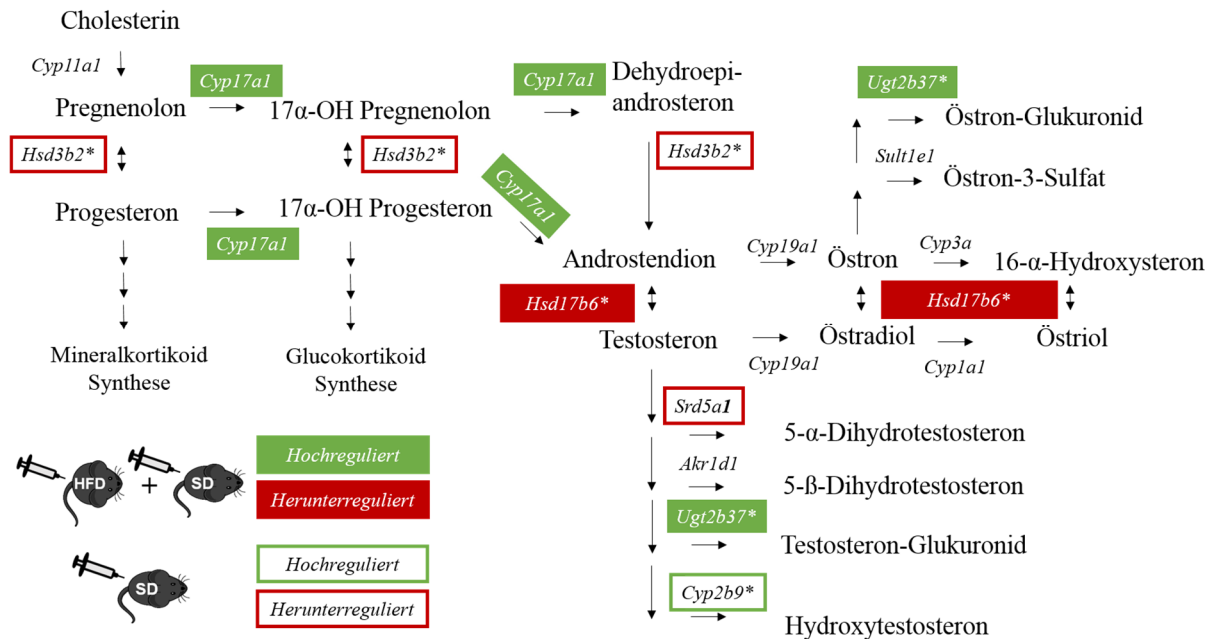


Abb. 26: Schematische Darstellung der Steroidhormonsynthese

Angelehnt an Kegg pathway Steroid hormone biosynthesis, Mus musculus (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?mmu00140). Genexpressionen in der Leber (Daten aus Transkriptomanalyse siehe Anhang Tab. 34, Tab. 35, Tab. 36), die durch Behandlung von 2,5 µg/g 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD und SD signifikant reguliert wurden, sind im grünen bzw. roten Kasten dargestellt. Expressionen, die nur in SD-Mäusen nach 3,5-T₂-Behandlung signifikant reguliert wurden, sind grün bzw. rot umrahmt. Kennzeichnung mit * impliziert weitere, nicht dargestellte Gene/Isoformen, die an der Reaktion beteiligt sein können.

Zusätzlich konnten Gene identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle im Sexualsteroidhormonstoffwechsel spielen. Zu ihnen gehören der Estrogenrezeptor 1 (*Esr1*), der in den 3,5-T₂-behandelten Tieren unter SD und HFD höher exprimiert war sowie der Membran-Progesteronrezeptor (*Paqr7*, *Paqr9*), dessen hepatische Expression in den 3,5-T₂-behandelten SD-Mäusen höher war. Weiterhin waren die Transkriptmengen diverser Isoformen der Aldo-Ketoreduktase 1c (*Akr1c14*, *18*, *19*), die als NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktase sowohl Steroidhormone als auch Xenobiotika metabolisieren (Pratt-Hyatt et al. 2013), durch 3,5-T₂ reguliert (Anhang Tab. 35 und Tab. 36.)

Um einen funktionellen Zusammenhang zu den Expressionsmustern herzustellen, wurde in Zusammenarbeit mit Claes Ohlsson und Andreas Landin im Department of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg das Steroidprofil in der Leber von 3,5-T₂-behandelten Mäusen unter HFD oder SD mittels GC-MS/MS analysiert. Vergleichbar mit den Resultaten der Transkriptom- und qPCR-Analysen aus Abbildung 25 wiesen 3,5-T₂-behandelte Mäuse unter HFD einen sehr viel höheren Gehalt an Androstendion und eine leicht erhöhte Progesteronkonzentration in der Leber auf als unbehandelte Mäuse oder 3,5-T₂-behandelte Mäuse unter SD. Bezüglich der hepatischen Dehydrotestosteron- und Testosterongehalte konnten zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede detektiert werden, wobei bezüglich der

statistischen Auswertung auf die geringe Anzahl der einbezogenen SD-Mäuse pro Gruppe (n=3) hingewiesen werden muss (Abb. 27).

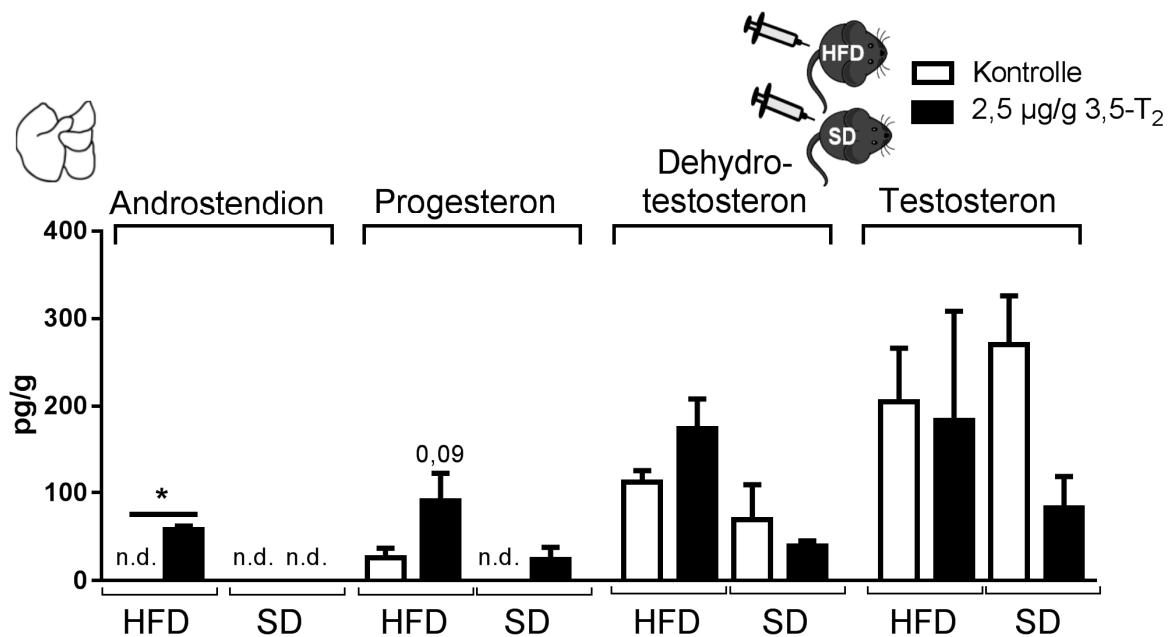


Abb. 27: Steroidgehalte in der Leber von 3,5-T₂-behandelten Mäusen unter HFD oder SD

Datenanalyse von Claes Ohlsson und Andreas Landin, Department of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg. Die Gruppen (HFD n=5, SD n=3) unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,01 (Mann-Whitney Test). Keine Detektion der Hormone bzw. unter dem Detektionslimit wird als n.d. (nicht detektiert) gekennzeichnet.

4.5 Wirkung von 3,5-T₂ in primären Hepatozyten der Maus

Die *in vivo* Ergebnisse aus den Tierversuchen zeigen sowohl in Mäusen unter HFD als auch SD eindeutige Effekte von 3,5-T₂ auf den Leberstoffwechsel. Mithilfe primärer Hepatozyten aus der Mausleber wurde untersucht, ob 3,5-T₂ direkt im isolierten Zellsystem den Energie- und TH-Metabolismus beeinflusst.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass 100 nM T₃ die Expression des TH-responsiven Marker *Dio1* in den Hepatozyten gleichermaßen reguliert wie 100 nM 3,5-T₂. Aus diesem Grund diente 100 nM T₃ neben der DMSO-Kontrolle als zusätzliche thyromimetische Vergleichskontrolle.

Die untersuchten Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Hepatozyten. Weder 3,5-T₂ (10 nM bis 10 µM) noch 100 nM T₃ führten zu einer Reduktion der Zellviabilität der Hepatozyten nach einer Inkubationszeit von 24 h im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 28A). Des Weiteren wurde für nachfolgende Genexpressionsanalysen ermittelt, ob die Testsubstanzen die Transkript-Menge des Referenzgens (*HPRT*) beeinflussen. Auch hier konnte kein Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 28B).

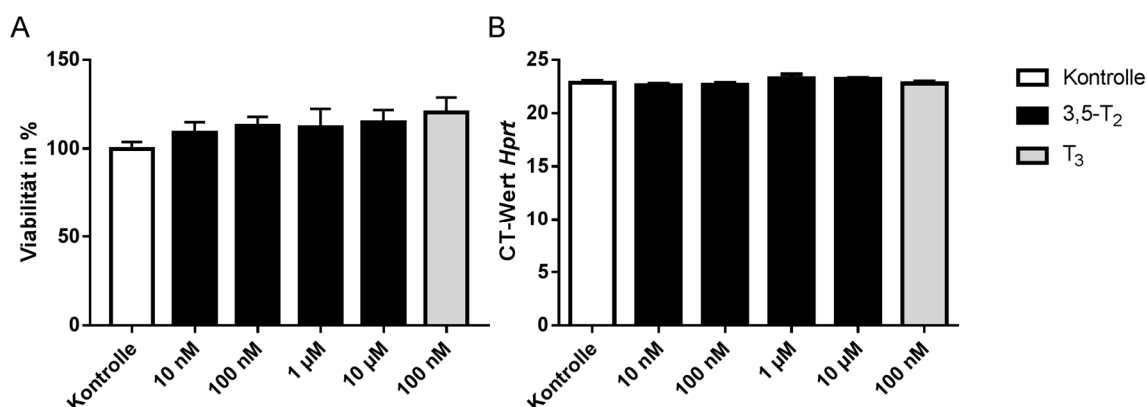


Abb. 28: Viabilität und Expression des Referenzgens in primären Hepatozyten

(A) Viabilität der primären Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM bis 10 µM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=2, jeweils Triplikate). (B) Genexpression von *HPRT* in primären Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM bis 10 µM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=3, jeweils Triplikate). Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Kruskal-Wallis Test).

Die *in vivo* Ergebnisse zeigten eine starke Stimulation der Genexpression und Aktivität der Dio1 in den Lebern der 3,5-T₂-behandelten Mäuse (Abb. 15).

In primären Hepatozyten steigerte 100 nM 3,5-T₂ nach 24-stündiger Inkubation ebenfalls die mRNA Expression der Dio1 um das 16-fache, ähnlich wie 100 nM T₃ (Abb. 29A). 1 µM und 10 µM 3,5-T₂ zeigten auch diesen Effekt. Demgegenüber konnte keine signifikante Änderung der Dio1-Aktivität für 10 und 100 nM 3,5-T₂ als auch für 100 nM T₃ beobachtet werden. Die Behandlung mit der supraphysiologischen Konzentration 10 µM 3,5-T₂ hatte nach 24 h eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität zur Folge (Abb. 29B).

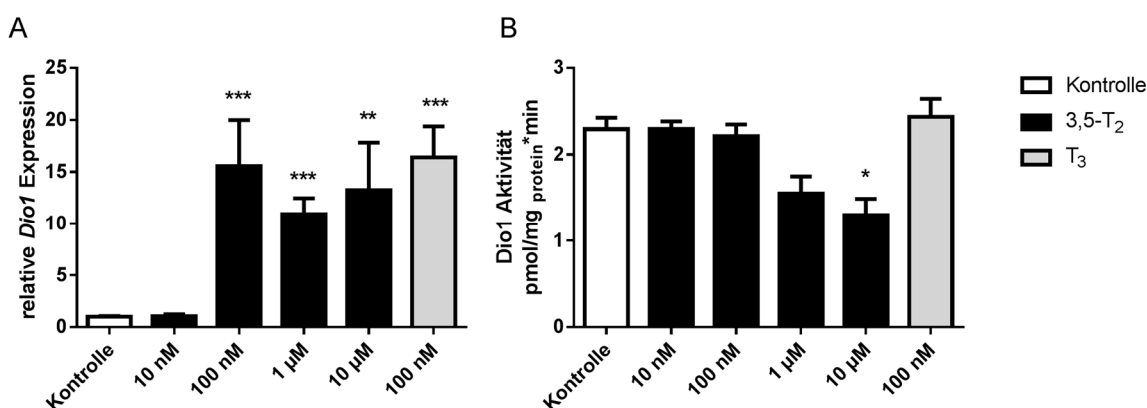


Abb. 29: Genexpression und enzymatische Aktivität der Dio1 in primären Hepatozyten

(A) Genexpression von *Dio1* in primären Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM bis 10 µM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=3, jeweils Triplikate). (B) Enzymatische Aktivität der *Dio1* in primären Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM bis 10 µM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=3, jeweils Triplikate). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis Test).

Exemplarisch für den hepatischen Energiestoffwechsel wurde die Expression von *Cyp7a1*, ein Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, untersucht. Das Agarose-Gel-Bild zeigt deutlich, dass in den Kontrollzellen keine Expression von *Cyp7a1* ermittelt werden konnte. Konzentrationsabhängig führte die Gabe von 3,5-T₂ zu einem Anstieg des Gen-Transkripts in den Hepatozyten. Dieser Effekt konnte auch mit 100 nM T₃ beobachtet werden (Abb. 30A).

Die Sulfotransferase 1a1 (*Sult1a1*) ist ein Phase II-Enzym und ein Zielgen von CAR. Darüber hinaus spielt es eine entscheidende Rolle im hepatischen Fremdstoff- und TH-Stoffwechsel (Aleksunes and Klaassen 2012). Die 24-stündige Inkubation von 100 nM, 1 µM und 10 µM 3,5-T₂ führte zu einem signifikanten Anstieg der *Sult1a1* Expression. 100 nM T₃ erhöhte ebenfalls die mRNA-Menge (Abb. 30B).

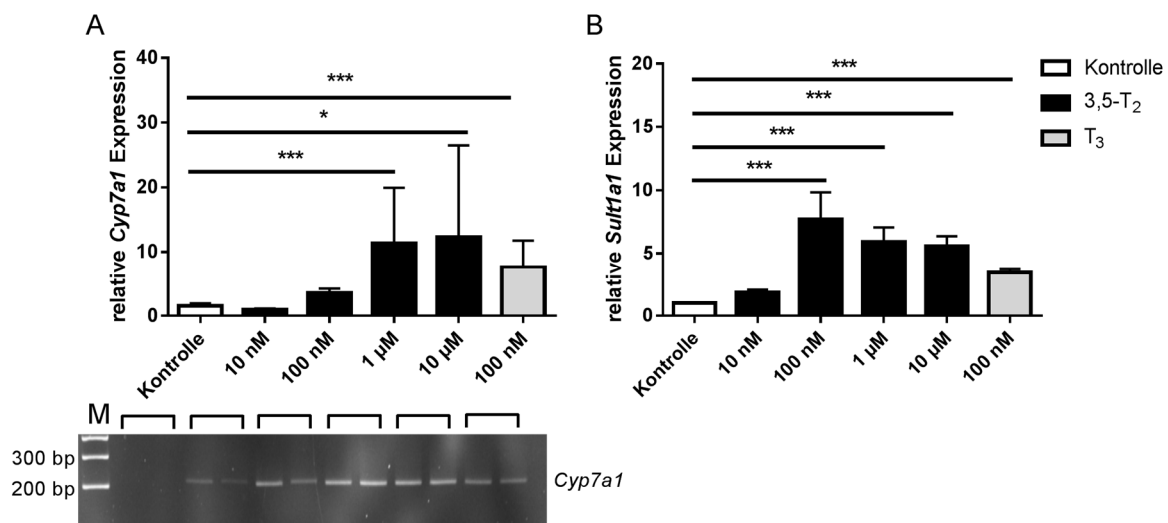


Abb. 30: Genexpression von *Cyp7a1* und *Sult1a1* in primären Hepatozyten

(A) Genexpression von *Cyp7a1* in primären Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM bis 10 µM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=3, jeweils Triplikate). Für *Cyp7a1* sind exemplarisch (n=2) die DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel aufgetragen. Die Bandengröße liegt bei 206 bp, links außen befindet sich der Größenmarker (M). (B) Genexpression von *Sult1a1* in primären Hepatozyten nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM bis 10 µM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (n=3, jeweils Triplikate). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis Test).

Entsprechend den *in vivo* Ergebnissen in der Leber von 3,5-T₂-behandelten Mäusen konnten die Genexpressionsstudien in den primären Hepatozyten zeigen, dass der TH-Metabolit 3,5-T₂ vergleichbar mit T₃ bereits nach 24 h die Expression TH-responsiver Gene (*Dio1*, *Cyp7a1*) erhöht und die Transkriptmenge von *Sult1a1*, ein Vertreter des hepatischen Fremdstoff- und TH-Stoffwechsels, stimuliert.

Laut Literaturdaten führt 3,5-T₂ in Ratten zu einer Steigerung der mitochondrialen Atmung und der Cytochrom C Oxidase (COX) Aktivität (Lanni et al. 1992, Lombardi et al. 2007, Lombardi et al. 2009). Im vorliegenden Mausversuch konnte eine gesteigerte Citratsynthaseaktivität und erhöhte Expression von Cyt C nach 3,5-T₂-Behandlung detektiert werden (Abb. 10).

Mithilfe des Seahorse Bioanalyser wurde diesbezüglich getestet, ob 3,5-T₂ in primären Hepatozyten ebenfalls die mitochondriale Atmung beeinflusst. Nach Titration wurde festgelegt, dass 10.000 Zellen pro 96er Well die optimale Zellzahl für den Versuch darstellen (Abb. 31A). Mit 100 nM T₃ und 100 nM 3,5-T₂ konnte zu Messbeginn eine basale Atmung pro Well von mindestens 75 OCR (pmol/min) erreicht werden und aus diesem Grund wurden diese Konzentrationen für Folge-Experimente eingesetzt.

Die 24-stündige Inkubation von 100 nM 3,5-T₂ und 100 nM T₃ führte zu keiner Änderung der basalen Atmung in den primären Hepatozyten (Abb. 31B). Anhand der Änderung des Sauerstoffverbrauchs nach Oligomycin-Gabe, ein Inhibitor der ATP-Synthase (Komplex V), konnte gezeigt werden, dass 100 nM 3,5-T₂ den ATP-Umsatz in den Mitochondrien im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant ansteigen ließ. Ein vergleichbarer Effekt wurde für T₃ nicht beobachtet (Abb. 31C). Im Gegensatz dazu verringerte sich der Parameter „Proton Leak“, ein Maß für den entkoppelten Zustand der Atmungskette (Abb. 31D). Auf die maximale Atmung und die Reservekapazität hatten sowohl 3,5-T₂ als auch T₃ keinen Einfluss (Abb. 31E und F).

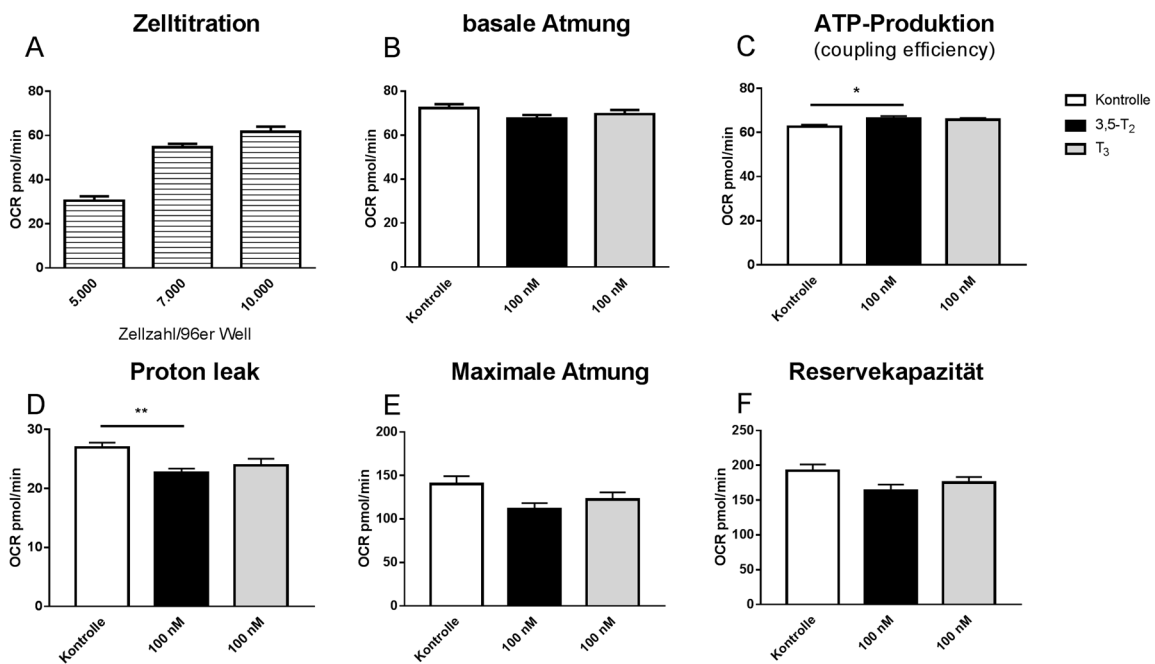


Abb. 31: Rate des Sauerstoffverbrauchs in primären Hepatozyten

(A) In primären Hepatozyten wurde die Atmung (OCR) in aufsteigender Zelldichte bei verschiedenen Zellzahlen im 96-er Well-Format (n=1-2, jeweils 6 Replikate) ermittelt. (B-F) Primäre Hepatozyten wurden 24 h mit 100 nM 3,5-T₂ oder T₃ stimuliert und mithilfe mitochondrialer Inhibitoren verschiedene mitochondriale Parameter bestimmt (n=2-3, jeweils 6 Replikate). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01 (Kruskal-Wallis Test).

Das Modell der primären Zellkultur diene weiterhin dazu, den Metabolismus von 3,5-T₂ in Detail zu untersuchen, da hierzu bisher nur wenige Daten publiziert worden sind.

Mittels der LC-MS/MS-Methode wurde untersucht, welche TH-Metabolite nach 24-stündiger Inkubation mit 3,5-T₂ im Vergleich zu T₃ im Zellextrakt und im konditionierten Medium vorzufinden waren. Allgemein lässt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg von 3,5-T₂ und T₃ in den Zellextrakten und im Überstand verzeichnen (Abb. 32A und B bzw. D und E).

In den primären Hepatozyten konnte basal weder 3,5-T₂ noch T₃ detektiert werden, möglicherweise lagen die endogenen Konzentrationen unter dem Detektionslimit bzw. beeinflussen Matrixeffekte die Detektionssensitivität. In den Zellextrakten und im konditionierten Medium wurde ein geringer Gehalt an T₄ (<0,05 nM) gemessen, unabhängig von den Behandlungsgruppen (Abb. 32C und F). Die 24-stündige Stimulation mit 10 oder 100 nM T₃ führte zu keiner Zunahme der 3,5-T₂-Konzentration im Lysat oder im Überstand und dementsprechend lieferte auch dieses Modell keine Hinweise auf den potentiellen Biosyntheseweg von 3,5-T₂ (Abb. 32A und D). Die Co-Stimulation mit 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU) hatte keinen Einfluss auf die detektierten 3,5-T₂- und TH-Gehalte in den Zellen und im Überstand (Abb. 32).

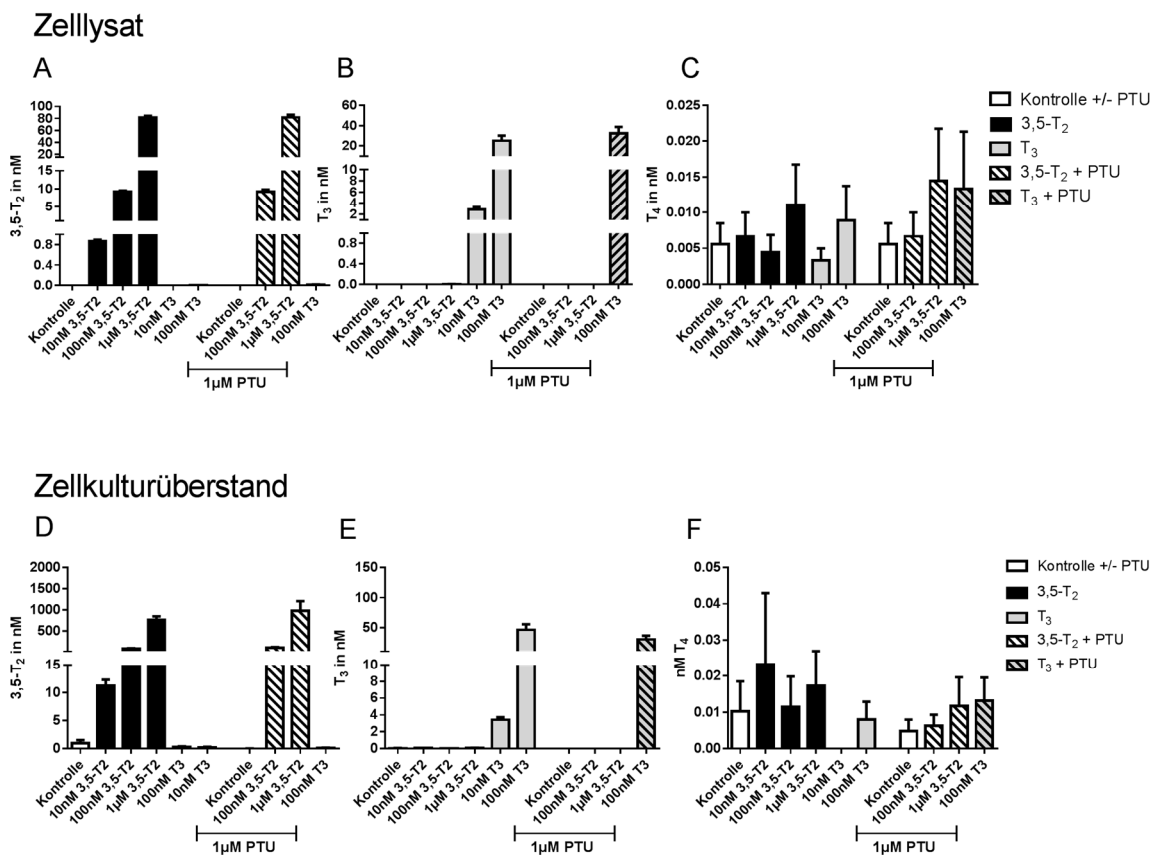


Abb. 32: Konzentration von 3,5-T₂ und TH im Zelllysate und im Zellkulturüberstand primärer Hepatozyten
 Primäre Hepatozyten wurden 24 h mit 3,5-T₂ oder T₃ mit oder ohne Co-Inkubation von 1 μM PTU stimuliert (n=2-3, jeweils Triplikate) und die Konzentrationen von 3,5-T₂ (A,D), T₃ (B,E) und T₄ (C,F) im Zelllysate und im Überstand mittels LC MS/MS bestimmt (QTRAP®6500) (Dr. Daniel Rathmann bzw. Dr. Keith Richards).

Die Stimulation mit 3,5-T₂ oder T₃ führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des TH-Metaboliten T₀ im konditionierten Medium. Im Zelllysate konnte T₀ nicht detektiert werden (Abb. 33A und D). Die Inkubation mit 1 μM 3,5-T₂ bewirkte sowohl im Zelllysate als auch in den Zellkulturüberständen die Bildung von 3-T₁ werden. Für T₃ konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg von 3-T₁ nur im Überstand bestimmt werden (Abb. 33B und E). Die Hemmung der Dio1 durch PTU reduzierte sowohl die T₀ als auch die 3-T₁-Bildung im Zellkulturüberstand nach 3,5-T₂- (10 und

100 nM) und T₃ (100 nM) - Stimulation (Abb. 33D und E). Für 1 μM 3,5-T₂ konnte die PTU-vermittelte Reduktion der 3-T₁-Bildung auch im Zelllysats demonstriert werden (Abb. 33B). Diese Resultate lassen schlussfolgern, dass die Metabolisierung von 3,5-T₂ zu 3-T₁ und zu T₀ bzw. T₃ zu 3-T₁ und zu T₀ durch die Deiodierung an der 5. Position des Iodatoms erfolgte. Im Zellkulturüberstand konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg von 3,3'-T₂ nach T₃-Stimulation beobachtet werden (Abb. 33F). Die Co-Inkubation mit PTU hatte keinen Einfluss auf die 3,3'-T₂ Bildung und bestätigt die Annahme, dass die Dio3 hauptsächlich die Inaktivierung von T₃ zu 3,3'-T₂ katalysiert (siehe dazu Abb. 1).

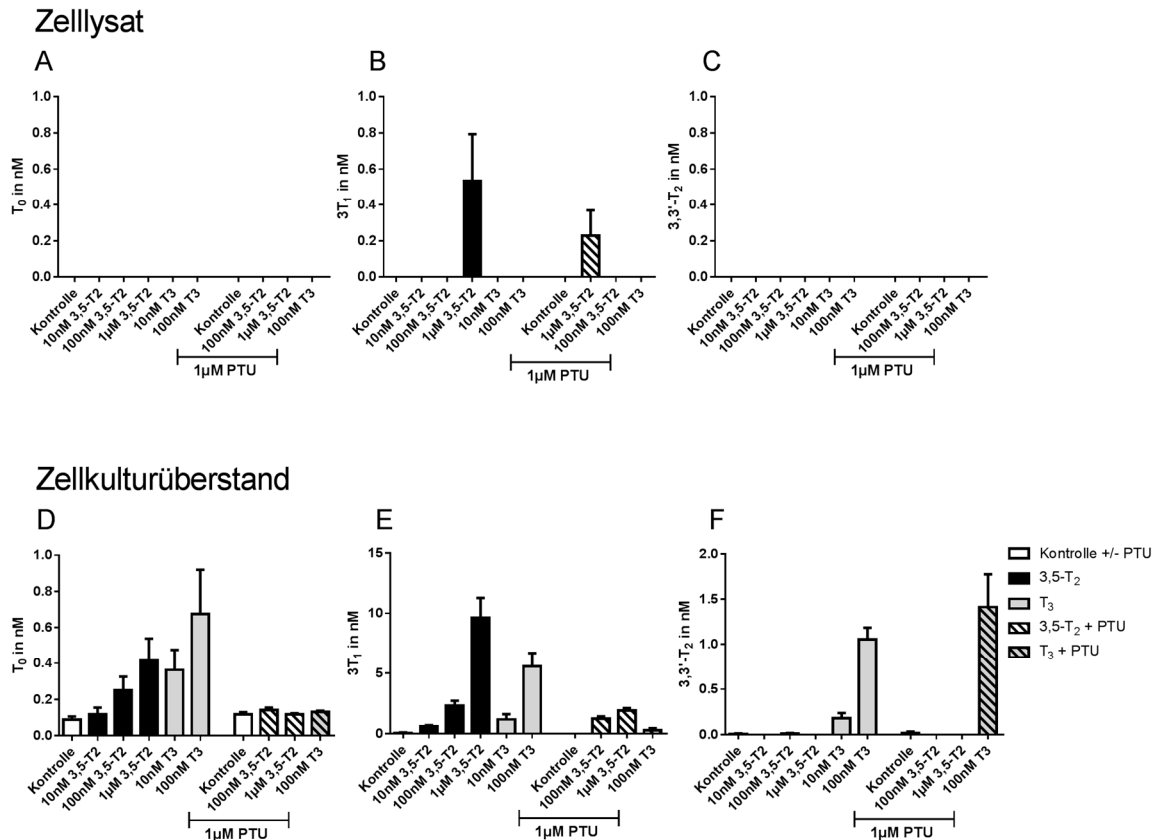


Abb. 33: Konzentration von T₀, 3-T₁ und 3,3'-T₂ im Zelllysats und im Zellkulturüberstand primärer Hepatozyten

Primäre Hepatozyten wurden 24 h mit 3,5-T₂ oder T₃ mit oder ohne Co-Inkubation von 1 μM PTU stimuliert (n=2-3, jeweils Triplikate) und die Konzentrationen von T₀ (A,D), 3-T₁ (B,E) und 3,3'-T₂ (C,F) im Zelllysats und im Überstand mittels LC MS/MS bestimmt (QTRAP@6500) (Dr. Daniel Rathmann bzw. Dr. Keith Richards).

5 Diskussion

In Anbetracht der weltweit steigenden Anzahl adipöser Menschen stehen effektive therapeutische Maßnahmen ohne unerwünschte Nebenwirkungen zur Verminderung der Nahrungszufuhr und/oder Steigerung des Energieverbrauchs nach wie vor im Fokus der weltweiten Forschung (NCD-RisC 2016, Narayanaswami and Dvoskin 2017).

Der metabolisch aktive TH-Metabolit 3,5-T₂ wird als potentielle Substanz zur Behandlung von Adipositas und assoziierten Begleiterkrankungen diskutiert. Interventionsstudien in Ratten demonstrieren eine gewichtsreduzierende und anti-lipidämische bzw. anti-steatotische Wirkung von 3,5-T₂ ohne die für TH bekannten thyromimetischen Begleiterscheinungen.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von 3,5-T₂ auf den Energiestoffwechsel, die Schilddrüsenhormonachse und insbesondere auf Veränderungen des hepatischen Metabolismus in Mäusen mit einer von Geburt an Diät-induzierten Adipositas untersucht und die Ergebnisse selektiv mit denen von normalgewichtigen Tieren verglichen. Die gewonnenen und nachfolgend diskutierten Ergebnisse lassen erkennen, dass 3,5-T₂ positive Effekte auf den Energie- und Fettstoffwechsel ausübt, jedoch auch mit der HPT-Achse und dem hepatischen Fremdstoff- und Steroidmetabolismus interferiert.

5.1 Bewertung des Mausmodells und der Dosiswahl von 3,5-T₂ und T₃ anhand des metabolischen Phänotyps

Ausgangspunkt für die Etablierung des untersuchten Mausmodells mit Diät-induzierter Adipositas am *DIfE* waren die im Rahmen der „Maintain-Studie“ angestrebten Untersuchungen zur Erhaltung des Körpergewichts und Verbesserung der metabolischen Funktion nach Gewichtsreduktion der HFD-Mäuse durch den Einsatz von TH-Metaboliten. In publizierten Studien führte die Verabreichung einer hochkalorischen Diät *ad libitum* in C57/BL6J-Mäusen über einen längeren Zeitraum zu einer starken Erhöhung des Körpergewichts und Veränderung metabolischer Parameter (Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Fettakkumulation und Hypercholesterinämie) (Lin et al. 2000, Collins et al. 2004, Gallou-Kabani et al. 2007) und zählt zum Goldstandard des Diät-induzierten Adipositas (DIO)-Modells (Reuter 2007). Der direkte Vergleich zwischen den untersuchten HFD- und SD-Mäusen vor Versuchsbeginn zeigte eindeutige Unterschiede in der Körperfettzusammensetzung (Tab. 29), vergleichbar mit den in der Literatur publizierten Daten (Gallou-Kabani et al. 2007, Rendina-Ruedy et al. 2015).

Tab. 29: Körpergewicht- und zusammensetzung der Mäuse vor Beginn des 28-tägigen Versuchs
Daten wurden im Rahmen der Maintain-Studie (Dr. W. Jonas, F. Wohlgemuth) erhoben.

Parameter	Mäuse unter SD	Mäuse unter HFD
Körpergewicht [g]	30,3 ± 2,3	48,9 ± 2,9
Fettfreie Masse [%]	85,1 ± 2,7	57,5 ± 3,1
Körperfettmasse [%]	9,9 ± 3,0	34,9 ± 3,3

Dementsprechend war das gewählte Mausmodell, bei denen C57BL/6J-Mäuse nach Absetzen über 20 Wochen eine HFD *ad libitum* erhielten, geeignet um die Wirkung von 3,5-T₂ als therapeutisches Mittel gegen Adipositas und deren Begleitsymptome zu untersuchen.

Primäres Ziel der 3,5-T₂-Intervention war die Gewichtsreduktion und positive Beeinflussung des metabolischen Phänotyps in den HFD-Mäusen. Die Intervention mit 0,25 µg/g Körpergewicht (nachfolgend nur als µg/g dargestellt) als auch 2,5 µg/g 3,5-T₂ für 14 bzw. 28 d bewirkte keine Änderung des Körpergewichts in den adipösen Tieren (Tab. 30).

In Mäusen des Stammes C57BL/6 wurde ebenfalls keine Auswirkung auf das Gewicht nach einwöchiger oraler Verabreichung von 1,25 und 12,5 µg/g 3,5-T₂ mittels Sonde beobachtet, wenn diese vorab eine Woche lang mit einer HFD gefüttert wurden (Goldberg et al. 2012). In einer kürzlich erschienenen Studie zeigte Teixeira et al. erstmalig in C57BL/6-Mäusen, die vorher eine achtwöchige HFD erhielten, eine Reduktion des Körpergewichts nach einer vierwöchigen *i.p.* Behandlung mit 12,5 µg/g 3,5-T₂, nicht jedoch mit 1,25 µg/g 3,5-T₂ (Teixeira et al. 2016). Die Daten signalisieren, dass Applikationszeitraum und -form entscheidende Faktoren für die 3,5-T₂-vermittelte Änderung des Körpergewichts im adipösen, murinen Modell sein können. Die Bioverfügbarkeit von 3,5-T₂ nach oralem Verabreichungsweg könnte durch einen ausgeprägten First-Pass-Effekt der Leber deutlich reduziert sein (Kwan 1997). In C57BL/6-Mäusen wurde indes zwischen oraler und intraperitonealer Applikation von T₄ hinsichtlich der Induktion einer chronischen Hyperthyreose kein Unterschied festgestellt (Engels et al. 2016). Vergleichbare Untersuchungen mit 3,5-T₂ liegen bis dato nicht vor.

Hinsichtlich der T₃-Gruppe wurde das Ziel erreicht eine Dosis (0,03 µg/g) zu applizieren, die keine Änderung der T₃-Serumkonzentration hervorrief, in der Peripherie jedoch Effekte auf den Energiestoffwechsel ausübte und dementsprechend als thyromimetische Kontrollgruppe diente. Vergleichbar mit 2,5 µg/g 3,5-T₂ konnte die 83-fach geringere T₃-Konzentration nach vierwöchiger Behandlung keine Änderung des Körpergewichts in HFD-Mäusen erzielen (Tab. 30).

Das Körpergewicht wird durch das Zusammenspiel von Energieaufnahme und -abgabe reguliert, wobei der Energieverbrauch insbesondere durch die körperliche Aktivität und den Gesamtenergieumsatz bestimmt wird.

TH erhöhen den Energieumsatz und fördern die Thermogenese. Die daraus resultierende negative Energiebilanz kann zu einer Abnahme der Energiespeicher führen. Um das Körpergewicht stabil zu halten kommt es zu Kompensationsmechanismen, die zu einer Hyperphagie und gesteigerten Appetit führen können (Luo and MacLean 2003). Sowohl in Menschen als auch in Nagetieren hat eine Änderung des Schilddrüsenhormonstatus Auswirkungen auf das Appetit- und Essverhalten (Pijl et al. 2001, González et al. 2012). Der orexigene Effekt von TH wird insbesondere durch die Regulation des hypothalamischen Neuropeptidsystems und die Beteiligung der Serin/Threonin-Kinase mammalian Target of rapamycin (mTor) vermittelt. In hyperthyreoten Ratten wurden die Orexigene des Agouti-related Protein (AgRP) und des Neuropeptids Y (NPY) vermehrt exprimiert, während das Anorexigen Proopiomelanocortin (POMC) vermindert war (Varela et al. 2012). Weitere Faktoren, die zentral die

DISKUSSION

Energieaufnahme und Sättigungssignale im Gehirn steuern und durch den TH-Status beeinflusst werden, sind UCP2 und Dio2 (Kong et al. 2004, Coppola et al. 2007).

Dementsprechend könnte die ausgebliebene Gewichtsreduktion nach der Behandlung mit T₃ und 3,5-T₂ aus der gesteigerten Futterraufnahme resultieren, die bereits nach 14 d zu beobachten war (Tab. 30).

Tab. 30: Metabolische Parameter nach 14- bzw. 28-tägiger Intervention in HFD-Mäusen

Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. W. Jonas (DIfE, Abteilung exp. Diabetologie) zur Verfügung gestellt und sind in Auszügen publiziert (Jonas et al. 2015). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe bei *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis Test bzw. Mann-Whitney Test). Nicht durchgeführte Analysen sind mit – gekennzeichnet.

	Mäuse unter Hochfettdiät (HFD)	Versuchsdauer 14 Tage			Versuchsdauer 28 Tage		
		Kontrolle	0,25 µg/g 3,5-T ₂	0,03 µg/g T ₃	2,5 µg/g 3,5-T ₂	Kontrolle	2,5 µg/g 3,5-T ₂
	Körpergewicht in g	49,5 ± 1	51,1 ± 1	47,9 ± 1	50,7 ± 1	47,6 ± 3	48,4 ± 3
	Futterraufnahme [kJ/14 bzw. 28 d]	840 ± 24	880 ± 24	995 ± 47*	1033 ± 23**	1680 ± 58	2073 ± 57***
	Gesamtenergieumsatz [kJ/d]	-	-	-	-	64,3 ± 1,6	72,3 ± 0,5***
	Körpertemperatur [°C]	35,3 ± 0,2	35,8 ± 0,2	36,3 ± 0,1**	35,9 ± 0,1	36,6 ± 0,1	37,3 ± 0,1**
	Fettfreie Masse [%]	58,7 ± 0,9	58,3 ± 0,4	64,9 ± 0,9***	63,1 ± 0,8**	58,1 ± 4,4	63,3 ± 2,3
	Körperfettmasse [%]	34,8 ± 1,1	35,3 ± 0,7	27,7 ± 0,9***	30,3 ± 0,8**	35,6 ± 4,9	29,8 ± 2,3*
Serum	Triglyceride [µg/ml]	552 ± 55	590 ± 29	415 ± 33	472 ± 46	80 ± 7,3	97,0 ± 12,1
	Freie Fettsäuren [mM]	0,46 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,51 ± 0,01	0,65 ± 0,04	0,68 ± 0,04
	Gesamt-Cholesterin [mg/dl]	200 ± 10	188 ± 11	81 ± 5***	116 ± 11*	181 ± 7	104 ± 8***
	Leptin [ng/ml]	12,3 ± 0,5	11,8 ± 0,7	5,3 ± 0,3**	7,2 ± 0,6*	-	-
	Insulin [pg/ml]	6853 ± 876	5150 ± 1443	10372 ± 1515	6861 ± 891	5603 ± 881	5913 ± 1790
Leber	Triglyceride [µg/g Protein]	1,6 ± 0,04	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1*	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,4	0,7 ± 0,05*
	Citrat-Synthaseaktivität [µmol*min ⁻¹ *mg ⁻¹]	724 ± 45	669 ± 34	1031 ± 50***	1065 ± 43***	700 ± 30	1024 ± 36***

Entsprechend den Effekten von TH, die wärmeproduzierende Prozesse fördern und die Thermogenese regulieren (Silva 2006), steigerte auch 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD den Gesamtenergieumsatz und erhöhte die Körpertemperatur nach vierwöchiger Applikation.

Vergleichbar mit den Literaturdaten konnte die NMR-Analyse in 3,5-T₂- und T₃ behandelten Mäusen eine Reduktion der Fettgewebmasse und eine Steigerung der fettfreien Masse verzeichnen (Tab. 30). TH kontrollieren auf verschiedenen Ebenen die Lipidhomöostase im Organismus. Insbesondere in den Zielgeweben Fett, Muskel und Leber beeinflussen sie die mitochondriale β-Oxidation, stimulieren den

Umsatz und die Aufnahme freier Fettsäuren, erhöhen die hepatische Triglyceridsynthese und regulieren den Cholesterinstoffwechsel (Oh and Kaplan 1994, Vergani 2014). Vergleichbar mit der Wirkung von T_3 , reduzierte 2,5 $\mu\text{g/g}$ 3,5- T_2 die Cholesterinkonzentration im Serum und den hepatischen Triglyceridgehalt nach vierwöchiger Intervention (Tab. 30). Sowohl Teixeira et al., als auch Goldberg et al. konnten diese Veränderung der Körperfettzusammensetzung in Mäusen mit der hohen Konzentration von 12,5 $\mu\text{g/g}$ 3,5- T_2 erreichen, nicht aber mit 1,25 $\mu\text{g/g}$ (Goldberg et al. 2012, Teixeira et al. 2016).

Die Gruppe um Fernando Goglia zeigte in 8-Wochen alten Ratten des Stammes Wistar eine entsprechende lipid- und cholesterinsenkende Wirkung, wenn diese simultan zu einer HFD meist über einen Zeitraum von vier Wochen 0,25 $\mu\text{g/g}$ 3,5- T_2 täglich *i.p.* injiziert bekamen (Lanni et al. 2005, Moreno et al. 2011). Die Wirkung von 3,5- T_2 auf den metabolischen Phänotyp ist demnach sowohl von der Wahl des Versuchsmodells, als auch der gegebenen Dosis abhängig.

Die publizierten Studien in Ratten hatten insbesondere das Bestreben, präventiv eine sich entwickelnde Adipositas und deren Begleiterkrankungen mit 3,5- T_2 zu verhindern (Lanni et al. 2005, Mollica et al. 2009, Moreno et al. 2011). Im Gegensatz dazu wies die vorliegende Arbeit das Ziel auf, eine bereits bestehende Adipositas therapeutisch mit 3,5- T_2 zu behandeln. Für ersteres Modell zeigte sich in Abhängigkeit der Spezies, dass 3,5- T_2 in adipösen Mäusen nur mit hohen Konzentrationen eine Änderung des metabolischen Phänotyps hervorrufen konnte (12,5 $\mu\text{g/g}$) (Goldberg et al. 2012, Teixeira et al. 2016). Demgegenüber erzielte in HFD-Wistarratten bereits die tägliche Gabe von 0,25 $\mu\text{g/g}$ 3,5- T_2 metabolische Veränderungen nach 6h (de Lange et al. 2011).

In dieser Arbeit hatte die geringe Dosis von 0,25 $\mu\text{g/g}$ 3,5- T_2 keine Auswirkung auf verschiedene Parameter des Energiestoffwechsels (Tab. 30). Spezies- als auch stammesabhängige Unterschiede, die mit einer unterschiedlichen Suszeptibilität gegenüber der Exposition einer HFD einhergehen, könnten eine Erklärung für diese Diskrepanzen der 3,5- T_2 - Wirkung sein.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass sowohl das untersuchte Mausmodell mit Diät-induzierter Adipositas, als auch die gewählte Dosis mit 2,5 $\mu\text{g/g}$ 3,5- T_2 bei einer Behandlungsdauer von 4 Wochen die Körperzusammensetzung in Richtung Reduktion der Fettmasse positiv veränderte, auch wenn eine Gewichtsreduktion aufgrund möglicher kompensatorischer Mechanismen ausblieb.

5.2 Wirkung von 3,5- T_2 auf die Expression TH-responsiver Gene und auf den Mitochondrienstoffwechsel in der Leber

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan ist einer der Hauptwirkungsorte von TH hinsichtlich des Energiestoffwechsels. Der Wirkmechanismus von T_3 in der Leber wird hierbei vor allem durch den kanonischen nukleären T_3 -Rezeptor-Signalweg vermittelt (Forrest and Vennstrom 2000). Die Regulation der Expression T_3 -responsiver Zielgene, die beinahe 8 % der gesamten Proteine in der Leber codieren und im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel wie auch im mitochondrialen Stoffwechsel funktional involviert sind, spielt eine bedeutende Rolle in der Energiehomöostase des Organismus

(Bassett et al. 2003, Weitzel and Iwen 2011). Im Kontext dieser Arbeit war es demnach von besonderem Interesse, Änderungen des hepatischen Genexpressionsprofils nach 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter HFD zu untersuchen und sie mit den Effekten von T₃ zu vergleichen. Exemplarisch wurden jeweils ausgewählte Parameter und Expressionsmuster TH-responsiver Zielgene des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels sowie des mitochondrialen Stoffwechsels untersucht. Der Protein- und Intermediärstoffwechsel wurde im Kontext dieser Arbeit nicht näher beleuchtet.

Im Hinblick auf den hepatischen Fettstoffwechsel veränderte T₃ nur selektiv die Expressionmuster ausgewählter lipogener und lipolytischer Gene (Abb. 9). Entsprechend der Triglyceridreduktion in der Leber T₃-behandelter Mäuse unter HFD (Tab. 30) verringerte sich die Transkriptmenge der *Scd 1*, Schlüsselenzym der Biosynthese einfach ungesättigter Fettsäuren. Die in der Leber stark exprimierte Malat-Dehydrogenase des Zytosol (*Me1*), welche durch T₃ hochreguliert wurde, ist an der Bereitstellung von NADPH für die Fettsäuresynthese beteiligt und im Citratzyklus involviert. Für *Scd1* identifizierte Waters et al. ein negatives TRE im proximalen Promoter des murinen Gens (Waters et al. 1997) und für *Me1* wurde spezieübergreifend ein TRE in der Promoterregion nachgewiesen (Mariash et al. 1980, Petty et al. 1990, Gonzalez-Manchon et al. 1997).

Dementsprechend kann hier ein Zusammenhang zwischen den molekularen TRE-vermittelten Änderungen auf Genexpressionsebene und der Regulation funktioneller Parameter (Triglyceridgehalt und Citratsynthaseaktivität (Tab. 30)) in der Leber hergestellt werden.

Es konnte keine Expressionsregulation von *Thrsp* (auch Spot 14 genannt) oder weiterer TH-responsiver Gene nach T₃-Behandlung detektiert werden (Abb. 9). *Thrsp* gilt als TH-responsives Gen, dessen Expression binnen weniger h durch T₃ reguliert werden kann (Seelig et al. 1981, Jump et al. 1984, Feng et al. 2000). Ein direkter Zusammenhang in Ratten konnte durch die Identifizierung von TREs in Regionen 2700 bp upstream des Transkription-Starts gefunden werden (Zilz et al. 1990). *Thrsp* ist insbesondere an der Regulation der Liponeogenese beteiligt und steht eng im Zusammenhang mit dem hepatischen Fettstoffwechsel.

Die Existenz einer steatotischen Leber, wie sie höchstwahrscheinlich im HFD-Versuchsmodell vorlag, erhöhte die Expression der *Thrsp* mRNA (Wu et al. 2013). Der erwartete, aber nicht eingetretene Effekt der T₃-Behandlung auf die Expression von *Thrsp* könnte demnach dadurch unterbunden worden sein und eine Erklärung für die schwache Wirkung von T₃ auf das *Thrsp*-Expressionsmuster und weiterer untersuchter TH-responsiver Gene des Lipidstoffwechsels geben. Vergleichbar mit der T₃-Gruppe zeigten auch die Mäuse nach Behandlung mit 3,5-T₂ nur eine schwache Wirkung auf die Genexpression lipogener und lipolytischer Enzyme (Abb. 9).

In Leberextrakten hypothyreoter Ratten steigerte 3,5-T₂ und T₃ die mRNA und Aktivität von Me1. Für eine gleichwertige Induktion des Transkripts musste jedoch eine etwa 100-fach höhere Konzentration von 3,5-T₂ im Vergleich zu T₃ eingesetzt werden, begründet durch eine geringere Bindungsaffinität von 3,5-T₂ am TR (Horst et al. 1989, Ball et al. 1997, Lombardi et al. 2000). Darüber hinaus stellten Lombardi et al. fest, dass ein signifikanter Effekt auf die Me1-Aktivität nach T₃-Gabe bereits nach 24

h, bei 3,5-T₂ jedoch erst nach 48 h auftrat. Die Stimulation konnte durch Hemmung der Proteinbiosynthese mittels Actinomycin D unterdrückt werden und spricht für einen genomischen Effekt von 3,5-T₂ (Lombardi et al. 2000), welcher auch in der vorliegenden Arbeit, bei Betrachtung der erhöhten Me1-Expression nach 3,5-T₂-Behandlung, vorliegen könnte.

In der Leber ist vor allem der TR β dominant exprimiert und kontrolliert auf transkriptioneller aber auch post-transkriptioneller Ebene Energie- und Fettstoffwechsel (Cheng et al. 2010, Zhu and Cheng 2010). TR β 1, dessen lange Isoform (L-Trb1) in Knochenfischen durch 3,5-T₂ aktiviert wurde, wäre demnach ein potentieller Kandidat, um die genomischen Effekte von 3,5-T₂ mechanistisch zu erklären (Orozco et al. 2014). Erst kürzlich konnten die Autoren das Protein Jun activation domain-binding protein (Jab1) identifizieren welches als Coaktivator die 3,5-T₂-abhängige Transaktivierung des L-Trb1 sowie der humanen TR β 1 Variante (hTRB1) fördert. Im Gegensatz dazu hatte die Stimulation mit T₃ keinen Einfluss auf die Transaktivierung des L-Trb1. Es konnte jedoch eine Corepressoraktivität von Jab1 nach Bindung von T₃ an die kurze Isoform des TR β (S-Trb1) beobachtet werden (Hernandez-Puga et al. 2017). In Nagetieren könnte ebenfalls ein Set an Coregulatoren, welches durch 3,5-T₂ spezifisch und unabhängig von T₃ rekrutiert wird, die Genexpression über den TR β -abhängigen Signalweg regulieren. Aktuelle Untersuchungen dazu stehen bisher jedoch aus.

T₃ reguliert TR-vermittelt direkt die Transkription der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Glukoneogenese *Pepck* (*Pck1*) und *G6pc* (Park et al. 1999, Suh et al. 2013). Die Ergebnisse der Arbeit konnten keine Regulation dieser Gene durch 0,03 μ g/g T₃ zeigen, jedoch wurde *G6pc* durch 2,5 μ g/g 3,5-T₂ hochreguliert. Die Injektion von 0,25 μ g/g 3,5-T₂ in Ratten unter HFD verbesserte die Glucosetoleranz und Insulinsensitivität und beeinflusste darüber hinaus Enzyme des Glucosestoffwechsels (Lombardi et al. 2009, de Lange et al. 2011, Moreno et al. 2011). Im Gegensatz dazu konnte Vatner et al. im gleichen Tiermodell und gleicher Dosis keine Änderung der Glucose- und Insulinwerte nach 3,5-T₂-Applikation beobachten und nur einen leichten Trend hin zu einer verbesserten Insulinsensitivität verzeichnen (Vatner et al. 2015).

Ein Zusammenhang zwischen Insulin- und Glucosestoffwechsel und 3,5-T₂, wie er in einem euthyreoten Kollektiv der SHIP-Trendstudie beobachtet wurde (Pietzner et al. 2015b), konnte im vorliegenden Versuch nicht gezeigt werden. Die Insulinkonzentration war nach der 3,5-T₂-Behandlung gleichbleibend (Tab. 30).

Die Veränderung des Energieumsatzes durch TH wird insbesondere durch die Modulation mitochondrialer Stoffwechselprozesse gesteuert, denn 90 % der produzierten ATP-Menge wird durch die oxidative Phosphorylierung bereitgestellt (Harper and Seifert 2008).

In den HFD-Mäusen konnte sowohl die hohe Dosis 3,5-T₂ als auch T₃ die Expression des TH responsiven Gens *Nrf1* stimulieren, ein essentieller Faktor der mitochondrialen Biogenese (Huo and Scarpulla 2001, Weitzel et al. 2001). Die Expression weiterer mitochondrialer, TH-responsiver Marker (*Tfam*, *Cpt1a*, *Pgc1a*) wurde durch T₃ und 3,5-T₂ nicht reguliert, jedoch erhöhte 3,5-T₂ die Proteinexpression von Cyt C.

Die nicht in sich konsistenten Ergebnisse hinsichtlich des mitochondrialen Stoffwechsels könnten durch eine bereits im hepatosteatotischen Modell vorliegende metabolische Veränderung erklärt werden. Fettsäureakkumulation in der Leber kann zur Steigerung der mitochondrialen Biosynthese und Expression mitochondrialer Proteine führen (Guo et al. 2013). Diese Effekte können möglicherweise durch einen potentiell thyromimetischen Liganden wie 3,5-T₂ nicht weiter verstärkt werden.

In der Literatur wurde indes beschrieben, dass die chronische Gabe von 3,5-T₂ in hypothyreoten (0,1 µg/g) oder HFD-gefütterten Ratten (0,25 µg/g) die hepatische COX-Aktivität (Lanni et al. 1996, Silvestri et al. 2010) steigerte, ein Maß für die oxidative Kapazität und mitochondriale Atmung. Darüber hinaus bindet 3,5-T₂ direkt an der Untereinheit Va der Cytochrom C Oxidase und verhindert die allosterische Hemmung der COX-Aktivität durch ein erhöhtes ATP/ADP Verhältnis (Goglia et al. 1994, Arnold et al. 1998).

In isolierten Mitochondrien des Skelettmuskels hypothyreoter Ratten führte 0,25 µg/g 3,5-T₂ bereits nach 1 h zu einer gesteigerten Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette (Lombardi et al. 2007, Lombardi et al. 2009). Dieser Effekt konnte auch in Mitochondrien aus Leberhomogenaten hypothyreoter Ratten nach akuter Injektion (Cavallo et al. 2011) und nach einwöchiger Gabe von 3,5-T₂ (Mangiullo et al. 2010) gezeigt werden. In beiden Versuchen bewirkte 3,5-T₂ zudem eine gesteigerte Aktivität der mitochondrialen ATP Synthase (Komplex V) und die State 3 als auch die State 4 Atmung, Indikatoren für Kopplung und Entkopplung der Atmungskette, wurden durch akute und chronische Gabe von 3,5-T₂ im hypothyreoten Modell signifikant erhöht.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die 24-stündige Behandlung mit 3,5-T₂ in primären Hepatozyten eine gesteigerte ATP-Produktion und eine Reduktion der Proton Leak, Maß für die partielle Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, hervorrief. Im Zusammenhang mit der *ex vivo* gesteigerten hepatischen Citratsynthaseaktivität (Tab. 30), dem Schrittmacher des Citrat-Zyklus (Reisch and Elpeleg 2007) und der erhöhten Expression von *Gpd2* (Abb. 9) und Cyt C (Abb. 10), Elektronencarrier der mitochondrialen Atmungskette (Kadenbach et al. 2000, Rauchova et al. 2011, Mráček et al. 2013), weisen diese Effekte auf eine vermehrte Energiebereitstellung durch Stimulation des Citrat-Zyklus und der mitochondrialen Atmungskette nach 3,5-T₂-Behandlung hin.

Die potentiell gesteigerte Thermogenese einhergehend mit einer erhöhten Körpertemperatur (Tab. 30) nach 3,5-T₂ bzw. T₃-Gabe in Mäusen unter HFD würde eine gesteigerte Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese mit resultierender Wärmeproduktion vermuten lassen, wie sie für TH und auch 3,5-T₂ bereits beschrieben wurde (siehe Reviews (Cioffi et al. 2013, Yehuda-Shnaidman et al. 2013)). Analysen im Skelettmuskel und braunem Fettgewebe der 3,5-T₂-behandelten Tiere hinsichtlich der Expression von Entkopplungsproteinen (UCP1, UCP3) sowie weitere Untersuchungen der Sauerstoffverbrauchsrate mittels Seahorse XF Analyzer in den genannten Zelltypen würden diesbezüglich weitere Hinweise geben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass 3,5-T₂ in der Leber von Mäusen mit Diät-induzierter Adipositas die Expressionsmuster TH-responsiver Gene modifiziert, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind und die Effekte partiell mit denen der 83-fach geringeren T₃-Dosis überlappen. Eine potentielle Beteiligung des TR-Signalweges an der Regulation der Transkriptionsmaschinerie kann dabei angenommen werden. In Anbetracht der starken Akkumulation in der Leber kann die Wirkung von 3,5-T₂ auf die untersuchten Parameter des hepatischen Energiestoffwechsels als relativ schwach eingestuft werden.

Vor dem Hintergrund der Diät-induzierten Adipositas und der damit einhergehenden hepatischen Fettakkumulation kann vermutet werden, dass in der Leber katabole Stoffwechselprozesse eingeleitet wurden, um kompensatorisch der Steatosebildung entgegen zu wirken. Daraus resultierende Änderungen der Genexpressionsmuster könnten dementsprechend durch 3,5-T₂ oder T₃ nicht weiter stimuliert oder gestoppt werden und eine Erklärung für die nur partiell beobachteten Effekte liefern.

5.3 Einfluss von 3,5-T₂ auf die Schilddrüsenhormonachse

Auf verschiedenen Ebenen konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse gezeigt werden, dass 3,5-T₂ vergleichbar mit T₃ sowohl in Mäusen unter HFD als auch unter SD eine Suppression der Schilddrüsenhormonachse bewirkte (Abb. 34).

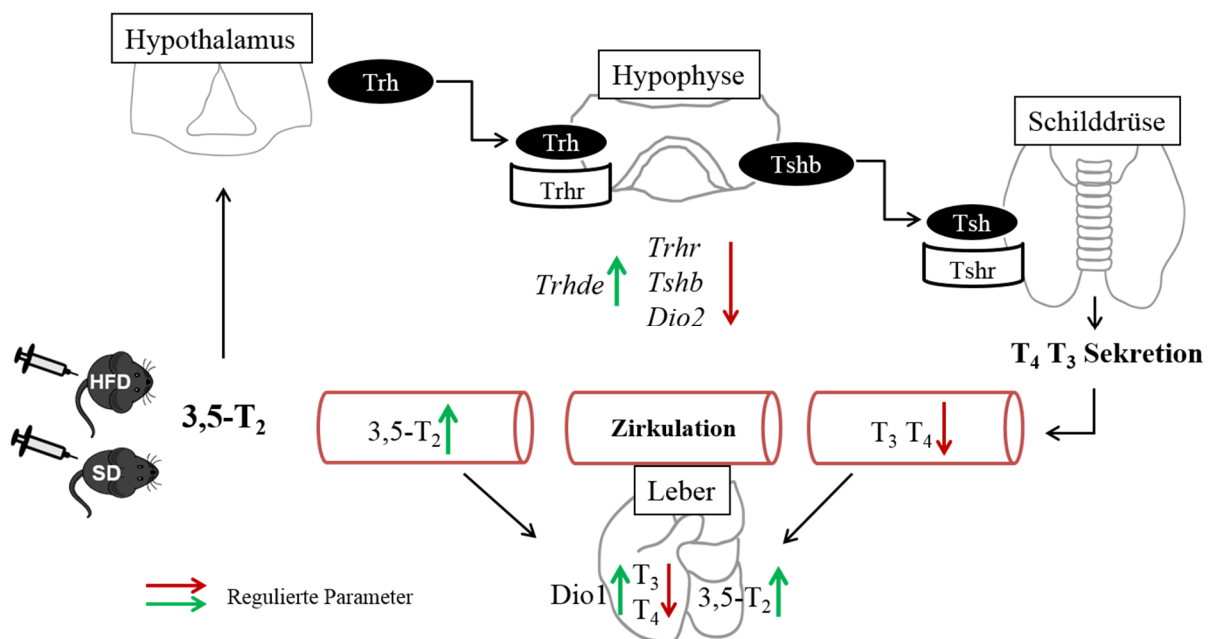


Abb. 34: Schematische Darstellung der Suppression der Schilddrüsenhormonachse nach 3,5-T₂-Behandlung

Die signifikanten Änderungen gemessener Parameter in der Hypophyse (Genexpression mittels qPCR), im Serum und in der Leber (TH-Konzentration mittels LC-MS/MS, Dio1 mittels nicht-radioaktivem Aktivitätsassay) nach zwei bzw. vierwöchiger Behandlung mit 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD und SD werden durch grüne und rote Pfeile angezeigt.

Grundlage des popularisierten Einsatzes von 3,5-T₂ als „anti-lipidämisches“ Gewichtsreduktionsmittel sind publizierte Daten, die eine antisteatotische und lipidsenkende Wirkung von 3,5-T₂ ohne Beeinflussung der HPT-Achse und kardiovaskulärer Parameter aufzeigen. Die dabei gewählte Dosis mit 0,25 µg/g in Ratten, welche vorher oder parallel zur Intervention eine HFD erhielten, veränderte nicht die Serumgehalte von fT₃, fT₄ und TSH (Lanni et al. 2005, Mollica et al. 2009, Moreno et al. 2011).

Im Gegensatz dazu konnte nach dreimonatiger Behandlung normalgewichtiger, 6 Monate alter Ratten mit 0,25 µg/g 3,5-T₂ eine Reduktion der T₃-, T₄- und TSH-Serumwerte festgestellt werden (Padron et al. 2014). Entsprechende Ergebnisse zeigten sich auch in früheren Studien nach 3,5-T₂ Gabe (> 0,2 µg/g) in hypo- und euthyreoten Ratten, welche vergleichbar waren mit einer etwa 100-fach geringeren T₃-Injektion (Horst et al. 1995, Ball et al. 1997, Moreno et al. 1998). Auch in Mäusen unter HFD bewirkte 1,25 µg/g 3,5-T₂ eine Suppression des Serum-TSH und -T₄ (Goldberg et al. 2012, Teixeira et al. 2016).

Der Effekt von 3,5-T₂ auf die TSH-Sekretion und entsprechender Wirkung auf die TH-Produktion könnte zum einen indirekt durch die Beeinflussung der hypothalamischen TRH-Sekretion oder zum anderen durch eine direkte Wirkung auf die TSH-Genexpression in der Hypophyse erklärt werden. Everts et al. zeigte in primären Rattenhypophysenzellen die Reduktion der TRH-stimulierten TSH-Freisetzung nach 3,5-T₂-Exposition, vergleichbar mit einer 100-fach geringeren T₃-Konzentration (Everts et al. 1995).

Die detektierten Änderungen der hypophysären Expression der TH-responsiven Gene nach 3,5-T₂-Gabe lassen vermuten, dass 3,5-T₂ eine direkte Wirkung auf transkriptioneller Ebene ausübte. Kompetitive Bindungs-Studien konnten zeigen, dass 3,5-T₂ die Fähigkeit besitzt, jedoch mit einer bis zu 500-fach geringeren Affinität als T₃, am TR gebundenes radiomarkiertes T₃ zu verdrängen (Cheng et al. 1994, Ball et al. 1997). In Knochenfischen aktivierte 3,5-T₂ direkt als Ligand die lange Isoformvariante des TRβ1 und stimulierte die Bindung nukleärer Transkriptionsfaktoren an TREs (Garcia et al. 2007, Mendoza et al. 2013). In diesem Sinne könnte angenommen werden, dass 3,5-T₂ durch Bindung des Liganden/Rezeptorkomplexes an TREs im Promoterbereich des TSH eine negative Regulation bewirkte, wie sie auch für T₃ beschrieben wurde (Bodenner et al. 1991, Hollenberg et al. 1995).

Im Gegensatz zu den relativ schwach ausgeprägten Ergebnissen der Expression TH-responsiver Gene in der Leber der adipösen Mäuse nach 3,5-T₂- und T₃-Behandlung konnten auf hypophysärer Ebene unabhängig vom Diät-Modell bedeutende Effekte beobachtet werden.

Das Adipokin Leptin spielt eine zentrale Rolle in der langfristigen Aufrechterhaltung der Energiebilanz. Es reguliert darüber hinaus auch die TSH-Sekretion und die Expression von TRH durch die direkte Wirkung über den Leptinrezeptor in TRH-Neuronen des hypothalamischen paraventriculären Nukleus oder indirekt über die Modulation von Neuropeptiden (Melanozyten-stimulierendes Hormon α (αMSH), NPY, AgRP) des Nukleus Arcuatus (Seoane et al. 2000, Mullur et al. 2014).

In normalgewichtigen Ratten aktivierte Leptin TRH-Neurone direkt oder indirekt via POMC und NPY/AgRP Neurone im Nukleus Arcuatus. Bei ausgeprägter Leptinresistenz im adipösen Modell wurde

nur der Stat3-abhängige direkte Signalweg aktiviert und die Produktion des TRH-Peptids im paraventriculären Nukleus des Hypothalamus durch Leptin stimuliert (Perello et al. 2010).

Vergleichbar mit der Wirkung von TH (Escobar-Morreale et al. 1997) verringerte sich im vorliegenden Versuch proportional zusammenhängend zur Körperfettmasse auch die Leptinkonzentration im Serum nach 3,5-T₂-Behandlung (Tab. 30). In euthyreoten Probanden wurde diesbezüglich eine negative Assoziation im Serum zwischen 3,5-T₂- und Leptingehalten festgestellt, höchstwahrscheinlich durch TSH vermittelt (Pietzner et al. 2015b). Abhängig vom Adipositasstatus könnte 3,5-T₂ durch diese zwei unterschiedlichen Signalwege indirekt über die Reduktion der Leptinspiegel die TRH-Sekretion hemmen. Die Erhöhung der hypophysären Expression des TRH-degradierenden Enzyms (*Trhde*) (Abb. 11) untermauert diese Vermutung. Weiterhin kann ein möglicher Zusammenhang zwischen der 3,5-T₂-Gabe und der Leptin-vermittelten Veränderung des Lipidstoffwechsels angenommen werden.

Inwieweit die Entwicklung einer Adipositas und die Aufnahme fettreicher, hochkalorischer Kost zu einer Modulation der TSH-Sekretion und TH-Serumkonzentrationen führen, um der positiven Energiebilanz entgegen zu wirken, konnte bisher in Mensch und Nagetieren nicht eindeutig dargelegt werden (Raboli and Martin 1977, Reinehr et al. 2008, Yang et al. 2016).

Der direkte Vergleich hinsichtlich der TH-Serumkonzentrationen in Mäusen unter HFD und SD ließ im vorliegenden Versuch diesbezüglich keine Unterschiede erkennen (Abb. 13). Es konnte jedoch eine Induktion der hepatischen Dio1-Aktivität in HFD-Mäusen im Vergleich zu SD-Mäusen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Araujo et al. begründete die erhöhte Dio1-Aktivität in der Leber im adipösen Modell mit einer gesteigerten Umwandlung von T₄ in inaktives rT₃ (Araujo et al. 2010, Araujo and Carvalho 2011). Darüber hinaus beobachtete Burger et al. in gesunden Männern unter hochkalorischer Diät einen geringeren Anstieg der 3,5-T₂-Konzentration im Serum nach 3,5-T₂-Infusion als in Probanden, die weniger Kalorien zu sich nahmen und begründete dies mit einer Diät-induzierten Erhöhung der Clearance (Burger et al. 1987).

Im hypothyreoten Modell, welches für Studien der 3,5-T₂-Wirkung oft genutzt wird, hatten die Tiere per se einen veränderten TH-Stoffwechsel. Je nach Versuchsdesign sind die Deiodase-Aktivitäten abhängig vom Einsatz der Thyreostatika (PTU, Iopansäure) verändert bzw. inhibiert und die Serum-T₃-Gehalte reduziert (Mariash et al. 1980, Lanni et al. 1995). Die Wirkung von 3,5-T₂ kann in diesem Modell, im Vergleich zu einem euthyreoten Zustand, hinsichtlich Energiestoffwechsel und Feedback-Regulation demnach unterschiedlich ausfallen. Die externe Gabe von 3,5-T₂ veränderte beispielsweise in hypothyreoten Ratten den Grundumsatz, dies wurde jedoch in euthyreoten Tieren nicht beobachtet (Moreno et al. 2002). Allgemein lässt sich feststellen, dass der Einsatz von 3,5-T₂, in Ratten üblich mit einer Dosis von 0,25 µg/g, je nach Wahl des Versuchsmodells (hypothyreot, euthyreot, adipös, normalgewichtig), der Dosis und der Spezies unterschiedliche Wirkung auf den Energiestoffwechsel und die Regulation der HPT-Achse haben kann (Abb. 35).





		Diät	Stoffwechsellage	Suppression der HPT-Achse	Effekt auf den Energiestoffwechsel
<u>Maus</u>		SD	euthyreot	+ ¹	? ¹
		SD	hypothyreot	Keine Daten	Keine Daten
		HFD	euthyreot	+ ^{1,2}	+ ^{1,2}
		HFD	hypothyreot	Keine Daten	Keine Daten
<u>Ratte</u>		SD	euthyreot	+ ⁴	- ³ + ⁴
		SD	hypothyreot	* ⁵ - +	* +
		HFD	euthyreot	* -	- ⁶ +*
		HFD	hypothyreot	Keine Daten	Keine Daten

Abb. 35: Übersicht der Effekte von 3,5-T₂ hinsichtlich einer Suppression der HPT-Achse und Wirkung auf den Energiestoffwechsel in verschiedenen Versuchsmodellen in Ratten und Mäusen

+ Regulation,- keine Regulation der HPT-Achse bzw. Energiestoffwechsel durch 3,5-T₂. Behandlungsdauer und Konzentrationen wurden aufgrund der vereinfachten Übersichtsdarstellung nicht abgebildet, jedoch in den zugehörigen Textpassagen erwähnt.¹ Daten aus vorliegender Arbeit bzw. (Jonas et al. 2015), Fragezeichen kennzeichnet bisher nicht erfasste Ergebnisse; ²(Goldberg et al. 2012, Teixeira et al. 2016); ³(Grasselli et al. 2012); ⁴ (Horst et al. 1995, Padron et al. 2014); ⁵(Ball et al. 1997, Moreno et al. 1998); ⁶(Vatner et al. 2015); * Literaturstellen in Reviews (Moreno et al. 2008, Goglia 2014).

Begründet werden könnte dies durch Speziesunterschiede hinsichtlich Metabolismus, Bindungseigenschaften und Exkretion von TH und deren Metabolite. Die TH-Bindungsproteine und -affinitäten sind beispielsweise speziesabhängig unterschiedlich ausgeprägt (Prapunpoj et al. 2000, Schreiber 2002). Weitere Einflussfaktoren auf die Wirkung von 3,5-T₂ hinsichtlich der negativen Feedback-Regulation könnten die bereits diskutierte Applikationsart, der Behandlungszeitraum und der Zeitpunkt zwischen letzter Injektion und Tötung sein.

5.4 Kardiale Effekte von 3,5-T₂

Die Überversorgung des Organismus mit klassischen TH kann zu einem thyreotoxischen Status führen, der sich durch erhöhte Serumkonzentrationen von T₃ und T₄ sowie supprimierte TSH-Werte und einer gesteigerten Herzrate und -masse auszeichnet (Bahn et al. 2011). Im Falle einer Hyperthyreose kann die Gewichtszunahme des Herzens 30-50 % betragen (Cohen et al. 1966, Klein and Hong 1986).

Vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen in Bezug auf die Herzgewichtszunahme in 3,5-T₂-behandelten Mäusen (Abb. 16) wurde in zwei weiteren Studien an Mäusen unter HFD ein Anstieg des absoluten bzw. relativen Herzgewichts um 23 % und 30 % nach Applikation von 1,25 µg/g bzw. 12,5 µg/g 3,5-T₂ beobachtet (Goldberg et al. 2012, Teixeira et al. 2016). Die relative Herzmasse in Ratten wurde durch 0,75 µg/g 3,5-T₂ um etwa 14 % erhöht, die überwiegend verwendete Dosis von 0,25 µg/g führte hingegen zu keiner Änderung des Herzgewichts (Moreno et al. 2011, Padron et al. 2014). Der spezies- und dosisabhängige Effekt von 3,5-T₂ auf das Herz deckt sich mit den Ergebnissen der HPT-

Achse (Abb. 34). Die thyromimetische Wirkung von 3,5-T₂ scheint in Mäusen bei gleicher Dosierung stärker ausgeprägt als in Ratten.

Im Zusammenhang mit der potentiellen thyromimetischen Wirkung von 3,5-T₂, die auf verschiedenen Ebenen (Hypophyse, Serum, Leber) untersucht wurde, stellte sich die Frage, inwieweit der TH-Metabolit die Expression klassischer kardialer TH-responsiver Gene moduliert.

Die exogene Gabe von TH und die daraus resultierende hyperthyreote Stoffwechsellaage führt im Allgemeinen zu einer Vergrößerung des Herzens basierend auf einer erhöhten Proteinbiosynthese, bezeichnet als kardiale Hypertrophie (Ojamaa 2010).

In diesem Zusammenhang muss man zwischen physiologischer und pathophysiologischer Hypertrophie differenzieren, die sich funktionell als auch strukturell unterscheiden.

Im physiologisch hypertrophierten Herz ist das Ventrikelvolumen sowie die Herzwand- und Septumdicke erhöht und es findet ein koordiniertes Längen- und Breitenwachstum der Herzmuskelzelle statt, mit einer normalen Anordnung der Myofibrillen (Maillet et al. 2013). Diese Entwicklung des Herzens findet während der postnatalen Phase des Herzwachstums sowie in der Schwangerschaft, bei Ausdauertraining (Sportlerherz) und bei einer mild verlaufenden Hyperthyreose statt. Sie ist mit einer normalen oder verbesserten kardialen Funktion gekennzeichnet (van Berlo et al. 2013).

Neben Wachstumsfaktoren (IGF1, VEGFB) sind insbesondere TH an der Regulation der spezifischen Signalwege und Ausbildung der Hypertrophie beteiligt. Über Tyrosinkinase-Rezeptoren (PI3K/AKT-Signalweg) und nukleäre Rezeptoren wird die Transkription, Synthese kontraktile Proteine und Proteine des Calciumhaushalts als auch des Energiestoffwechsels gesteuert (Dorn 2007). Charakteristisch für die physiologische Hypertrophie ist eine Steigerung der Transkription der Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (*Serca2*, *Atp2a2*) sowie Inhibition von Phospholamban (*Pln*). Durch vermehrten Ca²⁺-Einstrom ins sarkoplasmatische Retikulum nach dem Kontraktionsvorgang resultiert daraus eine erhöhte myokardiale Relaxation unter Beteiligung von Kaliumkanälen (z.B. *Kcne1*). Das Ca²⁺ liegt dementsprechend für eine erneute Ausschüttung durch Erregung über den Ryanodin-Rezeptor bereit (Vargas-Uricoechea et al. 2014).

Weiterhin kommt es zu einer Änderung der kontraktile Proteine mit verstärkter Transkription der adulten Isoform der schweren Kette des alpha-Myosins (MHC alpha, *Myh6*) und verringerter Expression der fetalen Isoform des beta-Myosins (MHC beta, *Myh7*). Dieser Expressionsshift hin zur adulten MHC-Isoform hat eine höhere ATPase-Aktivität zur Folge und trägt zur gesteigerten Kontraktilität der Herzmuskelfasern bei (Dillmann 1990, Kiss et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit waren die Expressionsmuster für *Serca2*, *Pln* und *Kcne1* im Herzgewebe der 3,5-T₂-behandelten HFD-Mäuse vergleichbar mit der klassischen Modulation der Gene nach T₃-Applikation oder bei hyperthyreoter Stoffwechsellaage (Tab. 31) (Klein and Ojamaa 2001, Le Bouter et al. 2003).

Tab. 31: Regulation der Expression TH-responsiver Gene nach 28-tägiger 3,5-T₂-Behandlung in Herzen von HFD-Mäusen im Vergleich zur klassischen T₃-Wirkung

Gen	Ergebnisse der Arbeit		Literaturergebnisse		
	Regulation	Expression durch 3,5-T ₂	Regulation	Expression durch T ₃	Referenz
<i>Atp2a2</i>		↑		↑	(Klein and Ojamaa 2001)
<i>Pln</i>		↓		↓	(Klein and Ojamaa 2001)
<i>Myh7</i>		↑		↓	(Dillmann 1990)
<i>Myh6</i>	-			↑	(Dillmann 1990)
<i>Kcne1</i>		↓		↓	(Le Bouter et al. 2003)

Knockout-Modelle von TR konnten zeigen, dass ein Großteil der TH-induzierten Gentranskription durch den TR α 1 vermittelt wurde, der prädominant in vaskulären Zellen exprimiert wird (Gloss et al. 2001, Macchia et al. 2001). Auch im untersuchten Herzgewebe und in den differenzierten H9c2-Zellen wurde vorherrschend TR α (*Thra*) detektiert. Der gering exprimierte TR β 1 spielt im Herzen vorwiegend bei einer hyperthyreoten Stoffwechsellage und pathologischer Hypertrophie eine Rolle und entfaltet hierbei seine Wirkung durch die Modulation der Genexpression, kardiovaskulärer Parameter (Herzrate) und Stimulation der Angiogenese (Swanson et al. 2003, Makino et al. 2009, Pantos et al. 2011, do Imperio et al. 2015).

Die Behandlung mit 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD änderte nicht die Transkriptmenge von TR α (*Thra*) und für TR β (*Thrb*) konnte keine Expression im Herzgewebe ermittelt werden. Anhand der Datenlage lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, ob 3,5-T₂ die Expression TH-responsiver Gene über den TR-vermittelten Signalweg reguliert. Spezifische Antikörper gegen TR α 1 zur Bestimmung der kardialen Proteinexpression sind derzeit nicht verfügbar.

Bis dato gibt es keine weiteren Untersuchungen zur Wirkung der chronischen Gabe von 3,5-T₂ auf das Herzgewebe und in Kardiomyozyten. Die 5-minütige Stimulation mit 10 nM 3,5-T₂, vergleichbar mit T₃, steigerte den Ionenstrom durch Natrium-Kanäle in primären neonatalen Myozyten (Huang et al. 1999). Die Effekte von 3,5-T₂ in Kardiomyozyten könnten demnach auch nicht-genomisch und sehr akut erfolgen, wie sie entsprechend für TH beschrieben wurden (Davis et al. 2016).

Durch die Erhebung funktioneller Parameter (Herzrate, systolischer und diastolischer Blutdruck, Ableitung eines Elektrokardiogramms) könnten genauere Aussagen zur sich entwickelnden Hypertrophie und der hämodynamischen Wirkung von 3,5-T₂ getroffen werden.

Speziesabhängig wurden regionale Unterschiede in der Expressionsstärke von *Pln* und *Serca2* sowie weiteren Ca²⁺-regulatorischen Proteinen zwischen Ventrikel und Atrium detektiert (Luss et al. 1999). Nachfolgende Versuche im Herzgewebe sollten diesen Faktor berücksichtigen.

Der Anstieg von *Myh7* und *Nppb* (BNP) nach 3,5-T₂-Behandlung in HFD-Mäusen gab einen Hinweis auf die Induktion des fetalen Genprogramms (FGP) und Remodelings des Herzgewebes, wie es bei einer pathologischen Hypertrophie beschrieben wird (Tab. 32).

Tab. 32: Regulation der Expression von Genen nach 28-tägiger 3,5-T₂-Behandlung in Herzen von HFD-Mäusen, die Marker für pathologisches Remodeling darstellen

Ergebnisse der Arbeit		Literaturergebnisse	
Gen	Regulation Expression durch 3,5-T ₂	Regulation bei pathologischem Remodeling	Referenz
<i>Myh7</i>	↑	↑	(Krenz and Robbins 2004)
<i>Nppb</i>	↑	↑	(Cox and Marsh 2014)
<i>Nppa</i>	-	↑	(Cox and Marsh 2014)

Diese ist gekennzeichnet durch eine gestörte Herzfunktion, einhergehend mit einer Reduktion der Wandspannung und Pumpfunktion des Herzens bis hin zum Herzversagen (van Berlo et al. 2013). Zahlreiche Faktoren können zur pathologischen Herzhypertrophie führen. Zu ihnen zählen pulmonale Hypertonie, Auftreten eines Herzinfarkts, koronare Herzerkrankungen, Myokarditis sowie diabetische Kardiomyopathie (Maillet et al. 2013). Allgemein kommt es zu einem pathologischen Remodeling des Herzgewebes mit interstitieller Fibrosierung, Einschränkung der systolischen und diastolischen Funktion und Induktion des FGP.

Die Regulation erfolgt dabei überwiegend über die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalwege (ERK1/2, p38 MAPK und JNK 1/2/3), stimuliert durch Angiotensin II, Endothelin 1 und Katecholamine. Weiterhin spielt auch der Calcium-Calcineurin-NFAT-Signalweg eine Rolle bei der Ausbildung der pathologischen Hypertrophie (van Berlo et al. 2013).

Die natriuretischen Peptide ANP und BNP sind sowohl im Tiermodell als auch bei humanen Erkrankungen Marker für die Entwicklung einer Kardiomyopathie. Sie werden vom Myokard sezerniert und können im Blutplasma quantitativ nachgewiesen werden. Die Messung der ANP- und BNP-Plasmaspiegel in den 3,5-T₂-behandelten Mäusen würde dementsprechend weitere Rückschlüsse auf die pathologische Veränderung des Herzgewebes und auf die Aktivierung des FGP geben, denn insbesondere der Anstieg von BNP im Plasma ist ein prognostischer Wert eines erhöhten Risikos für Herzversagen (Ghatpande et al. 1999, Nishikimi et al. 2011, Beltrami et al. 2016).

Ein weiterer Marker für die Induktion des FGP ist die vermehrte Transkription von skeletal α -Aktin (*Acta1/2*) im adulten Herz, welches typischerweise im embryonalen Herz exprimiert wird (Driesen et al. 2009). Im Gegensatz dazu ist cardiac α -Aktin (*Actc1*) überwiegend im adulten Herz vorzufinden und die gesteigerte Expression gilt als Hypertrophiemarker (Mayer et al. 1984, Chien et al. 1991).

Die Aktin-Familie besteht aus mehreren Isoformen, deren Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt identisch sind. Die Aminosäuresequenzen sind für skeletal α -Aktin und cardiac α -Aktin in Mäuseherzen

nahezu identisch (Vandekerckhove et al. 1986, Perrin and Ervasti 2010). Aus diesem Grund konnten für die Quantifizierung der Transkriptmengen mittels qPCR keine geeigneten Primerpaare entwickelt bzw. aus der Literatur übernommen werden, die spezifisch die einzelnen Aktin-Isoformen detektierten. Die Ergebnisse der qPCR für *Actc1* im murinen Herzgewebe und der Rattenzelllinie H9c2 stellen demnach nur eine allgemein gültige Aussage über die Expressionsänderung des Aktins nach 3,5-T₂-Behandlung dar, welche im Herzgewebe nicht verändert und in H9c2-Zellen reduziert wurde. Dies könnte einen Hinweis auf eine potentielle Restrukturierung des Zytoskeletts durch 3,5-T₂ geben, welches im Gegensatz zu publizierten Daten in Kardiomyozyten nach T₃-Gabe steht (Gustafson et al. 1986, Gustafson et al. 1987).

Die histologische Untersuchung mittels Masson-Trichrome-Färbung und die Messung der Genexpressionsmarker für die Kollagenbildung *Tgfb*, *Colla1*, *Ctgf* (Leask and Abraham 2004, Wang et al. 2010) lieferte keine Hinweise auf eine vermehrte Bildung von Kollagen durch die Behandlung mit 3,5-T₂ in Mäusen unter HFD.

Die Exposition einer HFD kann bereits zur Ausprägung einer diabetischen Kardiomyopathie führen, charakterisiert durch diastolische und systolische Dysfunktion, Hypertrophie der Kardiomyozyten und pathologische Vermehrung von Bindegewebszellen durch Induktion des FGP (Boudina and Abel 2010, Cox and Marsh 2014). Es ist anzunehmen, dass die 20-wöchige Fütterung einer HFD in den Mäusen bereits eine diabetische Kardiomyopathie entstehen ließ und potentielle Effekte von 3,5-T₂ auf die Entwicklung einer Fibrose und Remodeling kardialer Prozesse nicht erfasst werden konnten.

Kollagen I stellt die vorherrschende fibrilläre Kollagenform im Herzen dar und wird durch Fibroblasten produziert (Eghbali et al. 1988). Durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Herzgewebes mit einem Antikörper gegen Kollagen I könnten weitere Rückschlüsse auf die Entwicklung einer Fibrose nach 3,5-T₂-Behandlung gezogen werden.

Der Nachweis aktivierter intrazellulärer Signalwege mittels Western-Blot-Analysen (PI3K/AKT vs. MAP-Kinase) würde weitere Hinweise geben, um zwischen einer 3,5-T₂-induzierten physiologischen oder pathologischen Hypertrophie zu unterscheiden.

Die Untersuchungen in den differenzierten H9c2-Zellen lieferten keine weiteren Erkenntnisse, inwiefern 3,5-T₂ die Expressionsmuster fetaler Gene in Kardiomyoblasten veränderte. Laut Literatur nehmen H9c2-Kardiomyoblasten TH als auch deren glucuronidierte Derivate und den TH-Metabolit 3-T₁AM auf (van der Putten et al. 2002, van der Heide et al. 2007, Saba et al. 2010). Meischl et al. demonstrierten darüber hinaus die Synthese von TH in H9c2-Zellen (Meischl et al. 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten diese Befunde nicht bestätigen. Mittels LC-MS/MS wurden keine endogenen TH-Gehalte in den Lysaten der H9c2-Zellen detektiert. Gene (*Dio1-3*, *Mct10*, *Mct8*), die für den Metabolismus und Transport von TH eine entscheidende Rolle spielen, waren in den Zellen mit oder ohne Stimulation nicht exprimiert.

Für weitere Untersuchungen der 3,5-T₂-Wirkung in Kardiomyozyten müsste dementsprechend auf ein anderes Zellmodell mit suffizienter TH-Transporter- und TH-Rezeptorausstattung (z.B. primäre Kardiomyozyten, murine HL-1-Zellen) ausgewichen werden (Belakavadi et al. 2010).

5.5 Wirkung von 3,5-T₂ auf den hepatischen Fremdstoffmetabolismus

Anhand der Transkriptomanalyse konnten nur 9 Gene identifiziert werden, die durch die Behandlung der Mäuse unter HFD mit T₃ differentiell exprimiert wurden und darüber hinaus nicht als klassisch TH-responsiv gelten. In Studien zur genomweiten Untersuchung der Leber konnten im Gegensatz dazu zahlreiche differentiell exprimierte Gene nach akuter (6 h) oder chronischer Injektion (Tage/Wochen) von 1 µg/g T₃ in Mäusen detektiert werden (Feng et al. 2000, Yen et al. 2003, Zhang et al. 2015). Eine vergleichbare Dosis, wie sie auch im vorliegenden Versuch (0,03 µg/g) eingesetzt wurde, führte in Ratten bereits nach 3 h zur Stimulation der hepatischen DNA-Synthese (Bungay et al. 2008).

Die Einbeziehung von nur 3 Tieren pro Gruppe zur statistischen Auswertung liefert eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen vorliegenden Ergebnissen und der Literatur. Die qPCR-Daten (n>5) ergaben bekanntermaßen signifikante Änderungen der Expressionslevel diverser untersuchter TH-responsiver Gene (Abb. 9).

Die Behandlung mit der hohen Dosis 3,5-T₂, nicht aber mit der 10-fach geringeren Konzentration (0,25 µg/g) änderte nachweislich die Expression zahlreicher Gene in der Leber. Vergleichbare Microarray-Analysen in der Leber nach 3,5-T₂-Gabe wurden bis dato publiziert. Silvestri et al. identifizierte mittels *MALDI-TOF*-Massenspektrometer zahlreiche hepatische Proteine, welche in 3,5-T₂-behandelten Ratten (0,25 µg/g) unter HFD reguliert wurden (Silvestri et al. 2010). Ein entsprechendes Muster ließ sich zwischen den in dieser Arbeit vorgestellten Transkriptomdaten und den Proteinexpressionsmustern nicht feststellen.

Lipophile Fremdstoffe (Xenobiotika) als auch körpereigene Substanzen (Steroidhormone, TH) können dann ausgeschieden werden, wenn ihre Polarität und Wasserlöslichkeit erhöht wird. Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan ist dabei für deren Biotransformation verantwortlich und mit einem FME-System, zu welchem die Phase I, II- und III-Enzyme gehören, ausgestattet (Xu et al. 2005).

Für alle drei Enzymgruppen konnte gezeigt werden, dass sowohl die zwei- als auch vierwöchige Behandlung mit 2,5 µg/g 3,5-T₂ die Expression der Gene in Lebern der Mäuse unter SD und HFD signifikant regulierten (Tab. 27). Diesbezüglich wurden drei Gene (*Sult5a1*, *Ugt2b37*, *Slc22a7*) identifiziert, welche Diät-unabhängig sowohl durch 3,5-T₂ sowie T₃ differentiell exprimiert wurden.

SULT sind für die 4'-O-Sulfatierung mit Hilfe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS, „aktiviertes Sulfat“) verantwortlich (Evans and Relling 1999, Sevier et al. 2012) (Abb. 1). In Mensch und Nagetieren katalysieren diverse SULT-Isoformen die Sulfatierung von Iodthyroninen und verringern damit speziell für T₃ die TR-Affinität und rufen eine gesteigerte Metabolisierung via Deiodasen sowie Inaktivierung der TH hervor (Rutgers et al. 1991, Spaulding et al. 1992, Kuiper et al.

2005). Ein Zusammenhang zwischen *Sult5a1* und TH ist bisher in der Literatur nicht beschrieben, jedoch gehört das Gen neben *Sult1a1* und *Sult1d1* zu den häufigsten Isoformen in der Leber von adulten Mäusen (Lu et al. 2013).

Neben SULT zählen UGT zu den wichtigsten Vertretern der Phase II-Enzyme und neben Xenobiotika gehören auch TH zu deren Substraten (Miners and Mackenzie 1991, Wu et al. 2005).

Die Induktion von UGT durch spezifische Xenobiotika führte zu einer vermehrten Synthese von glucuronidiertem T₄ und rT₃ sowie Änderungen der TH Serumspiegel und zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen Fremdstoff- und TH-Metabolismus (Visser et al. 1993). Aufgrund der limitierten Datenlage kann keine Aussage getroffen werden, ob *Ugt2b37* eine Funktion in der Verstoffwechslung von T₃ bzw. 3,5-T₂ einnimmt.

Slc22a7 konnte durch 3,5-T₂ und T₃ in Mäusen unter HFD und SD induziert werden. Das Gen codiert für den OAT2, der im Hepatozyten am Export von organischen Anionen beteiligt ist (Maher et al. 2005, Zamek-Gliszczynski et al. 2006) und dessen Expression von Alter, Geschlecht und Futterzusammensetzung abhängt (Cheng et al. 2008, Ghose et al. 2011, Fu et al. 2012, Fu and Klaassen 2014). Dong et al. konnten in Lebern hypothyreoter Ratten eine negative Regulation der *Slc22a7*-Expression feststellen. Dies lässt eine Beteiligung des Transporters am Metabolismus von TH vermuten (Dong et al. 2007).

Die Behandlung mit 3,5-T₂ reduzierte in allen Gruppen die Expression von Glutathion-S-Transferasen (GST), welche die Konjugation zahlreicher Substanzen mit Glutathion katalysieren (McCarver and Hines 2002). In hyperthyreoten Ratten verringerte sich der Glutathion-Gehalt und reduzierten sich die Enzymaktivitäten der GST und Glutathionperoxidasen (GPx) in der Leber (Beckett et al. 1988, Chattopadhyay et al. 2007). Allgemein gelten GST als primäres antioxidatives Schutzsystem zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid, Lipid-Hydroperoxiden und weiteren Vertretern radikaler Sauerstoffspezies (ROS). Darüber hinaus regulieren sie den zellulären Redox-Status in der Leber und sind in zahlreichen weiteren biochemischen Prozessen eingebunden, z.B. in die Steroid- und Eicosanoidbiosynthese (Hayes et al. 2005).

Vergleichbar mit den Expressionsmustern der 3,5-T₂-behandelten Mäuse in vorliegender Arbeit, wurden auch in Nrf2-Knockout-Mäusen die GST-Subklassen Alpha (Gsta4, Gsta2), MU (Gstm1, Gstm6) und PI (Gstp1) vermindert exprimiert. Darüber hinaus spielt der nukleäre Rezeptor Nrf2 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Fettleber, da er die Expression lipogener Gene moduliert (Kitteringham et al. 2010, Wu et al. 2011, Meakin et al. 2014). Interessanterweise konnte in isolierten Kupffer-Zellen als auch in Leberhomogenaten T₃-behandelter Ratten eine Induktion der nukleären Nrf2-Fraktion detektiert werden (Romanque et al. 2011, Videla et al. 2012). TH sind dafür bekannt, oxidative Prozesse zu stimulieren und indirekt die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies anzukurbeln. Ein direkter Zusammenhang zwischen Glutathionstoffwechsel und TH wurde bisher nicht eindeutig aufgeklärt, jedoch könnte davon ausgegangen werden, dass Nrf2 in diesem Sinne ein Bindeglied zwischen Fremdstoffmetabolismus, TH- und Redoxstatus darstellt (Mancini et al. 2016).

3,5-T₂ könnte als Modulator des oxidativen Stress fungieren, denn in euthyreoten Probanden konnte eine positive Assoziation zwischen endogenen 3,5-T₂-Serumwerten und Trigonellin, einem Nrf2-Inhibitor (Arlt et al. 2013), festgestellt werden (Pietzner et al. 2015a).

Im Folgenden soll auf die Unterschiede zwischen den hepatischen Transkriptommustern in den Lebern der 3,5-T₂-behandelten Mäuse unter SD und HFD eingegangen werden.

Es konnten in den unterschiedlichen Diät-Gruppen nur partielle Überlappungen der differentiell exprimierten Gene von FME beobachtet werden. Darüber hinaus wurden weniger Gene in adipösen Mauslebern differentiell exprimiert als in den normalgewichtigen Tieren.

Zahlreiche Studien bestätigen die unterschiedlichen Expressionsmuster von FME in Versuchstieren, welche eine hochkalorische bzw. fett- und cholesterinreiche Kost erhielten. Die Expressionen von PXR und CAR sowie der Proteingehalt von RXR α in der Leber von HFD-Mäusen waren im Vergleich zu den normalgewichtigen Kontrolltieren signifikant reduziert (Ghose et al. 2011, Guo et al. 2016). Darüber hinaus bewirkte die *in vitro* Lipidakkumulation in Hepatozyten eine Reduktion der Expression zahlreicher P450-Enzyme (Donato et al. 2006).

Pro-inflammatorische Signale aus dem Fettgewebe sowie sekretierte Faktoren von Kupfferzellen aus der Leber, welche insbesondere im steatotischen Zustand ausgeschüttet werden, könnten diesbezüglich eine Erklärung liefern. Die Behandlung mit Zytokinen in Ratten und humanen Hepatozyten verringerte die hepatische Expression von Phase III-Transportern (Sukhai et al. 2000, Le Vee et al. 2008). Welche Faktoren in diesem Zusammenhang die Prozesse begünstigen ist bis dato nicht abschließend geklärt. In einem Rattenmodell mit induzierter ZNS-Inflammation konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und C/EBP in der Leber an Promoteregionen spezifischer P450-Isoformen binden (Abdulla et al. 2005). Dies könnte eine mechanistische Erklärung für die geänderte Expressionsstärke der Phase I-Enzyme nach Induktion inflammatorischer Prozesse unter HFD in der Leber liefern.

Eine detaillierte Literaturrecherche zeigte, dass zahlreiche Transkripte, die durch 3,5-T₂ reguliert wurden, Zielgene des konstitutiven Androstanrezeptors (CAR) darstellen (Tab. 28). CAR gehört zur Gruppe der nukleären Rezeptoren und steuert durch Heterodimerisierung mit RXR und Bindung an responsive Elemente (PBREM) der DNA die Expression von FME (Timsit and Negishi 2007). Für 3,5-T₂ konnte bisher kein funktioneller Zusammenhang zu CAR hergestellt werden. Im Gegensatz dazu beeinflussten TH in Leberzellen die Expression spezifischer CAR-Zielgene, begründet durch eine potentielle Bindung des aktivierten TR an die PBREM Region der mRNA (Ooe et al. 2009, Bing et al. 2014). Weiterhin führte die Bindung von CAR an TRE-Sequenzen im Promoter des TH-responsiven Gens *Thrsp* zu einer gesteigerten mRNA Expression (Breuker et al. 2010). Die Induktion von CAR in einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) wirkte anti-inflammatorisch und anti-apoptotisch und beeinflusste darüber hinaus die Regulation des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels im HFD-Modell (Baskin-Bey et al. 2007, Gao et al. 2009).

Die Beteiligung weiterer nukleärer Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren (PXR, AhR, FXR etc.) an der 3,5-T₂-induzierten Modulation von FME ist denkbar und einzelne Kandidaten würden aufgrund des weiten Spektrums von Phase I-, II- und III-Enzymen nur mit spezifischen Knockout-Modellen ausfindig gemacht werden können (Runge-Morris et al. 2013, Staudinger et al. 2013).

5.6 Effekte von 3,5-T₂ auf den Cholesterin- und Sexualsteroidstoffwechsel

Die chronische Fütterung von C57BL6-Mäusen mit einer fett- und cholesterinreichen Kost kann zur Entwicklung einer NAFLD führen. Das Spektrum reicht dabei von der Ausbildung einer Steatose mit Akkumulation von Triglyceriden und Cholesterin bis hin zu einer Steatohepatitis, gekennzeichnet durch die Induktion inflammatorischer Prozesse und Fibrosebildung (Takahashi et al. 2012).

Die anti-steatotischen Effekte von TH und 3,5-T₂ in Diät-induzierter NAFLD sind zahlreich beschrieben worden (Moreno et al. 2011, Goldberg et al. 2012, Grasselli et al. 2012, Rakov et al. 2016) und auch im vorliegenden Versuch führte 3,5-T₂ zu einer Reduktion des Gesamtcholesterins im Serum und geringeren hepatischen Triglyceridgehalten. In der Leber wurden jedoch keine Cholesterinwerte gemessen.

Mittels Transkriptomanalyse und qPCR konnten Gene identifiziert werden, welche nach vierwöchiger 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter HFD differentiell höher exprimiert wurden als in der Kontrollgruppe und sowohl an der Cholesterinbiosynthese als auch im Gallensäurestoffwechsel (*Cyp39a1*, *Cyp7a1*) beteiligt sind (Beilke et al. 2009, Lorbek et al. 2012, Nemoto et al. 2013). In Mäusen unter SD waren diese Gene durch 3,5-T₂ nicht reguliert.

Der Diät-spezifische Effekt von 3,5-T₂ auf den hepatischen Cholesterinstoffwechsel ist vergleichbar mit Ergebnissen einer Studie, in denen Mäuse unter cholesterinreicher Kost mit TCPOBOP, einem CAR-Aktivator, behandelt wurden. TCPOBOP reduzierte die Cholesterinwerte im Serum, steigerte die hepatische Gallensäuresynthese und induzierte zahlreiche Gene der Cholesterinbiosynthese, entsprechend der Abbildung 24 (Rezen et al. 2009). In Anbetracht der im vorherigen Abschnitt diskutierten Ergebnisse könnte eine Beteiligung des nukleären Rezeptors CAR für die Wirkung von 3,5-T₂ auf den Cholesterinstoffwechsel vorliegen.

Eine cholesterin- und fettreiche Kost in Mäusen erhöhte indes die hepatischen Cholesteringehalte und führte zu einem negativen Feedbackmechanismus einhergehend mit Reduktion der endogenen Cholesterinsynthese (Maxwell et al. 2003, Lorbek et al. 2013).

Im Gegensatz dazu erhöhen TH und Agonisten des TR β (z.B. KB-141, Sobeprotriome (GC-1)) die Expression und Aktivität des Scavenger-Rezeptors B1 (SR-B1) und des LDL-Rezeptors und steigern somit die Aufnahme des Cholesterins aus HDL und LDL. Weiterhin wird die Umwandlung des Cholesterins in Gallensäuren durch eine erhöhte Expression des Schlüsselenzyms *Cyp7a1* beschleunigt und die vermehrte Transkription der ATP-binding cassette Transporter G5 and G8 trägt zur biliären Cholesterinexkretion bei (Gullberg et al. 2000, Johansson et al. 2005, Erion et al. 2007).

Die Reduktion des Serumgesamtcholesterins nach 3,5-T₂-Behandlung in Mäusen unter HFD könnte entsprechend der Wirkung von TH ebenfalls durch eine erhöhte Umwandlung in Gallensäuren und Erhöhung der hepatischen Cholesterinausscheidung erklärt werden. Die Analyse der hepatischen Cholesterinfraktionen sowie der biliären Gallensäure- und Cholesterinkonzentration würde diesbezüglich weitere Rückschlüsse liefern.

Als Modulator für die transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Regulation von Sterolen und Lipiden soll in diesem Abschnitt der Transkriptionsfaktor Srebp (Sterol regulatory element binding protein) angeführt werden. Es existieren zwei *Srebp*-Gene, wobei *Srebf1* für die Proteine Srebp1a und Srebp1c codiert und Srebp2 aus *Srebf2* hervorgeht. Während Srebp1c vor allem bei der Fettsäure-Synthese und Srebp2 bei der Cholesterin-Synthese eine Rolle spielt, reguliert Srebp1a die Expression von Genen beider Signalwege (Raghow et al. 2008, Wang et al. 2015).

Für Srebp2 konnte ein direkter Zusammenhang zwischen TH und Expression gezeigt werden, vermittelt durch die TR-abhängige Stimulation des SREBP2-Promoters (Shin and Osborne 2003). Für Srebp1c ist die Datenlage indes nicht eindeutig. In Hepatozyten führte T₃ zu einer vermehrten Synthese des „reifen“ Srebp1c, vermittelt durch nicht-nukleäre Signalwege. Hashimoto et al. detektierten eine geringere hepatische Expression und Herabregulation des Srebp1c-Promoters nach T₃-Stimulation (Gnoni et al. 2012) (Zhang et al. 2003, Hashimoto et al. 2006).

Interessanterweise bewirkte 3,5-T₂ in HepG2-Zellen eine Induktion der Vorstufe sowie die Herunterregulation der nukleären, reifen Form des Srebp1 (Rochira et al. 2013). Im vorliegenden Versuch konnte eine geringere Expression des *Srebf1* nach 3,5-T₂-Behandlung in HFD-Mäusen detektiert werden (Anhang Tab. 35).

Sowohl Srebp1 als auch Cyp7a1 sind Zielgene des Transkriptionsfaktors LXR α . Wie eingangs erwähnt regulierte T₃ direkt die Expression von LXR α in C57/BL6-Mäusen (Hashimoto et al. 2007). Darüber hinaus konnten eine unterdrückte Feedbackregulation der HPT-Achse und eine gesteigerte Synthese von TH in LXR-Knockout-Mäusen festgestellt werden (Miao et al. 2015). Die Regulation des hepatischen Sterol- und Lipidstoffwechsels durch die 3,5-T₂-Behandlung könnte demnach durch die beiden Transkriptionsfaktoren Srebp1 und LXR vermittelt worden sein.

Im Gegensatz zum hypocholesterinämischen Effekt von 3,5-T₂ im vorliegenden HFD-Modell wurde eine Steigerung der hepatischen Expression von Genen der Cholesterinbiosynthese detektiert. Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass Cholesterin neben Gallensäure auch als Vorstufe für weitere lipophile Substanzen, wie z.B. Vitamin D und Steroidhormone, fungiert. Neben den Gonaden spielen periphere Gewebe, wie das Fettgewebe und die Leber, eine wichtige Rolle in der lokalen Synthese und Regulation von Sexualhormonen (Labrie et al. 2001). Anhand des Microarraydatensatzes und der Steroidhormonanalyse konnte ein Diät-abhängiger Zusammenhang zwischen der 3,5-T₂-Behandlung und dem hepatischen Sexualhormonstoffwechsel festgestellt werden, der partiell mit der gesteigerten Expression von Genen der Cholesterinbiosynthese übereinstimmt (Abb. 24 und Abb. 26).

TH regulieren direkt die Funktion von Sertoli- und Leydigzellen im Hoden, fördern die Testosteronsynthese und tragen zu einer Stimulation diverser steroidogener Enzyme und Faktoren bei (Maran 2003, Rijntjes et al. 2008). Darüber hinaus konnte in isolierten Granulosazellen aus Follikeln legender Hennen vor der Ovulation gezeigt werden, dass 3,5-T₂ und T₃ die Progesteronproduktion regulierte und steroidogene Effekte auf die cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Synthese und auf das geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselprotein der Steroidhormon-Biosynthese Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) ausübte (Sechman et al. 2011).

Zur Modulation von Sexualsteroidhormonen in der Leber durch TH und TH-Metabolite in Nagetieren gibt es bisher kaum publizierte Daten. Bei hyperthyreoter Stoffwechsellage im Menschen konnten erhöhte Spiegel des Sexualhormon-bindenden Globulins (SH-BG) detektiert werden (Hampl et al. 2003). Das in der Leber produzierte SH-BG reguliert das Verhältnis der einzelnen Hormonfraktionen (frei, SH-BG-gebunden, Albumin-gebunden) untereinander und beeinflusst die zelluläre Verfügbarkeit der Sexualsteroiden (Thaler et al. 2015). In HepG2-Zellen führte die Stimulation mit T₃ und T₄ zur SH-BG-Akkumulation unter Beteiligung des HNF-4 α an der transkriptionellen Aktivität (Selva and Hammond 2009). Im Gegensatz zu Menschen wird SH-BG in der Leber von Nagetieren nicht exprimiert. Insbesondere in Ratten existieren jedoch vergleichbare Androgen-bindende Proteine (Joseph et al. 1987). Analysen des Sexualsteroidprofils im Serum und in den Geschlechtsdrüsen der 3,5-T₂-behandelten Tiere könnten demnach weitere Erkenntnisse hinsichtlich eines veränderten Sexualhormonstoffwechsels liefern.

Die Induktion des Gens *Cyp2b9* in 3,5-T₂-behandelten normalgewichtigen, männlichen Mäusen (Tab. 28) lässt darüber hinaus Unterschiede der 3,5-T₂-Wirkung auf den Sexualsteroidstoffwechsel zwischen den einzelnen Diät-Gruppen erkennen. *Cyp2b9*, im Menschen als Isoform CYP2B6 bekannt, wird eng mit der Testosteron-16-alpha-Hydroxylase in Zusammenhang gebracht und gilt als ein „female-specific“ Protein, da es bei der Inaktivierung von Testosteron eine Rolle spielt (Noshiro and Negishi 1988, Ekins et al. 1998, Guo et al. 2007, Delic et al. 2010). In männlichen Mäusen, welche mit β -Estradiol behandelt wurden, konnte beispielsweise eine starke Induktion der *Cyp2b9* detektiert werden (Jarukamjorn et al. 2000).

Eine allgemein gültige Aussage, ob 3,5-T₂ die Synthese der Progestagene und Androgene fördert oder für deren Umwandlung hin zu Östrogenen und weiteren Abbauprodukten verantwortlich ist, kann anhand der Datenlage nicht spezifisch formuliert werden. Die gesteigerte Transkription von *Akr1c18*, das an der Inaktivierung von Progesteron beteiligt ist (Pratt-Hyatt et al. 2013), sowie die erhöhte Expression des Estrogen Rezeptors (*Esr1*) in 3,5-T₂-behandelten Mäusen (Anhang Tab. 35 und Tab. 36) gibt einen Hinweis auf eine anti-androgene Wirkung des TH-Metaboliten und der potentiellen Beteiligung am Östrogen-Signalweg.

5.7 Einfluss von 3,5-T₂ auf den hepatischen Schilddrüsenhormonmetabolismus

Beim Menschen werden nur etwa 20-30 % des gesamten T₃ von der Schilddrüse selbst produziert, die restlichen 80 %, in euthyreoten Nagetieren sind es etwa 50 %, werden durch Deiodierungsreaktionen in peripheren Geweben gebildet (Engler and Burger 1984, Chanoine et al. 1993).

Die Dio1, welche prädominant in der Leber exprimiert wird, spielt hierbei eine bedeutende Rolle in der systemischen Versorgung mit extrathyroidalem T₃ und ist für die Aktivierung als auch Inaktivierung von TH verantwortlich (Silva et al. 1984) (Abb. 1). Für die Aufrechterhaltung der T₃- und TSH-Spiegel im Blut ist die hepatische Dio1 nicht essentiell, jedoch leistet sie einen entscheidenden Beitrag bei der Inaktivierung von TH im hyperthyreoten Zustand (Streckfuss et al. 2005). Zahlreiche Studien bestätigen die erhöhte enzymatische Aktivität und mRNA Expression der hepatischen Dio1 nach exogener T₃-Gabe (Berry et al. 1990, Maia et al. 1995, Zavacki et al. 2005). Im Einklang mit der gesteigerten hepatischen Dio1-Expression in den 3,5-T₂-behandelten Mäuse und in primären Hepatozyten (Abb. 15 und Abb. 29) wurde auch in anderen Untersuchungen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Aktivität und Transkription der hepatischen als auch hypophysären Dio1 nach 3,5-T₂-Stimulation festgestellt (Baur et al. 1997, Padron et al. 2014).

Die Analyse der TH mittels LC-MS/MS in der Leber von T₃- bzw. 3,5-T₂-behandelten Mäusen konnte keine weiteren TH-Metabolite (z.B. T₀, 3-T₁, 3,3'-T₂) detektieren, welche durch potentielle Deiodierungsreaktionen entstehen würden (Abb. 32). Interessanterweise führte die 3,5-T₂-Behandlung zu einer starken konzentrationsabhängigen Akkumulation in der Leber (Abb. 14) und untermauert die Annahme, dass die Leber ein wichtiges Zielorgan für die Wirkung aber auch Metabolisierung von 3,5-T₂ ist. Der potentielle Biosyntheseweg von 3,5-T₂ durch Deiodierung von T₃, wie es *in vivo*, bisher aber nicht *in vitro* gezeigt wurde (Engler and Burger 1984, Piehl et al. 2008, Darras and Van Herck 2012), konnte in dieser Arbeit nicht dargestellt werden.

Die komplexe Struktur der Leber und insbesondere der Fettleber kann zu großen Matrixeffekten führen und die Signalintensität der TH-Metabolite einschränken (Dr. Keith Richards, persönliche Kommunikation). Weiterhin können die Konzentrationen der Metabolite unterhalb der Nachweisgrenze liegen und eine Quantifizierung mittels LC-MS/MS erschweren. Die Optimierung des Extraktionsprotokolls für die Bestimmung von TH-Metaboliten im Gewebe als auch im Serum stellt demnach immer noch eine analytische Herausforderung dar (De Angelis et al. 2016).

Die murinen primären Hepatozyten wurden als geeignetes Modell gewählt, um den Metabolismus von T₃ und 3,5-T₂ zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass T₃ und 3,5-T₂ in die Leberzelle aufgenommen werden und genomische wahrscheinlich durch TR-vermittelte Effekte ausüben (Abb. 30 und Abb. 32).

Für TH ist beschrieben worden, dass der Transport in die Leberzelle sättigbar ist (Bernal et al. 2015). Diesbezüglich kann angenommen werden, dass nicht die gesamte Menge an eingesetztem T₃ und 3,5-T₂ in die Hepatozyten aufgenommen wurde und die Zellen nach 24 h die teilweise umgesetzten

Substanzen wieder exportiert haben. Diese Annahme würde eine Erklärung für den großen Anteil der exponierten TH-Metabolite im Zellkulturüberstand, nicht aber im Lysat, liefern.

Für 3,5-T₂ ist bisher kein Transporter für den Im- und Export publiziert, jedoch konnte in präliminären Western Blot-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit in Lebern der 3,5-T₂-behandelten HFD-Mäuse eine vermehrte hepatische Expression des MCT10 demonstriert werden. Mit MCT10-cDNA stabil transfizierte Cos-1-Zellen zeigten darüber hinaus, dass 3,5-T₂ die Aufnahme von ¹²⁵I-T₃ am stärksten hemmte (Ianculescu et al. 2010) und liefert einen weiteren Anhaltspunkt hinsichtlich einer potentiellen Beteiligung des MCT10 am 3,5-T₂-Transport.

Die untere Abbildung fasst die Ergebnisse der primären Hepatozyten bezüglich des TH-Metabolismus nach 3,5-T₂- bzw. T₃-Stimulation zusammen. Vergleichbar mit Daten aus Leberhomogenaten (Chopra and Chua Teco 1982, Piehl et al. 2008) konnte die Umwandlung von T₃ zu 3,3'-T₂, 3-T₁ und T₀ sowie die Metabolisierung von 3,5-T₂ zu 3-T₁ und T₀ gezeigt werden. Inhibition der Dio1 mittels PTU hemmte die Synthese von 3-T₁ und T₀ und lässt eine Beteiligung der Dio1 an der enzymatischen Reaktion vermuten, wobei eine Aktivität der Dio3 nicht ausgeschlossen werden kann (Abb. 36).

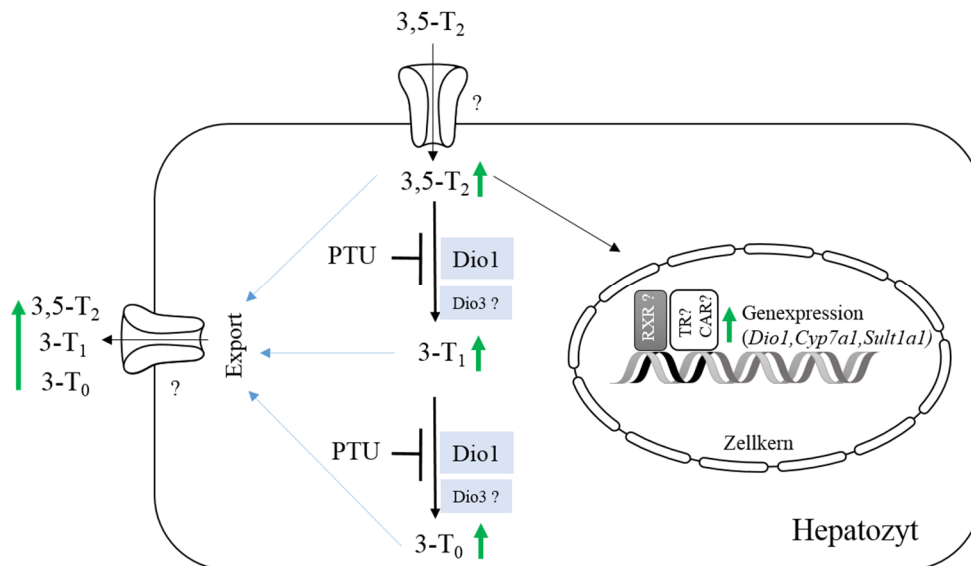


Abb. 36: Schematische Zusammenfassung der Wirkung von 3,5-T₂ hinsichtlich Metabolisierung und Genexpression in isolierten Hepatozyten

Grüne Pfeile stellen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse dar.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob der TH-Metabolit 3,5-T₂ in Mäusen mit Diät-induzierter Adipositas einer Gewichtszunahme entgegensteuert und somit als endogen vorkommende Substanz zur Therapie von Adipositas und den assoziierten Begleiterkrankungen eingesetzt werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass 3,5-T₂ in euthyreoten Mäusen unter HFD wie T₃ die Fettgewebssmasse reduzierte und den hepatischen Stoffwechsel in Richtung katabole Stoffwechsellage positiv beeinflusste. Eine Minderung des Körpergewichts wurde hingegen nicht erreicht.

Aufgrund der 3,5-T₂-induzierten Suppression der HPT-Achse, der potentiellen Induktion einer kardialen Hypertrophie und Beeinflussung des hepatischen Fremdstoff- und Sexualsteroidmetabolismus in Mäusen unter SD und HFD, kann jedoch eine Empfehlung zum Einsatz von 3,5-T₂ als anti-lipidämische therapeutische Substanz nicht gegeben werden.

In zahlreichen Rattenstudien, in denen 3,5-T₂ sowohl Lipidstoffwechsel als auch Körpergewicht positiv beeinflusste, wurden diese negativ zu bewertenden Effekte des TH-Metaboliten nicht beschrieben und eine speziesabhängige Dosis-Wirkungsbeziehung kann dementsprechend angenommen werden.

Inwieweit 3,5-T₂ im Menschen adverse Effekte erzielt kann anhand der Datenlage nicht formuliert werden. In einer Studie mit zwei Probanden, welche über einen Zeitraum von 8 Tagen eine sehr geringe Dosis 3,5-T₂ (etwa 0,001 - 0,01 µg/g KG) einnahmen, erhöhte sich der Grundumsatz und reduzierte sich das Körpergewicht ohne eine Änderung der Herzrate und der TH- und TSH-Serumgehalte hervorzurufen (Antonelli et al. 2011).

Die physiologische Funktion von 3,5-T₂ ist bis dato nicht geklärt. Assoziationsstudien in euthyreoten Populationen weisen auf einen direkten Zusammenhang von 3,5-T₂ mit Biomarkern im Serum hin, z.B. Fastenglukose, Urin-Trigonellin, arterio-venöses Verhältnis (Ittermann et al. 2014, Pietzner et al. 2015a, Pietzner et al. 2015b) und rücken 3,5-T₂ als potentiellen Parameter zur Beurteilung von Erkrankungen (z.B. des Herz-Kreislauf-Systems) in ein neues Licht.

Untersuchungen zu kardiovaskulären Effekten von 3,5-T₂, wie sie in der vorliegenden Arbeit präliminär vorliegen, würden diesbezüglich weitere Erkenntnisse liefern. Die Leber konnte als eines der Zielorgane der 3,5-T₂-Wirkung identifiziert werden. Zukünftige Studien zur funktionellen Relevanz von 3,5-T₂ auf den hepatischen Steroidhormonstoffwechsel gäben weitere Hinweise auf eine potentiell selektive, TH-unabhängige Wirkung von 3,5-T₂ in der Leber.

Im Kontext der aktuellen Internetpräsenz von 3,5-T₂ als „Fatburner“ sowie lipidsenkende und grundumsatzsteigernde Substanz, welche insbesondere in Bodybuilderszenen auf starke Konsum- und Kaufbereitschaft trifft, sollte eine behutsame Prüfung vor Marktzulassung erfolgen.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aktivierung und Metabolisierung von Schilddrüsenhormonen und deren Metabolite	4
Abb. 2: Schematische Darstellung der klassischen und nicht-klassischen Wirkmechanismen von Schilddrüsenhormonen (TH) und 3,5-T ₂	6
Abb. 3: Schematische Darstellung des thyreotropen Regelkreises	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der Funktion von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen.....	13
Abb. 5: Versuchsdesign Tierexperimente	22
Abb. 6: Schematische Darstellung Amplifikations-Blot	29
Abb. 7: Schematische Darstellung der Transkriptomanalyse.....	33
Abb. 8: Darstellung Seahorse-Assay	46
Abb. 9: Regulation der hepatischen Genexpression in Mäusen unter HFD nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ oder T ₃	50
Abb. 10: Hepatische Proteinexpression von Cytochrom C nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ in Mäusen unter HFD	51
Abb. 11: Expression TH-responsiver Gene in der Hypophyse von Mäusen unter HFD nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ oder T ₃	52
Abb. 12: Expression TH-responsiver Gene in der Hypophyse von Mäusen unter HFD und SD nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂	53
Abb. 13: Serumkonzentration von T ₄ , T ₃ und 3,5-T ₂ in Mäusen unter HFD und SD nach 14- und 28-tägiger Behandlung mit T ₃ oder 3,5-T ₂	54
Abb. 14: Hepatische Konzentration von T ₄ , T ₃ und 3,5-T ₂ in Mäusen unter HFD und SD nach 14- und 28-tägiger Behandlung mit T ₃ oder 3,5-T ₂	55
Abb. 15: Hepatische Expression und Aktivität der Dio1 und Expression von Serpina7 in Mäusen unter SD und HFD nach 14 und 28-tägiger Behandlung mit T ₃ oder 3,5-T ₂	56
Abb. 16: Herzgewicht und kardiale Gen- und Proteinexpression nach 3,5-T ₂ -Behandlung	57
Abb. 17: Masson-Trichrom-Goldner-Färbung und Expression fibroserelevanter Gene im Herzgewebe nach 3,5-T ₂ -Behandlung.....	59
Abb. 18: Validierung und Differenzierung H9c2-Zellen	60
Abb. 19: Konzentration von 3,5-T ₂ und T ₃ im Zelllysat und -überstand von differenzierten H9c2-Zellen.....	61
Abb. 20: Genexpression von Atp2a2, Pln, Myh7 und Actc1 in differenzierten H9c2-Zellen	62
Abb. 21: Expressionen der Gene Ugt2b37, Sult5a1 und Slc22a7 in der Leber von Mäusen unter HFD nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ oder T ₃	64
Abb. 22: Analyse der hepatischen Expression von CAR nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ oder T ₃ in Mäusen unter HFD	65

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 23: Analyse der hepatischen Expression von CAR nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ oder T ₃ in Mäusen unter HFD und SD	66
Abb. 24: Schematische Darstellung der Cholesterinbiosynthese	67
Abb. 25: Expression der Gene Idi1, Sqle und Hsd17b7 in der Leber von Mäusen unter HFD oder SD nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂	68
Abb. 26: Schematische Darstellung der Steroidhormonsynthese.....	69
Abb. 27: Steroidgehalte in der Leber von 3,5-T ₂ -behandelten Mäusen unter HFD oder SD	70
Abb. 28: Viabilität und Expression des Referenzgens in primären Hepatozyten.....	71
Abb. 29: Genexpression und enzymatische Aktivität der Dio1 in primären Hepatozyten.....	71
Abb. 30: Genexpression von Cyp7a1 und Sult1a1 in primären Hepatozyten	72
Abb. 31: Rate des Sauerstoffverbrauchs in primären Hepatozyten.....	73
Abb. 32: Konzentration von 3,5-T ₂ und TH im Zelllysat und im Zellkulturüberstand primärer Hepatozyten.....	74
Abb. 33: Konzentration von T ₀ , 3-T ₁ und 3,3'-T ₂ im Zelllysat und im Zellkulturüberstand primärer Hepatozyten.....	75
Abb. 34: Schematische Darstellung der Suppression der Schilddrüsenhormonachse nach 3,5-T ₂ -Behandlung.....	84
Abb. 35: Übersicht der Effekte von 3,5-T ₂ hinsichtlich einer Suppression der HPT-Achse und Wirkung auf den Energiestoffwechsel in verschiedenen Versuchsmodellen in Ratten und Mäusen.....	87
Abb. 36: Schematische Zusammenfassung der Wirkung von 3,5-T ₂ hinsichtlich Metabolisierung und Genexpression in isolierten Hepatozyten	99

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Wirkspektren von Schilddrüsenhormonen auf Zellebene.....	10
Tab. 2: Übersicht über die Wirkspektren von Schilddrüsenhormonen auf Organebene	11
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	17
Tab. 4: Laborgeräte	17
Tab. 5: Software und Datenbanken	18
Tab. 6: Reagenziensysteme	19
Tab. 7: Allgemein verwendete Lösungen und Puffer.....	20
Tab. 8: Zusammensetzung der Diäten vor Versuchsbeginn	21
Tab. 9: Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	23
Tab. 10: Übersichtsprotokoll für die Kultivierung und Behandlung von primären Hepatozyten	25
Tab. 11: Übersichtsprotokoll für die Kultivierung, Differenzierung und Behandlung von H9c2-Zellen	26
Tab. 12: Übersicht der angewendeten RNA Isolierungskits	27
Tab. 13: Zusammensetzung RNA-Agarosegel.....	28
Tab. 14: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese	28
Tab. 15: Mastermix für PCR-Ansatz.....	29
Tab. 16: Übersicht Amplifizierungsprogramm	30
Tab. 17: Übersicht der Primersequenzen zur Amplifikation der Gene	31
Tab. 18: Zusammensetzung SDS-Gel	35
Tab. 19: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper der Western-Blot-Analyse.....	36
Tab. 20: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot	36
Tab. 21: Zusammensetzung Substratmix des radioaktiven Dio1-Assays.....	37
Tab. 22: Zusammensetzung Substratmix des nicht-radioaktiven Dio1-Assays	38
Tab. 23: LC-MS/MS Instrumentenparameter.....	41
Tab. 24: LC-MS/MS Arbeitsparameter der Metabolite und internen Standards für Leber- und Serumanalyse.....	42
Tab. 25: LC-MS/MS Arbeitsparameter der Metabolite und internen Standards für die Zelllys- und Überstandsanalyse	43
Tab. 26: Verwendete Lösungen für Masson-Trichrom-Goldner-Färbung	45
Tab. 27: Übersicht der regulierten FME codierenden Transkripte in Lebern von 3,5-T ₂ oder T ₃ - behandelten Mäusen unter SD oder HFD.....	63
Tab. 28: Potentielle Zielgene des Transkriptionsfaktors CAR.....	65
Tab. 29: Körpergewicht- und zusammensetzung der Mäuse vor Beginn des 28-tägigen Versuchs.....	77
Tab. 30: Metabolische Parameter nach 14- bzw. 28-tägiger Intervention in HFD-Mäusen.....	79

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 31: Regulation der Expression TH-responsiver Gene nach 28-tägiger 3,5-T ₂ -Behandlung in Herzen von HFD-Mäusen im Vergleich zur klassischen T ₃ -Wirkung	89
Tab. 32: Regulation der Expression von Genen nach 28-tägiger 3,5-T ₂ -Behandlung in Herzen von HFD-Mäusen, die Marker für pathologisches Remodeling darstellen	90
Tab. 33: Differentiell exprimierte hepatische Gene nach 14-tägiger Behandlung mit T3 in HFD-Mäusen.	126
Tab. 34: Differentiell exprimierte hepatische Gene nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ in HFD-Mäusen.	126
Tab. 35: Differentiell exprimierte hepatische Gene nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ in HFD-Mäusen.	127
Tab. 36: Differentiell exprimierte hepatische Gene nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T ₂ in SD-Mäusen.	128

Literaturverzeichnis

- ABDULLA D, GORALSKI KB, DEL BUSTO CANO EG AND RENTON KW. 2005. The signal transduction pathways involved in hepatic cytochrome P450 regulation in the rat during a lipopolysaccharide-induced model of central nervous system inflammation. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33: 1521-1531.
- ACKERMANS MT, KETTELARIJ-HAAS Y, BOELEN A AND ENDERT E. 2012. Determination of thyroid hormones and their metabolites in tissue using SPE UPLC-tandem MS. *Biomedical chromatography : BMC* 26: 485-490.
- ALEKSUNES LM AND KLAASSEN CD. 2012. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40: 1366-1379.
- ANTONELLI A, FALLAHI P, FERRARI SM, DI DOMENICANTONIO A, MORENO M, LANNI A AND GOGLIA F. 2011. 3,5-diiodo-L-thyronine increases resting metabolic rate and reduces body weight without undesirable side effects. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 25: 655-660.
- ARAUJO RL, ANDRADE BM, PADRON AS, GAIDHU MP, PERRY RL, CARVALHO DP AND CEDDIA RB. 2010. High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology* 151: 3460-3469.
- ARAUJO RL AND CARVALHO DP. 2011. Bioenergetic impact of tissue-specific regulation of iodothyronine deiodinases during nutritional imbalance. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43: 59-65.
- ARLT A, SEBENS S, KREBS S, GEISMANN C, GROSSMANN M, KRUSE ML, SCHREIBER S AND SCHAFER H. 2013. Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene* 32: 4825-4835.
- ARNOLD S, GOGLIA F AND KADENBACH B. 1998. 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *European journal of biochemistry / FEBS* 252: 325-330.
- AUCHUS RJ. 2004. Overview of dehydroepiandrosterone biosynthesis. *Semin Reprod Med* 22: 281-288.
- BAHN RS ET AL. 2011. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 17: 456-520.
- BALL SG, SOKOLOV J AND CHIN WW. 1997. 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *Journal of molecular endocrinology* 19: 137-147.
- BAQUI MM, GEREKEN B, HARNEY JW, LARSEN PR AND BIANCO AC. 2000. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* 141: 4309-4312.
- BASKIN-BEY ES, ANAN A, ISOMOTO H, BRONK SF AND GORES GJ. 2007. Constitutive androstane receptor agonist, TCPOBOP, attenuates steatohepatitis in the methionine choline-deficient diet-fed mouse. *World journal of gastroenterology : WJG* 13: 5635-5641.
- BASSETT JH, HARVEY CB AND WILLIAMS GR. 2003. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and cellular endocrinology* 213: 1-11.
- BAUER K. 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 70: 69-74.
- BAUR A, BAUER K, JARRY H AND KOHRLE J. 1997. 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. *Endocrinology* 138: 3242-3248.
- BECKETT GJ, BOYD R, BEDDOWS SE AND HAYES JD. 1988. Decreased hepatic glutathione S-transferase A, AA and L concentration produced by prolonged thyroid hormone administration. *Biochemical pharmacology* 37: 3201-3204.
- BEILKE LD, ALEKSUNES LM, HOLLAND RD, BESSELSSEN DG, BEGER RD, KLAASSEN CD AND CHERRINGTON NJ. 2009. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 37: 1035-1045.
- BELAKAVADI M, SAUNDERS J, WEISLEDER N, RAGHAVA PS AND FONDELL JD. 2010. Repression of cardiac phospholamban gene expression is mediated by thyroid hormone receptor- α 1 and involves targeted covalent histone modifications. *Endocrinology* 151: 2946-2956.

- BELTRAMI M, PALAZZUOLI A, RUOCCO G AND ASPROMONTE N. 2016. The predictive value of plasma biomarkers in discharged heart failure patients: the role of plasma BNP. *Minerva Cardioangiol* 64: 147-156.
- BENVENGA S AND ROBBINS J. 1993. Lipoprotein-thyroid hormone interactions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 4: 194-198.
- BERGH JJ, LIN HY, LANSING L, MOHAMED SN, DAVIS FB, MOUSA S AND DAVIS PJ. 2005. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146: 2864-2871.
- BERKENSTAM A, FARNEGARDH M AND GUSTAFSSON JA. 2004. Convergence of lipid homeostasis through liver X and thyroid hormone receptors. *Mech Ageing Dev* 125: 707-717.
- BERNAL J, GUADANO-FERRAZ A AND MORTE B. 2015. Thyroid hormone transporters--functions and clinical implications. *Nature reviews Endocrinology* 11: 406-417.
- BERRY MJ, KATES AL AND LARSEN PR. 1990. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 4: 743-748.
- BHARGAVA M, LEI J AND INGBAR DH. 2009. Nongenomic actions of L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. Focus on "L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase". *American journal of physiology Cell physiology* 296: C977-979.
- BIANCO AC, SALVATORE D, GEREBEN B, BERRY MJ AND LARSEN PR. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine reviews* 23: 38-89.
- BING Y, ZHU S, JIANG K, DONG G, LI J, YANG Z, YANG J AND YUE J. 2014. Reduction of thyroid hormones triggers down-regulation of hepatic CYP2B through nuclear receptors CAR and TR in a rat model of acute stroke. *Biochemical pharmacology* 87: 636-649.
- BIZHANOVA A AND KOPP P. 2011. Controversies concerning the role of pendrin as an apical iodide transporter in thyroid follicular cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 28: 485-490.
- BODENNER DL, MROCYNSKI MA, WEINTRAUB BD, RADOVICK S AND WONDISFORD FE. 1991. A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *The Journal of biological chemistry* 266: 21666-21673.
- BOGAZZI F, HUDSON LD AND NIKODEM VM. 1994. A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. *The Journal of biological chemistry* 269: 11683-11686.
- BOUDINA S AND ABEL ED. 2010. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 11: 31-39.
- BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- BRAULKE LJ, KLINGENSPOR M, DEBARBER A, TOBIAS SC, GRANDY DK, SCANLAN TS AND HELDMAIER G. 2008. 3-Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation. *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology* 178: 167-177.
- BRENT GA. 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation* 122: 3035-3043.
- BREUKER C, MOREAU A, LAKHAL L, TAMASI V, PARMENTIER Y, MEYER U, MAUREL P, LUMBROSO S, VILAREM MJ AND PASCUSI JM. 2010. Hepatic expression of thyroid hormone-responsive spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1H3). *Endocrinology* 151: 1653-1661.
- BRIX K, LEMANSKY P AND HERZOG V. 1996. Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* 137: 1963-1974.
- BUNGAY A, SELDEN C, BROWN D, MALIK R, HUBANK M AND HODGSON H. 2008. Microarray analysis of mitogenic effects of T3 on the rat liver. *Journal of gastroenterology and hepatology* 23: 1926-1933.
- BURGER AG, O'CONNELL M, SCHEIDEGGER K, WOO R AND DANFORTH E, JR. 1987. Monodeiodination of triiodothyronine and reverse triiodothyronine during low and high calorie diets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 65: 829-835.
- CAO X, KAMBE F, MOELLER LC, REFETOFF S AND SEO H. 2005. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 19: 102-112.
- CASAS F, ROCHARD P, RODIER A, CASSAR-MALEK I, MARCHAL-VICTORION S, WIESNER RJ, CABELLO G AND WRUTNIAK C. 1999. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbA α 1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Molecular and cellular biology* 19: 7913-7924.

- CAVALLO A, GNONI A, CONTE E, SICULELLA L, ZANOTTI F, PAPA S AND GNONI GV. 2011. 3,5-diiodo-L-thyronine increases FoF1-ATP synthase activity and cardiolipin level in liver mitochondria of hypothyroid rats. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43: 349-357.
- CEA LB. 2005. Natriuretic peptide family: new aspects. *Current medicinal chemistry Cardiovascular and hematological agents* 3: 87-98.
- CHANOINE JP, BRAVERMAN LE, FARWELL AP, SAFRAN M, ALEX S, DUBORD S AND LEONARD JL. 1993. The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. *The Journal of clinical investigation* 91: 2709-2713.
- CHATTOPADHYAY S, SAHOO DK, SUBUDHI U AND CHAINY GB. 2007. Differential expression profiles of antioxidant enzymes and glutathione redox status in hyperthyroid rats: a temporal analysis. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology* : CBP 146: 383-391.
- CHENG Q, ALEKSUNES LM, MANAUTOU JE, CHERRINGTON NJ, SCHEFFER GL, YAMASAKI H AND SLITT AL. 2008. Drug-metabolizing enzyme and transporter expression in a mouse model of diabetes and obesity. *Molecular pharmacology* 5: 77-91.
- CHENG SY, LEONARD JL AND DAVIS PJ. 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine reviews* 31: 139-170.
- CHENG SY, RANSOM SC, MCPHIE P, BHAT MK, MIXSON AJ AND WEINTRAUB BD. 1994. Analysis of the Binding of 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine and Its Analogs to Mutant Human Beta-1 Thyroid-Hormone Receptors - a Model of the Hormone-Binding Site. *Biochemistry-U.S.* 33: 4319-4326.
- CHI HC, CHEN CY, TSAI MM, TSAI CY AND LIN KH. 2013. Molecular functions of thyroid hormones and their clinical significance in liver-related diseases. *BioMed research international* 2013: 601361.
- CHIELLINI G ET AL. 2007. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21: 1597-1608.
- CHIEN KR, KNOWLTON KU, ZHU H AND CHIEN S. 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5: 3037-3046.
- CHOI J, MOSKALIK CL, NG A, MATTER SF AND BUCHHOLZ DR. 2015. Regulation of thyroid hormone-induced development in vivo by thyroid hormone transporters and cytosolic binding proteins. *General and comparative endocrinology* 222: 69-80.
- CHOMCZYNSKI P AND SACCHI N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162: 156-159.
- CHOPRA IJ AND CHUA TECO GN. 1982. Characteristics of inner ring (3 or 5) monodeiodination of 3,5-diiodothyronine in rat liver: evidence suggesting marked similarities of inner and outer ring deiodinases for iodothyronines. *Endocrinology* 110: 89-97.
- CHOPRA IJ, HUANG TS, HURD RE AND SOLOMON DH. 1984. Effect of 3,5,3'-triiodothyronine-induced hyperthyroidism on iodothyronine metabolism in the rat: evidence for tissue differences in metabolic responses. *Endocrinology* 114: 1454-1459.
- CHRISTENSEN HN, HESS B AND RIGGS TR. 1954. Concentration of taurine, beta-alanine, and triiodothyronine by ascites carcinoma cells. *Cancer research* 14: 124-127.
- CIMMINO M, MION F, GOGLIA F, MINAIRE Y AND GELOEN A. 1996. Demonstration of in vivo metabolic effects of 3,5-di-iodothyronine. *The Journal of endocrinology* 149: 319-325.
- CIOFFI F, SENESE R, LANNI A AND GOGLIA F. 2013. Thyroid hormones and mitochondria: With a brief look at derivatives and analogues. *Molecular and cellular endocrinology*.
- COHEN J, AROESTY JM AND ROSENFELD MG. 1966. Determinants of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation research* 18: 388-397.
- COLLINS S, MARTIN TL, SURWIT RS AND ROBIDOUX J. 2004. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 81: 243-248.
- COPPOLA A ET AL. 2007. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell metabolism* 5: 21-33.
- COPPOLA M, CIOFFI F, MORENO M, GOGLIA F AND SILVESTRI E. 2016. 3,5-diiodo-L-thyronine: A Possible Pharmacological Agent? *Curr Drug Deliv* 13: 330-338.
- COPPOLA M, GLINNI D, MORENO M, CIOFFI F, SILVESTRI E AND GOGLIA F. 2014. Thyroid hormone analogues and derivatives: Actions in fatty liver. *World journal of hepatology* 6: 114-129.
- COX EJ AND MARSH SA. 2014. A systematic review of fetal genes as biomarkers of cardiac hypertrophy in rodent models of diabetes. *PloS one* 9: e92903.
- CROTEAU W, DAVEY JC, GALTON VA AND ST GERMAIN DL. 1996. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *The Journal of clinical investigation* 98: 405-417.

- D'AREZZO S, INCERPI S, DAVIS FB, ACCONCIA F, MARINO M, FARIAS RN AND DAVIS PJ. 2004. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology* 145: 5694-5703.
- DANZI S AND KLEIN I. 2012. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *The Medical clinics of North America* 96: 257-268.
- DARRAS VM AND VAN HERCK SL. 2012. Iodothyronine deiodinase structure and function: from ascidians to humans. *The Journal of endocrinology* 215: 189-206.
- DAVIS PJ, DAVIS FB AND LAWRENCE WD. 1989. Thyroid hormone regulation of membrane Ca²⁺(+)-ATPase activity. *Endocr Res* 15: 651-682.
- DAVIS PJ, GOGLIA F AND LEONARD JL. 2016. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nature reviews Endocrinology* 12: 111-121.
- DE ANGELIS M, GIESERT F, FINAN B, CLEMMENSEN C, MULLER TD, VOGT-WEISENHORN D, TSCHOP MH AND SCHRAMM KW. 2016. Determination of thyroid hormones in mouse tissues by isotope-dilution microflow liquid chromatography-mass spectrometry method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1033-1034: 413-420.
- DE DEKEN X, WANG D, DUMONT JE AND MIOT F. 2002. Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res* 273: 187-196.
- DE LANGE P ET AL. 2011. Nonthyrototoxic prevention of diet-induced insulin resistance by 3,5-diiodo-L-thyronine in rats. *Diabetes* 60: 2730-2739.
- DELIC D, GAILUS N, VOHR HW, DKHIL M, AL-QURAI SHY S AND WUNDERLICH F. 2010. Testosterone-induced permanent changes of hepatic gene expression in female mice sustained during *Plasmodium chabaudi* malaria infection. *Journal of molecular endocrinology* 45: 379-390.
- DI COSMO C, LIAO XH, DUMITRESCU AM, PHILP NJ, WEISS RE AND REFETOFF S. 2010. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *The Journal of clinical investigation* 120: 3377-3388.
- DILLMANN WH. 1990. Biochemical Basis of Thyroid-Hormone Action in the Heart. *Am J Med* 88: 626-630.
- DO IMPERIO GE, RAMOS IP, SANTIAGO LA, PEREIRA GF, DOS SANTOS ALMEIDA NA, FUZIWARA CS, PAZOS-MOURA CC, KIMURA ET, OLIVARES EL AND ORTIGA-CARVALHO TM. 2015. The Impact of a Non-Functional Thyroid Receptor Beta upon Triiodotironine-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 37: 477-490.
- DOCTER R, KRENNING EP, BOS G, FEKKES DF AND HENNEMANN G. 1982. Evidence that the uptake of tri-iodo-L-thyronine by human erythrocytes is carrier-mediated but not energy-dependent. *The Biochemical journal* 208: 27-34.
- DONATO MT, LAHOZ A, JIMENEZ N, PEREZ G, SERRALTA A, MIR J, CASTELL JV AND GOMEZ-LECHON MJ. 2006. Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34: 1556-1562.
- DONG H, YAUK CL, WILLIAMS A, LEE A, DOUGLAS GR AND WADE MG. 2007. Hepatic gene expression changes in hypothyroid juvenile mice: characterization of a novel negative thyroid-responsive element. *Endocrinology* 148: 3932-3940.
- DORN GW, 2ND. 2007. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 49: 962-970.
- DRIESEN RB ET AL. 2009. Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *Journal of cellular and molecular medicine* 13: 896-908.
- DUPUY C, OHAYON R, VALENT A, NOEL-HUDSON MS, DEME D AND VIRION A. 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *The Journal of biological chemistry* 274: 37265-37269.
- ECKEL J, RAO GS, RAO ML AND BREUER H. 1979. Uptake of L-tri-iodothyronine by isolated rat liver cells. A process partially inhibited by metabolic inhibitors; attempts to distinguish between uptake and binding to intracellular proteins. *The Biochemical journal* 182: 473-491.
- EGHBALI M, CZAJA MJ, ZEYDEL M, WEINER FR, ZERN MA, SEIFTER S AND BLUMENFELD OO. 1988. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 20: 267-276.
- EICKHOFF W 2012. *Die Schilddrüse: Morphologie, Funktion und Klinik*. n. Softcover reprint of the original 1st ed. 1965: Springer Berlin, 232 p.
- EKINS R. 1992. The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clinical chemistry* 38: 1289-1293.
- EKINS S, VANDENBRANDEN M, RING BJ, GILLESPIE JS, YANG TJ, GELBOIN HV AND WRIGHTON SA. 1998. Further characterization of the expression in liver and catalytic activity of CYP2B6. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286: 1253-1259.

- ENGELS K, RAKOV H, ZWANZIGER D, HONES GS, REHDE M, BRIX K, KOHRLE J, MOLLER LC AND FUHRER D. 2016. Efficacy of protocols for induction of chronic hyperthyroidism in male and female mice. *Endocrine*.
- ENGLER D AND BURGER AG. 1984. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocrine reviews* 5: 151-184.
- ERION MD ET AL. 2007. Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 15490-15495.
- ESCOBAR-MORREALE HF, ESCOBAR DEL REY F AND MORREALE DE ESCOBAR G. 1997. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 138: 4485-4488.
- EVANS WE AND RELLING MV. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, NY)* 286: 487-491.
- EVERTS ME, VISSER TJ, MOERINGS EP, TEMPELAARS AM, VAN TOOR H, DOCTER R, DE JONG M, KRENNING EP AND HENNEMANN G. 1995. Uptake of 3,3',5,5'-tetraiodothyroacetic acid and 3,3',5'-triiodothyronine in cultured rat anterior pituitary cells and their effects on thyrotropin secretion. *Endocrinology* 136: 4454-4461.
- FABER J, KIRKEGAARD C, LUMHOLTZ IB, SIERSBAEK-NIELSEN K AND FRIIS T. 1982. Simultaneous measurement of 3,5-diiiodothyronine and 3,5,3'-triiodothyronine turnover kinetics in euthyroid hyperthyroid, and hypothyroid subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 55: 8-12.
- FEKETE C AND LECHAN RM. 2014. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine reviews* 35: 159-194.
- FENG X, JIANG Y, MELTZER P AND YEN PM. 2000. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 14: 947-955.
- FORREST D AND VENNSTROM B. 2000. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 10: 41-52.
- FU ZD, CSANAKY IL AND KLAASSEN CD. 2012. Effects of aging on mRNA profiles for drug-metabolizing enzymes and transporters in livers of male and female mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40: 1216-1225.
- FU ZD AND KLAASSEN CD. 2014. Short-term calorie restriction feminizes the mRNA profiles of drug metabolizing enzymes and transporters in livers of mice. *Toxicology and applied pharmacology* 274: 137-146.
- GABBI C, WARNER M AND GUSTAFSSON J-Å. 2014. Action mechanisms of Liver X Receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 446: 647-650.
- GALLOU-KABANI C, VIGE A, GROSS MS, RABES JP, BOILEAU C, LARUE-ACHAGIOTIS C, TOME D, JAIS JP AND JUNIEN C. 2007. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 15: 1996-2005.
- GAO J, HE J, ZHAI Y, WADA T AND XIE W. 2009. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *The Journal of biological chemistry* 284: 25984-25992.
- GARCIA GC, LOPEZ-BOJORQUEZ L, NUNEZ J, VALVERDE RC AND OROZCO A. 2007. 3,5-Diiiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor beta 1 in the killifish. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 293: R877-883.
- GEREBEN B, ZEOLD A, DENTICE M, SALVATORE D AND BIANCO AC. 2008. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 65: 570-590.
- GHATPANDE S, GOSWAMI S, MASCARENO E AND SIDDIQUI MA. 1999. Signal transduction and transcriptional adaptation in embryonic heart development and during myocardial hypertrophy. *Molecular and cellular biochemistry* 196: 93-97.
- GHOSE R, OMOLUABI O, GANDHI A, SHAH P, STROHACKER K, CARPENTER KC, MCFARLIN B AND GUO T. 2011. Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life sciences* 89: 57-64.
- GLOSS B ET AL. 2001. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology* 142: 544-550.
- GNOCCI D, STEFFENSEN KR, BRUSCALUPI G AND PARINI P. 2016. Emerging role of thyroid hormone metabolites. *Acta physiologica*.
- GNONI GV, ROCHIRA A, LEONE A, DAMIANO F, MARSIGLIANTE S AND SICULELLA L. 2012. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine induces SREBP-1 expression by non-genomic actions in human HEP G2 cells. *Journal of cellular physiology* 227: 2388-2397.
- GOGLIA F. 2014. The effects of 3,5-diiiodothyronine on energy balance. *Frontiers in physiology* 5: 528.
- GOGLIA F, LANNI A, HORST C, MORENO M AND THOMA R. 1994. In vitro binding of 3,5-di-iodo-L-thyronine to rat liver mitochondria. *Journal of molecular endocrinology* 13: 275-282.

- GOGLIA F, TORRESANI J, BUGLI P, BARLETTA A AND LIVERINI G. 1981. In vitro binding of triiodothyronine to rat liver mitochondria. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 390: 120-124.
- GOLDBERG IJ, HUANG LS, HUGGINS LA, YU S, NAGAREDDY PR, SCANLAN TS AND EHRENKRANZ JR. 2012. Thyroid hormone reduces cholesterol via a non-LDL receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 153: 5143-5149.
- GOLDNER J. 1938. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol* 14: 237-243.
- GONZALEZ-MANCHON C, BUTTA N, FERRER M, AYUSO MS AND PARRILLA R. 1997. Molecular cloning and functional characterization of the human cytosolic malic enzyme promoter: thyroid hormone responsiveness. *DNA and cell biology* 16: 533-544.
- GONZÁLEZ CR, MARTÍNEZ DE MORENTIN PB, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ N, GÓMEZ-DÍAZ C, LAGE R, VARELA L, DIÉGUEZ C, NOGUEIRAS R, CASTAÑO JP AND LÓPEZ M. 2012. Hyperthyroidism differentially regulates neuropeptide S system in the rat brain. *Brain Research* 1450: 40-48.
- GRASSELLI E, VOICI A, DEMORI I, CANESI L, DE MATTEIS R, GOGLIA F, LANNI A, GALLO G AND VERGANI L. 2012. 3,5-Diiodo-L-thyronine modulates the expression of genes of lipid metabolism in a rat model of fatty liver. *The Journal of endocrinology* 212: 149-158.
- GULLBERG H, RUDLING M, FORREST D, ANGELIN B AND VENNSTROM B. 2000. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 14: 1739-1749.
- GUO Y, CUI JY, LU H AND KLAASSEN CD. 2016. Effect of nine diets on mRNAs of phase-II conjugation enzymes in livers of mice. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*: 1-10.
- GUO Y ET AL. 2013. Quantitative proteomic and functional analysis of liver mitochondria from high fat diet (HFD) diabetic mice. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12: 3744-3758.
- GUO Y ET AL. 2007. In silico and in vitro pharmacogenetic analysis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 17735-17740.
- GUSTAFSON TA, BAHL JJ, MARKHAM BE, ROESKE WR AND MORKIN E. 1987. Hormonal regulation of myosin heavy chain and alpha-actin gene expression in cultured fetal rat heart myocytes. *The Journal of biological chemistry* 262: 13316-13322.
- GUSTAFSON TA, MARKHAM BE AND MORKIN E. 1986. Effects of thyroid hormone on alpha-actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat: measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. *Circulation research* 59: 194-201.
- HAMPL R, KANCHEVA R, HILL M, BICIKOVA M AND VONDRA K. 2003. Interpretation of sex hormone-binding globulin levels in thyroid disorders. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 13: 755-760.
- HARPER ME AND SEIFERT EL. 2008. Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 18: 145-156.
- HASHIMOTO K, MATSUMOTO S, YAMADA M, SATOH T AND MORI M. 2007. Liver X receptor-alpha gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* 148: 4667-4675.
- HASHIMOTO K, YAMADA M, MATSUMOTO S, MONDEN T, SATOH T AND MORI M. 2006. Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* 147: 4292-4302.
- HASHIZUME K, MIYAMOTO T, KOBAYASHI M, SUZUKI S, ICHIKAWA K, YAMAUCHI K, OHTSUKA H AND TAKEDA T. 1989. Cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (CTBP) regulation of nuclear T3 binding: evidence for the presence of T3-CTBP complex-binding sites in nuclei. *Endocrinology* 124: 2851-2856.
- HAYES JD, FLANAGAN JU AND JOWSEY IR. 2005. Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45: 51-88.
- HERNANDEZ-PUGA G, MENDOZA A, LEON-DEL-RIO A AND OROZCO A. 2017. Jab1 is a T2-dependent coactivator or a T3-dependent corepressor of TRB1 mediated gene regulation. *The Journal of endocrinology*.
- HESCHELER J, MEYER R, PLANT S, KRAUTWURST D, ROSENTHAL W AND SCHULTZ G. 1991. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation research* 69: 1476-1486.
- HOEFIG CS, WUENSCH T, RIJNTJES E, LEHMPHUL I, DANIEL H, SCHWEIZER U, MITTAG J AND KOHRLE J. 2015. Biosynthesis of 3-Iodothyronamine From T4 in Murine Intestinal Tissue. *Endocrinology* 156: 4356-4364.
- HOLLENBERG AN, MONDEN T, FLYNN TR, BOERS ME, COHEN O AND WONDISFORD FE. 1995. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 9: 540-550.

- HORST C, HARNEIT A, SEITZ HJ AND ROKOS H. 1995. 3,5-Di-iodo-L-thyronine suppresses TSH in rats in vivo and in rat pituitary fragments in vitro. *The Journal of endocrinology* 145: 291-297.
- HORST C, ROKOS H AND SEITZ HJ. 1989. Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine. *The Biochemical journal* 261: 945-950.
- HUANG CJ, GELLER HM, GREEN WL AND CRAELIUS W. 1999. Acute effects of thyroid hormone analogs on sodium currents in neonatal rat myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31: 881-893.
- HUO L AND SCARPULLA RC. 2001. Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Molecular and cellular biology* 21: 644-654.
- IANCULESCU AG, FRIESEMA EC, VISSER TJ, GIACOMINI KM AND SCANLAN TS. 2010. Transport of thyroid hormones is selectively inhibited by 3-iodothyronamine. *Molecular bioSystems* 6: 1403-1410.
- INCERPI S, DE VITO P, LULY P, SPAGNUOLO S AND LEONI S. 2002. Short-term effects of thyroid hormones and 3,5-diiodothyronine on membrane transport systems in chick embryo hepatocytes. *Endocrinology* 143: 1660-1668.
- INCERPI S, LULY P, DE VITO P AND FARIAS RN. 1999. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: high molecular specificity for 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 140: 683-689.
- IOSCO C ET AL. 2014. Anoctamin 1 is apically expressed on thyroid follicular cells and contributes to ATP- and calcium-activated iodide efflux. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 34: 966-980.
- IRRCHEER I, WALKINSHAW DR, SHEEHAN TE AND HOOD DA. 2008. Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 104: 178-185.
- ITTERMANN T, DORR M, VOLZKE H, TOST F, LEHMPHUL I, KOHRLE J AND JURGENS C. 2014. High serum thyrotropin levels are associated with retinal arteriolar narrowing in the general population. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 24: 1473-1478.
- JACKSON JP, FERGUSON SS, MOORE R, NEGISHI M AND GOLDSTEIN JA. 2004. The constitutive active/androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2c29. *Molecular pharmacology* 65: 1397-1404.
- JARUKAMJORN K, SAKUMA T AND NEMOTO N. 2000. Discriminating activation of CYP2B9 expression in male C57BL/6 mouse liver by beta-estradiol. *Biochemical and biophysical research communications* 279: 288-292.
- JIGOREL E, LE VEE M, BOURSIER-NEYRET C, PARMENTIER Y AND FARDEL O. 2006. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34: 1756-1763.
- JOHANSSON L, RUDLING M, SCANLAN TS, LUNDASEN T, WEBB P, BAXTER J, ANGELIN B AND PARINI P. 2005. Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 10297-10302.
- JONAS W, LIETZOW J, WOHLGEMUTH F, HOEFIG CS, WIEDMER P, SCHWEIZER U, KOHRLE J AND SCHURMANN A. 2015. 3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-t2) exerts thyromimetic effects on hypothalamus-pituitary-thyroid axis, body composition, and energy metabolism in male diet-induced obese mice. *Endocrinology* 156: 389-399.
- JONES RD, TAYLOR AM, TONG EY AND REPA JJ. 2013. Carboxylesterases are uniquely expressed among tissues and regulated by nuclear hormone receptors in the mouse. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 41: 40-49.
- JOSEPH DR, HALL SH AND FRENCH FS. 1987. Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 339-343.
- JUMP DB, NARAYAN P, TOWLE H AND OPPENHEIMER JH. 1984. Rapid effects of triiodothyronine on hepatic gene expression. Hybridization analysis of tissue-specific triiodothyronine regulation of mRNAs14. *The Journal of biological chemistry* 259: 2789-2797.
- KADENBACH B, HUTTEMANN M, ARNOLD S, LEE I AND BENDER E. 2000. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free radical biology & medicine* 29: 211-221.
- KALYANARAMAN H ET AL. 2014. Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Science signaling* 7: ra48.
- KIMES BW AND BRANDT BL. 1976. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res* 98: 349-366.

- KINUGAWA K, YONEKURA K, RIBEIRO RC, ETO Y, AOYAGI T, BAXTER JD, CAMACHO SA, BRISTOW MR, LONG CS AND SIMPSON PC. 2001. Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circulation research* 89: 591-598.
- KISS E, JAKAB G, KRANIAS EG AND EDES I. 1994. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport and myocardial relaxation. *Circulation research* 75: 245-251.
- KITTERINGHAM NR ET AL. 2010. Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *J Proteomics* 73: 1612-1631.
- KLEIN I AND HONG C. 1986. Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. *The Journal of clinical investigation* 77: 1694-1698.
- KLEIN I AND OJAMAA K. 2001. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *The New England journal of medicine* 344: 501-509.
- KOHRLE J. 1999. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Molecular and cellular endocrinology* 151: 103-119.
- KOHRLE J. 2002. Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347: 125-167.
- KONG WM, MARTIN NM, SMITH KL, GARDINER JV, CONNOLEY IP, STEPHENS DA, DHILLO WS, GHATEI MA, SMALL CJ AND BLOOM SR. 2004. Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology* 145: 5252-5258.
- KRENZ M AND ROBBINS J. 2004. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *Journal of the American College of Cardiology* 44: 2390-2397.
- KUIPER GG, KESTER MH, PEETERS RP AND VISSER TJ. 2005. Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 15: 787-798.
- KWAN KC. 1997. Oral bioavailability and first-pass effects. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 25: 1329-1336.
- LABRIE F, LUU-THE V, LABRIE C AND SIMARD J. 2001. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Frontiers in neuroendocrinology* 22: 185-212.
- LANNI A, CIMMINO M, MORENO M, DELLI GATTI A, GINESTRA A AND GOGLIA F. 1995. Relationship between dose, mode of administration and effects of triiodothyronine on two hepatic responsive enzymes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 27: 314-317.
- LANNI A, MORENO M, CIOFFI M AND GOGLIA F. 1992. Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver oxidative capacity. *Molecular and cellular endocrinology* 86: 143-148.
- LANNI A ET AL. 2005. 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19: 1552-1554.
- LANNI A, MORENO M, LOMBARDI A AND GOGLIA F. 1994. Rapid stimulation in vitro of rat liver cytochrome oxidase activity by 3,5-diiodo-L-thyronine and by 3,3'-diiodo-L-thyronine. *Molecular and cellular endocrinology* 99: 89-94.
- LANNI A, MORENO M, LOMBARDI A AND GOGLIA F. 1996. Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *The Journal of physiology* 494 (Pt 3): 831-837.
- LE BOUTER S ET AL. 2003. Microarray analysis reveals complex remodeling of cardiac ion channel expression with altered thyroid status: relation to cellular and integrated electrophysiology. *Circulation research* 92: 234-242.
- LE VEE M, GRIPON P, STIEGER B AND FARDEL O. 2008. Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36: 217-222.
- LEASK A AND ABRAHAM DJ. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 816-827.
- LECHAN RM, QI Y, JACKSON IM AND MAHDAVI V. 1994. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 135: 92-100.
- LEHMPHUL I, BRABANT G, WALLASCHOFSKI H, RUCHALA M, STRASBURGER CJ, KOEHRLE J AND WU Z. 2014. Detection of 3,5-diiodothyronine in sera of patients with altered thyroid status using a new monoclonal antibody based chemiluminescence immunoassay. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 24(9): 1350-1360.
- LEI J, MARIASH CN AND INGBAR DH. 2004. 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *The Journal of biological chemistry* 279: 47589-47600.
- LEONARD JL AND ROSENBERG IN. 1978. Thyroxine 5'-deiodinase activity of rat kidney: observations on activation by thiols and inhibition by propylthiouracil. *Endocrinology* 103: 2137-2144.

- LIETZOW J, GOLCHERT J, HOMUTH G, VOLKER U, JONAS W AND KOHRLE J. 2016. 3,5-T₂ alters murine genes relevant for xenobiotic, steroid, and thyroid hormone metabolism. *Journal of molecular endocrinology* 56: 311-323.
- LIN HY, DAVIS FB, GORDINIER JK, MARTINO LJ AND DAVIS PJ. 1999. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *The American journal of physiology* 276: C1014-1024.
- LIN HY, SUN M, TANG HY, LIN C, LUIDENS MK, MOUSA SA, INCERPI S, DRUSANO GL, DAVIS FB AND DAVIS PJ. 2009. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American journal of physiology Cell physiology* 296: C980-991.
- LIN S, THOMAS TC, STORLIEN LH AND HUANG XF. 2000. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 24: 639-646.
- LIVAK KJ AND SCHMITTGEN TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- LÖFFLER GP, E. P. 2014. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 1073 p.
- LOMBARDI A, BENEDEUCE L, MORENO M, DIANO S, COLANTUONI V, URSINI MV, LANNI A AND GOGLIA F. 2000. 3,5-diiodo-L-thyronine regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the rat. *Endocrinology* 141: 1729-1734.
- LOMBARDI A, DE LANGE P, SILVESTRI E, BUSIELLO RA, LANNI A, GOGLIA F AND MORENO M. 2009. 3,5-Diiodo-L-thyronine rapidly enhances mitochondrial fatty acid oxidation rate and thermogenesis in rat skeletal muscle: AMP-activated protein kinase involvement. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296: E497-502.
- LOMBARDI A, LANNI A, DE LANGE P, SILVESTRI E, GRASSO P, SENESE R, GOGLIA F AND MORENO M. 2007. Acute administration of 3,5-diiodo-L-thyronine to hypothyroid rats affects bioenergetic parameters in rat skeletal muscle mitochondria. *FEBS letters* 581: 5911-5916.
- LOMBARDI A, SENESE R, DE MATTEIS R, BUSIELLO RA, CIOFFI F, GOGLIA F AND LANNI A. 2015. 3,5-diiodo-L-thyronine activates brown adipose tissue thermogenesis in hypothyroid rats. *PloS one* 10: e0116498.
- LORBEEK G, LEWINSKA M AND ROZMAN D. 2012. Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids--from mouse models to human diseases. *The FEBS journal* 279: 1516-1533.
- LORBEEK G, PERSE M, HORVAT S, BJORKHEM I AND ROZMAN D. 2013. Sex differences in the hepatic cholesterol sensing mechanisms in mice. *Molecules (Basel, Switzerland)* 18: 11067-11085.
- LU H, GUNWARDENA S, CUI JY, YOO B, ZHONG XB AND KLAASSEN CD. 2013. RNA-sequencing quantification of hepatic ontogeny and tissue distribution of mRNAs of phase II enzymes in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 41: 844-857.
- LUO L AND MACLEAN DB. 2003. Effects of thyroid hormone on food intake, hypothalamic Na/K ATPase activity and ATP content. *Brain Res* 973: 233-239.
- LUSS I ET AL. 1999. Expression of cardiac calcium regulatory proteins in atrium v ventricle in different species. *Journal of molecular and cellular cardiology* 31: 1299-1314.
- LUU-THE V AND LABRIE F. 2010. The intracrine sex steroid biosynthesis pathways. *Progress in brain research* 181: 177-192.
- MACCHIA PE ET AL. 2001. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 349-354.
- MAHER JM, SLITT AL, CHERRINGTON NJ, CHENG X AND KLAASSEN CD. 2005. Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33: 947-955.
- MAIA AL, KIEFFER JD, HARNEY JW AND LARSEN PR. 1995. Effect of 3,5,3'-Triiodothyronine (T₃) administration on *dio1* gene expression and T₃ metabolism in normal and type 1 deiodinase-deficient mice. *Endocrinology* 136: 4842-4849.
- MAILLET M, VAN BERLO JH AND MOLKENTIN JD. 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature reviews Molecular cell biology* 14: 38-48.
- MAKINO A, SUAREZ J, WANG H, BELKE DD, SCOTT BT AND DILLMANN WH. 2009. Thyroid hormone receptor-beta is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 150: 2008-2015.
- MANCINI A, DI SEGNI C, RAIMONDO S, OLIVIERI G, SILVESTRINI A, MEUCCI E AND CURRO D. 2016. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators of inflammation* 2016: 6757154.
- MANGIULLO R, GNONI A, DAMIANO F, SICULELLA L, ZANOTTI F, PAPA S AND GNONI GV. 2010. 3,5-diiodo-L-thyronine upregulates rat-liver mitochondrial F(o)F(1)-ATP synthase by GA-binding protein/nuclear respiratory factor-2. *Biochimica et biophysica acta* 1797: 233-240.

- MARAN RR. 2003. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Arch Androl* 49: 375-388.
- MARIASH CN, KAISER FE AND OPPENHEIMER JH. 1980. Comparison of the response characteristics of four lipogenic enzymes to 3,5,3'-triiodothyronine administration: evidence for variable degrees of amplification of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine signal. *Endocrinology* 106: 22-27.
- MAXWELL KN, SOCCIO RE, DUNCAN EM, SEHAYEK E AND BRESLOW JL. 2003. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *Journal of lipid research* 44: 2109-2119.
- MAYER Y, CZOSNEK H, ZEELON PE, YAFFE D AND NUDEL U. 1984. Expression of the genes coding for the skeletal muscle and cardiac actions in the heart. *Nucleic acids research* 12: 1087-1100.
- MCANINCH EA AND BIANCO AC. 2014. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1311: 77-87.
- MCCARVER DG AND HINES RN. 2002. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300: 361-366.
- MEAKIN PJ, CHOWDHRY S, SHARMA RS, ASHFORD FB, WALSH SV, MCCRIMMON RJ, DINKOVA-KOSTOVA AT, DILLON JF, HAYES JD AND ASHFORD ML. 2014. Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes, but not with insulin resistance. *Molecular and cellular biology*.
- MEINHOLD H, GRAMM HJ, MEISSNER W, ZIMMERMANN J, SCHWANDER J, DENNHARDT R AND VOIGT K. 1991. Elevated serum diiodotyrosine (DIT) in severe infections and sepsis: DIT, a possible new marker of leukocyte activity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 72: 945-953.
- MEISCHL C ET AL. 2008. H9c2 cardiomyoblasts produce thyroid hormone. *American journal of physiology Cell physiology* 294: C1227-1233.
- MENDOZA CA, NAVARRETE-RAMIREZ P, HERNANDEZ-PUGA G, VILLALOBOS P, HOLZER G, RENAUD JP, LAUDET V AND OROZCO A. 2013. 3,5-T₂ is an Alternative Ligand for the Thyroid Hormone Receptor beta1. *Endocrinology* 154: 2948-2958.
- MIAO Y, WU W, DAI Y, MANEIX L, HUANG B, WARNER M AND GUSTAFSSON JA. 2015. Liver X receptor beta controls thyroid hormone feedback in the brain and regulates browning of subcutaneous white adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 14006-14011.
- MINERS JO AND MACKENZIE PI. 1991. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacology & therapeutics* 51: 347-369.
- MIOT F, DUPUY C, DUMONT J AND ROUSSET B 2000. Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. In: DE GROOT, LJ ET AL. (Eds.) *Endotext*, South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- MOELLER LC, DUMITRESCU AM AND REFETTOFF S. 2005. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 19: 2955-2963.
- MOLLICA MP, LIONETTI L, MORENO M, LOMBARDI A, DE LANGE P, ANTONELLI A, LANNI A, CAVALIERE G, BARLETTA A AND GOGLIA F. 2009. 3,5-diiodo-L-thyronine, by modulating mitochondrial functions, reverses hepatic fat accumulation in rats fed a high-fat diet. *Journal of hepatology* 51: 363-370.
- MONDAL S, RAJA K, SCHWEIZER U AND MUGESH G. 2016. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. *Angewandte Chemie (International ed in English)* 55: 7606-7630.
- MORENO M, DE LANGE P, LOMBARDI A, SILVESTRI E, LANNI A AND GOGLIA F. 2008. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 18: 239-253.
- MORENO M, LANNI A, LOMBARDI A AND GOGLIA F. 1997. How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *The Journal of physiology* 505 (Pt 2): 529-538.
- MORENO M, LOMBARDI A, BENEDEUCE L, SILVESTRI E, PINNA G, GOGLIA F AND LANNI A. 2002. Are the effects of T₃ on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T₃ itself? *Endocrinology* 143: 504-510.
- MORENO M, LOMBARDI A, LOMBARDI P, GOGLIA F AND LANNI A. 1998. Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone and growth hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life sciences* 62: 2369-2377.
- MORENO M ET AL. 2011. 3,5-Diiodo-L-thyronine prevents high-fat-diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle through metabolic and structural adaptations. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25: 3312-3324.
- MRÁČEK T, DRAHOTA Z AND HOUŠTĚK J. 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827: 401-410.

- MULLUR R, LIU YY AND BRENT GA. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews* 94: 355-382.
- NARAYANASWAMI V AND DWOSKIN LP. 2017. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacology & therapeutics* 170: 116-147.
- NAVARRETE-RAMIREZ P, LUNA M, VALVERDE RC AND OROZCO A. 2014. 3,5-di-iodothyronine stimulates tilapia growth through an alternate isoform of thyroid hormone receptor beta1. *Journal of molecular endocrinology* 52: 1-9.
- NCD-RISC. 2016. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet (London, England)* 387: 1377-1396.
- NEMOTO K, IKEDA A, ITO S, MIYATA M, YOSHIDA C AND DEGAWA M. 2013. Comparison of constitutive gene expression levels of hepatic cholesterol biosynthetic enzymes between Wistar-Kyoto and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biological & pharmaceutical bulletin* 36: 1216-1220.
- NILSSON ME ET AL. 2015. Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology* 156: 2492-2502.
- NISHIKIMI T, KUWAHARA K AND NAKAO K. 2011. Current biochemistry, molecular biology, and clinical relevance of natriuretic peptides. *J Cardiol* 57: 131-140.
- NOSHIRO M AND NEGISHI M. 1988. Genetic regulation of estrogen-dependent repression of female-specific testosterone 16 alpha-hydroxylase (I-P-450(16 alpha) in male mouse liver: murine Ripr locus. *Biochemistry-U S* 27: 6444-6448.
- O'REILLY I AND MURPHY MP. 1992. Treatment of hypothyroid rats with T2 (3,5-di-iodo-L-thyronine) rapidly stimulates respiration in subsequently isolated mitochondria. *Biochem Soc Trans* 20: 59S.
- OH SS AND KAPLAN ML. 1994. Early treatment of obese (ob/ob) mice with triiodothyronine increases oxygen consumption and temperature and decreases body fat content. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 207: 260-267.
- OJAMAA K. 2010. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Vascular pharmacology* 52: 113-119.
- OOE H, KON J, OSHIMA H AND MITAKA T. 2009. Thyroid hormone is necessary for expression of constitutive androstane receptor in rat hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 37: 1963-1969.
- OPPENHEIMER JH. 1972. Thyroid hormones in liver. *Mayo Clinic proceedings* 47: 854-863.
- OROZCO A, NAVARRETE-RAMIREZ P, OLVERA A AND GARCIA GC. 2014. 3,5-Diiodothyronine (T2) is on a Role. A New Hormone in Search of Recognition. *General and comparative endocrinology*.
- PADRON AS, NETO RA, PANTALEAO TU, DE SOUZA DOS SANTOS MC, ARAUJO RL, DE ANDRADE BM, DA SILVA LEANDRO M, DE CASTRO JP, FERREIRA AC AND DE CARVALHO DP. 2014. Administration of 3,5-diiodothyronine (3,5-T2) causes central hypothyroidism and stimulates thyroid-sensitive tissues. *The Journal of endocrinology* 221: 415-427.
- PANTOS C, MOUROUZIS I AND COKKINOS DV. 2011. New insights into the role of thyroid hormone in cardiac remodeling: time to reconsider? *Heart failure reviews* 16: 79-96.
- PARK EA, SONG S, VINSON C AND ROESLER WJ. 1999. Role of CCAAT enhancer-binding protein beta in the thyroid hormone and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 274: 211-217.
- PEET DJ, JANOWSKI BA AND MANGELSDORF DJ. 1998. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 8: 571-575.
- PERELLO M, CAKIR I, CYR NE, ROMERO A, STUART RC, CHIAPPINI F, HOLLENBERG AN AND NILLNI EA. 2010. Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 299: E976-989.
- PERRIN BJ AND ERVASTI JM. 2010. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67: 630-634.
- PESSEMESSE L, LEPOURRY L, BOUTON K, LEVIN J, CABELLO G, WRUTNIAK-CABELLO C AND CASAS F. 2014. p28, a truncated form of TRalpha1 regulates mitochondrial physiology. *FEBS letters* 588: 4037-4043.
- PETTY KJ, DESVERGNE B, MITSUHASHI T AND NIKODEM VM. 1990. Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. *The Journal of biological chemistry* 265: 7395-7400.
- PFÄFFL MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45.
- PIEHL S. 2008. The roles of deiodinases in thyronamine biology. Humboldt-Universität zu Berlin.
- PIEHL S, HEBERER T, BALIZS G, SCANLAN TS AND KOHRLE J. 2008. Development of a validated liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the distinction of thyronine and thyronamine constitutional isomers and for the identification of new deiodinase substrates. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 22: 3286-3296.

- PIETZNER M, HOMUTH G, BUDDÉ K, LEHMPHUL I, VOLKER U, VOLZKE H, NAUCK M, KOHRLE J AND FRIEDRICH N. 2015a. Urine Metabolomics by (1)H-NMR Spectroscopy Indicates Associations between Serum 3,5-T₂ Concentrations and Intermediary Metabolism in Euthyroid Humans. *Eur Thyroid J* 4: 92-100.
- PIETZNER M ET AL. 2015b. Translating pharmacological findings from hypothyroid rodents to euthyroid humans: is there a functional role of endogenous 3,5-T₂? *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 25: 188-197.
- PIJL H ET AL. 2001. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86: 5848-5853.
- PINNA G, BRODEL O, VISSER T, JEITNER A, GRAU H, ERAVCI M, MEINHOLD H AND BAUMGARTNER A. 2002. Concentrations of seven iodothyronine metabolites in brain regions and the liver of the adult rat. *Endocrinology* 143: 1789-1800.
- PINNA G ET AL. 1997. Elevated 3,5-Diiodothyronine Concentrations in the Sera of Patients with Nonthyroidal Illnesses and Brain Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 1535-1542.
- PRAPUNPOJ P, RICHARDSON SJ, FUMAGALLI L AND SCHREIBER G. 2000. The evolution of the thyroid hormone distributor protein transthyretin in the order insectivora, class mammalia. *Molecular biology and evolution* 17: 1199-1209.
- PRATT-HYATT M, LICKTEIG AJ AND KLAASSEN CD. 2013. Tissue distribution, ontogeny, and chemical induction of aldo-keto reductases in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 41: 1480-1487.
- RABOLLI D AND MARTIN RJ. 1977. Effects of diet composition on serum levels of insulin, thyroxine, triiodothyronine, growth hormone, and corticosterone in rats. *J Nutr* 107: 1068-1074.
- RAGHOW R, YELLATURU C, DENG X, PARK EA AND ELAM MB. 2008. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19: 65-73.
- RAKOV H, ENGELS K, HONES GS, STRUCKSBERG KH, MOELLER LC, KOHRLE J, ZWANZIGER D AND FUHRER D. 2016. Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in mice. *Biol Sex Differ* 7: 36.
- RATHMANN D, RIJNTJES E, LIETZOW J AND KÖHRLE J. 2015. Quantitative Analysis of Thyroid Hormone Metabolites in Cell Culture Samples Using LC-MS/MS. *European Thyroid Journal* 4(suppl 1): 51-58.
- RAUCHOVA H, MRACEK T, NOVAK P, VOKURKOVA M AND SOUKUP T. 2011. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase expression and oxygen consumption in liver mitochondria of female and male rats with chronic alteration of thyroid status. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 43: 43-47.
- REFETOFF S. 2000. Thyroid Hormone Serum Transport Proteins. In: DE GROOT, LJ ET AL. (Eds.) *Endotext*, South Dartmouth (MA).
- REFETOFF S, ROBIN NI AND FANG VS. 1970. Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: a study of PBI, serum T₄, free T₄, and the pattern of T₄ and T₃ binding to serum proteins. *Endocrinology* 86: 793-805.
- REINEHR T, ISA A, DE SOUSA G, DIEFFENBACH R AND ANDLER W. 2008. Thyroid hormones and their relation to weight status. *Hormone research* 70: 51-57.
- REISCH AS AND ELPELEG O. 2007. Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods in cell biology* 80: 199-222.
- RENDINA-RUEDY E, HEMBREE KD, SASAKI A, DAVIS MR, LIGHTFOOT SA, CLARKE SL, LUCAS EA AND SMITH BJ. 2015. A Comparative Study of the Metabolic and Skeletal Response of C57BL/6J and C57BL/6N Mice in a Diet-Induced Model of Type 2 Diabetes. *J Nutr Metab* 2015: 758080.
- RENKO K, HOEFIG CS, HILLER F, SCHOMBURG L AND KOHRLE J. 2012. Identification of iopanoic acid as substrate of type 1 deiodinase by a novel nonradioactive iodide-release assay. *Endocrinology* 153: 2506-2513.
- REUTER TY. 2007. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models* 4: 3-8.
- REZEN T, TAMASI V, LOVGREN-SANDBLOM A, BJORKHEM I, MEYER UA AND ROZMAN D. 2009. Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers. *BMC genomics* 10: 384.
- RICHARDSON VM, STASKAL DF, ROSS DG, DILIBERTO JJ, DEVITO MJ AND BIRNBAUM LS. 2008. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicology and applied pharmacology* 226: 244-250.
- RIJNTJES E, WIJNTJES AT, SWARTS HJ, DE ROOIJ DG AND TEERDS KJ. 2008. Dietary-induced hyperthyroidism marginally affects neonatal testicular development. *J Androl* 29: 643-653.
- ROBBINS J AND RALL JE. 1960. Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiological reviews* 40: 415-489.

- ROCHIRA A, DAMIANO F, MARSIGLIANTE S, GNONI GV AND SICULELLA L. 2013. 3,5-Diiodo-L-thyronine induces SREBP-1 proteolytic cleavage block and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells. *Biochimica et biophysica acta*.
- ROMANQUE P, CORNEJO P, VALDES S AND VIDELA LA. 2011. Thyroid hormone administration induces rat liver Nrf2 activation: suppression by N-acetylcysteine pretreatment. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 21: 655-662.
- ROQUES BB, LEGHAIT J, LACROIX MZ, LASSERRE F, PINEAU T, VIGUIE C AND MARTIN PG. 2013. The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism. *Biochemical pharmacology* 86: 997-1039.
- RUNGE-MORRIS M, KOCAREK TA AND FALANY CN. 2013. Regulation of the cytosolic sulfotransferases by nuclear receptors. *Drug metabolism reviews* 45: 15-33.
- RUTGERS M, HEUSDENS FA AND VISSER TJ. 1991. Deiodination of iodothyronine sulfamates by type I iodothyronine deiodinase of rat liver. *Endocrinology* 129: 1375-1381.
- SABA A, CHIELLINI G, FRASCARELLI S, MARCHINI M, GHELARDONI S, RAFFAELLI A, TONACCHERA M, VITTI P, SCANLAN TS AND ZUCCHI R. 2010. Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology* 151: 5063-5073.
- SADOW PM, CHASSANDE O, GAUTHIER K, SAMARUT J, XU J, O'MALLEY BW AND WEISS RE. 2003. Specificity of thyroid hormone receptor subtype and steroid receptor coactivator-1 on thyroid hormone action. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284: E36-46.
- SAKAGUCHI Y, CUI G AND SEN L. 1996. Acute effects of thyroid hormone on inward rectifier potassium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Endocrinology* 137: 4744-4751.
- SAMUELS HH, TSAI JS AND CASANOVA J. 1974. Thyroid hormone action: in vitro demonstration of putative receptors in isolated nuclei and soluble nuclear extracts. *Science (New York, NY)* 184: 1188-1191.
- SANDELL EB AND KOLTHOFF IM. 1937. Micro determination of iodine by a catalytic method. *Mikrochim Acta* 1: 9-25.
- SCANLAN TS ET AL. 2004. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nature medicine* 10: 638-642.
- SCAPIN S, LEONI S, SPAGNUOLO S, FIORE AM AND INCERPI S. 2009. Short-term effects of thyroid hormones on Na⁺-K⁺-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction. *American journal of physiology Cell physiology* 296: C4-12.
- SCHMITTGEN TD AND LIVAK KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protocols* 3: 1101-1108.
- SCHOMBURG L, SCHWEIZER U AND KOHRLE J. 2004. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61: 1988-1995.
- SCHRADER M AND CARLBERG C. 1994. Thyroid hormone and retinoic acid receptors form heterodimers with retinoid X receptors on direct repeats, palindromes, and inverted palindromes. *DNA and cell biology* 13: 333-341.
- SCHREIBER G. 2002. The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. *The Journal of endocrinology* 175: 61-73.
- SCHUSSLER GC. 2000. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 10: 141-149.
- SCHWEIZER U AND KOHRLE J. 2013. Function of thyroid hormone transporters in the central nervous system. *Biochimica et biophysica acta* 1830: 3965-3973.
- SECHMAN A, PAWLOWSKA K AND HRABIA A. 2011. Effect of 3,3',5-triiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on progesterone production, cAMP synthesis, and mRNA expression of STAR, CYP11A1, and HSD3B genes in granulosa layer of chicken preovulatory follicles. *Domestic animal endocrinology* 41: 137-149.
- SEELIG S, LIAW C, TOWLE HC AND OPPENHEIMER JH. 1981. Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 4733-4737.
- SEGAL J AND INGBAR SH. 1984. An immediate increase in calcium accumulation by rat thymocytes induced by triiodothyronine: its role in the subsequent metabolic responses. *Endocrinology* 115: 160-166.
- SELVA DM AND HAMMOND GL. 2009. Thyroid hormones act indirectly to increase sex hormone-binding globulin production by liver via hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Journal of molecular endocrinology* 43: 19-27.
- SENESE R, LASALA P, LEANZA C AND DE LANGE P. 2014. New avenues for regulation of lipid metabolism by thyroid hormones and analogs. *Frontiers in physiology* 5: 475.
- SEOANE LM, CARRO E, TOVAR S, CASANUEVA FF AND DIEGUEZ C. 2000. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regulatory peptides* 92: 25-29.
- SEVIOR DK, PELKONEN O AND AHOKAS JT. 2012. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44: 257-261.

- SHANG GG, GAO P, ZHAO ZH, CHEN Q, JIANG T, ZHANG N AND LI H. 2013. 3,5-Diiodo-L-thyronine ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bba-Mol Basis Dis* 1832: 674-684.
- SHIN DJ AND OSBORNE TF. 2003. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2). *The Journal of biological chemistry* 278: 34114-34118.
- SILVA JE. 2006. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiological reviews* 86: 435-464.
- SILVA JE, GORDON MB, CRANTZ FR, LEONARD JL AND LARSEN PR. 1984. Qualitative and quantitative differences in the pathways of extrathyroidal triiodothyronine generation between euthyroid and hypothyroid rats. *The Journal of clinical investigation* 73: 898-907.
- SILVESTRI E ET AL. 2010. Pathways affected by 3,5-diiodo-L-thyronine in liver of high fat-fed rats: evidence from two-dimensional electrophoresis, blue-native PAGE, and mass spectrometry. *Molecular bioSystems* 6: 2256-2271.
- SMETANINA MA, PAKHARUKOVA MY, KURINNA SM, DONG B, HERNANDEZ JP, MOORE DD AND MERKULOVA TI. 2011. Ortho-aminoazotoluene activates mouse constitutive androstane receptor (mCAR) and increases expression of mCAR target genes. *Toxicology and applied pharmacology* 255: 76-85.
- SMITH TJ, DAVIS FB AND DAVIS PJ. 1992. Stereochemical requirements for the modulation by retinoic acid of thyroid hormone activation of Ca(2+)-ATPase and binding at the human erythrocyte membrane. *The Biochemical journal* 284 (Pt 2): 583-587.
- SONG Y ET AL. 2015. Thyroid-stimulating hormone regulates hepatic bile acid homeostasis via SREBP-2/HNF-4alpha/CYP7A1 axis. *Journal of hepatology* 62: 1171-1179.
- SPAULDING SW, SMITH TJ, HINKLE PM, DAVIS FB, KUNG MP AND ROTH JA. 1992. Studies on the biological activity of triiodothyronine sulfate. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 74: 1062-1067.
- STAUDINGER JL, WOODY S, SUN M AND CUI W. 2013. Nuclear-receptor-mediated regulation of drug- and bile-acid-transporter proteins in gut and liver. *Drug metabolism reviews* 45: 48-59.
- STERLING K, BRENNER MA AND SAKURADA T. 1980. Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo. *Science (New York, NY)* 210: 340-342.
- STRECKFUSS F, HAMANN I, SCHOMBURG L, MICHAELIS M, SAPIN R, KLEIN MO, KOHRLE J AND SCHWEIZER U. 2005. Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 337: 739-745.
- SUEYOSHI T, KAWAMOTO T, ZELKO I, HONKAKOSKI P AND NEGISHI M. 1999. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *The Journal of biological chemistry* 274: 6043-6046.
- SUH JH, SIEGLAFF DH, ZHANG A, XIA X, CVORO A, WINNIER GE AND WEBB P. 2013. SIRT1 is a direct coactivator of thyroid hormone receptor beta1 with gene-specific actions. *PloS one* 8: e70097.
- SUKHAI M, YONG A, KALITSKY J AND PIQUETTE-MILLER M. 2000. Inflammation and interleukin-6 mediate reductions in the hepatic expression and transcription of the *mdr1a* and *mdr1b* Genes. *Molecular cell biology research communications* : MCBRC 4: 248-256.
- SUZUKI S, SUZUKI N, MORI J, OSHIMA A, USAMI S AND HASHIZUME K. 2007. micro-Crystallin as an intracellular 3,5,3'-triiodothyronine holder in vivo. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 21: 885-894.
- SWANSON EA, GLOSS B, BELKE DD, KANESHIGE M, CHENG SY AND DILLMANN WH. 2003. Cardiac expression and function of thyroid hormone receptor beta and its PV mutant. *Endocrinology* 144: 4820-4825.
- TAKAHASHI Y, SOEJIMA Y AND FUKUSATO T. 2012. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology* : WJG 18: 2300-2308.
- TAKESHIGE K, SEKIDO T, KITAHARA J, OHKUBO Y, HIWATASHI D, ISHII H, NISHIO S, TAKEDA T, KOMATSU M AND SUZUKI S. 2014. Cytosolic T3-binding protein modulates dynamic alteration of T3-mediated gene expression in cells. *Endocrine journal* 61: 561-570.
- TATA JR, ERNSTER L, LINDBERG O, ARRHENIUS E, PEDERSEN S AND HEDMAN R. 1963. The action of thyroid hormones at the cell level. *The Biochemical journal* 86: 408-428.
- TEIXEIRA SD, FILGUEIRA C, SIEGLAFF DH, BENOD C, VILLAGOMEZ R, MINZE LJ, ZHANG A, WEBB P AND NUNES MT. 2016. 3,5-diodothyronine (3,5-T2) Reduces Blood Glucose Independently of Insulin Sensitization in Obese Mice. *Acta physiologica*.
- THALER MA, SEIFERT-KLAUSS V AND LUPPA PB. 2015. The biomarker sex hormone-binding globulin - from established applications to emerging trends in clinical medicine. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 29: 749-760.
- TIMSIT YE AND NEGISHI M. 2007. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* 72: 231-246.

- TOLSON AH AND WANG H. 2010. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Advanced drug delivery reviews* 62: 1238-1249.
- TOWBIN H, STAEHELIN T AND GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
- VAN BERLO JH, MAILLET M AND MOLKENTIN JD. 2013. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *The Journal of clinical investigation* 123: 37-45.
- VAN DER HEIDE SM, JOOSTEN BJ, DRAGT BS, EVERTS ME AND KLAREN PH. 2007. A physiological role for glucuronidated thyroid hormones: preferential uptake by H9c2(2-1) myotubes. *Molecular and cellular endocrinology* 264: 109-117.
- VAN DER PUTTEN HH, JOOSTEN BJ, KLAREN PH AND EVERTS ME. 2002. Uptake of tri-iodothyronine and thyroxine in myoblasts and myotubes of the embryonic heart cell line H9c2(2-1). *The Journal of endocrinology* 175: 587-596.
- VANDEKERCKHOVE J, BUGAISKY G AND BUCKINGHAM M. 1986. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *The Journal of biological chemistry* 261: 1838-1843.
- VARELA L ET AL. 2012. Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *The Journal of pathology* 227: 209-222.
- VARGAS-URICOECHA H, BONELO-PERDOMO A AND SIERRA-TORRES CH. 2014. Effects of thyroid hormones on the heart. *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis* 26: 296-309.
- VASSART G AND DUMONT JE. 1992. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrine reviews* 13: 596-611.
- VATNER DF, SNIKERIS J, POPOV V, PERRY RJ, RAHIMI Y AND SAMUEL VT. 2015. 3,5 Diiodo-L-Thyronine (T2) Does Not Prevent Hepatic Steatosis or Insulin Resistance in Fat-Fed Sprague Dawley Rats. *PLoS one* 10: e0140837.
- VERGANI L. 2014. Lipid lowering effects of iodothyronines: and studies on rat liver. *World journal of hepatology* 6: 169-177.
- VIDELA LA, CORNEJO P, ROMANQUE P, SANTIBANEZ C, CASTILLO I AND VARGAS R. 2012. Thyroid hormone-induced cytosol-to-nuclear translocation of rat liver Nrf2 is dependent on Kupffer cell functioning. *TheScientificWorldJournal* 2012: 301494.
- VIITANEN TM, SUKUMARAN P, LOF C AND TORNQUIST K. 2013. Functional coupling of TRPC2 cation channels and the calcium-activated anion channels in rat thyroid cells: implications for iodide homeostasis. *Journal of cellular physiology* 228: 814-823.
- VISSER TJ. 1996. Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta medica Austriaca* 23: 10-16.
- VISSER TJ, KAPTEIN E, VAN TOOR H, VAN RAAIJ JA, VAN DEN BERG KJ, JOE CT, VAN ENGELEN JG AND BROUWER A. 1993. Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinology* 133: 2177-2186.
- VISSER TJ AND PEETERS RP 2000. Metabolism of Thyroid Hormone. In: DE GROOT, LJ ET AL. (Eds.) *Endotext*, South Dartmouth (MA).
- VISSER WE, FRIESEMA EC AND VISSER TJ. 2011. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 25: 1-14.
- VRANCKX R, SAVU L, MAYA M AND NUNEZ EA. 1990. Characterization of a major development-regulated serum thyroxine-binding globulin in the euthyroid mouse. *The Biochemical journal* 271: 373-379.
- WALLACE BD AND REDINBO MR. 2013. Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective. *Drug metabolism reviews* 45: 79-100.
- WANG D AND STAPLETON HM. 2010. Analysis of thyroid hormones in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397: 1831-1839.
- WANG X, MCLENNAN SV, ALLEN TJ AND TWIGG SM. 2010. Regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors by CCN2/CTGF in H9c2 cardiomyocytes. *Journal of cell communication and signaling* 4: 15-23.
- WANG Y, VISCARRA J, KIM SJ AND SUL HS. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 16: 678-689.
- WANG Y, YU X, ZHAO QZ, ZHENG S, QING WJ, MIAO CD AND SANJAY J. 2016. Thyroid dysfunction, either hyper or hypothyroidism, promotes gallstone formation by different mechanisms. *J Zhejiang Univ Sci B* 17: 515-525.
- WASSEN FW, SCHIEL AE, KUIPER GG, KAPTEIN E, BAKKER O, VISSER TJ AND SIMONIDES WS. 2002. Induction of thyroid hormone-degrading deiodinase in cardiac hypertrophy and failure. *Endocrinology* 143: 2812-2815.

- WATERS KM, MILLER CW AND NTAMBI JM. 1997. Localization of a negative thyroid hormone-response region in hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1. *Biochemical and biophysical research communications* 233: 838-843.
- WEITZEL JM AND IWEN KA. 2011. Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Molecular and cellular endocrinology* 342: 1-7.
- WEITZEL JM, IWEN KA AND SEITZ HJ. 2003. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Experimental physiology* 88: 121-128.
- WEITZEL JM, RADTKE C AND SEITZ HJ. 2001. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Nucleic acids research* 29: 5148-5155.
- WRUTNIAK C ET AL. 1995. A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *The Journal of biological chemistry* 270: 16347-16354.
- WU J ET AL. 2013. Thrsp promotes hepatic lipogenesis, and its expression LXRalpha through an SREBP1c-dependent mechanism. *Hepatology* (Baltimore, Md).
- WU KC, CUI JY AND KLAASSEN CD. 2011. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 123: 590-600.
- WU KD, LEE WS, WEY J, BUNGARD D AND LYTTON J. 1995. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. *The American journal of physiology* 269: C775-784.
- WU SY, GREEN WL, HUANG WS, HAYS MT AND CHOPRA IJ. 2005. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 15: 943-958.
- XU C, LI CY AND KONG AN. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research* 28: 249-268.
- YAMAUCHI M, KAMBE F, CAO X, LU X, KOZAKI Y, OISO Y AND SEO H. 2008. Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 22: 893-903.
- YANG J ET AL. 2016. Analysis of the correlation between lipotoxicity and pituitary-thyroid axis hormone levels in men and male rats. *Oncotarget* 7: 39332-39344.
- YEHUDA-SHNAIDMAN E, KALDERON B AND BAR-TANA J. 2013. Thyroid Hormone, Thyromimetics, and Metabolic Efficiency. *Endocrine reviews*.
- YEN PM. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* 81: 1097-1142.
- YEN PM, ANDO S, FENG X, LIU Y, MARUVADA P AND XIA X. 2006. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and cellular endocrinology* 246: 121-127.
- YEN PM, FENG X, FLAMANT F, CHEN Y, WALKER RL, WEISS RE, CHASSANDE O, SAMARUT J, REFETOFF S AND MELTZER PS. 2003. Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO reports* 4: 581-587.
- ZAMEK-GLISZCZYNSKI MJ, HOFFMASTER KA, NEZASA K-I, TALLMAN MN AND BROUWER KLR. 2006. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27: 447-486.
- ZAVACKI AM, YING H, CHRISTOFFOLETE MA, AERTS G, SO E, HARNEY JW, CHENG SY, LARSEN PR AND BIANCO AC. 2005. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. *Endocrinology* 146: 1568-1575.
- ZHANG A ET AL. 2015. Thyroid hormone receptor regulates most genes independently of fibroblast growth factor 21 in liver. *The Journal of endocrinology* 224: 289-301.
- ZHANG Y, CHENG X, ALEKSUNES L AND KLAASSEN CD. 2012. Transcription factor-mediated regulation of carboxylesterase enzymes in livers of mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 40: 1191-1197.
- ZHANG Y, YIN L AND HILLGARTNER FB. 2003. SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACCalpha transcription in hepatocytes. *Journal of lipid research* 44: 356-368.
- ZHU X AND CHENG SY. 2010. New insights into regulation of lipid metabolism by thyroid hormone. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 17: 408-413.
- ZILZ ND, MURRAY MB AND TOWLE HC. 1990. Identification of multiple thyroid hormone response elements located far upstream from the rat S14 promoter. *The Journal of biological chemistry* 265: 8136-8143.
- ZOELLER RT, TAN SW AND TYL RW. 2007. General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Critical reviews in toxicology* 37: 11-53.

Publikationen

Lietzow J, Golchert J, Homuth G, Völker U, Jonas W, Köhrle J.

3,5-T₂ alters murine genes relevant for xenobiotic, steroid, and thyroid hormone metabolism.

Journal of Molecular Endocrinology 2016; 56(4): 311-323.

Rathmann D, Rijntjes E, Lietzow J, Köhrle J.

Quantitative Analysis of Thyroid Hormone Metabolites in Cell Culture Samples Using LC-MS/MS.

European Thyroid Journal 2015, 4 (suppl 1): 51-58.

Jonas W, Lietzow J, Wohlgemuth F, Hoefig CS, Wiedmer P, Schweizer U, Köhrle J, Schürmann A.

3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-T₂) exerts thyromimetic effects on hypothalamus-pituitary-thyroid axis, body composition, and energy metabolism in male diet-induced obese mice.

Endocrinology 2015; 156(1): 389-399.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertationzeit am Institut für experimentelle Endokrinologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin sowohl fachlich als auch moralisch unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle für die Auswahl des interessanten Themas sowie für die wissenschaftliche Anleitung und die vielen wertvollen Anregungen und konstruktiven Gespräche während meiner Doktorandenzeit. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für die zahlreichen Möglichkeiten der Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen bedanken.

Frau Prof. Dr. Petra Knaus vom Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin möchte ich für ihre Bereitschaft danken, das Zweitgutachten zu verfassen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Wenke Jonas und Frau Prof. Dr. Annette Schürmann aus der Abteilung experimentelle Diabetologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke für die ausgezeichnete Kooperation im Rahmen des DFG-geförderten Forschungsprojektes „*Hormonal regulation of body weight maintenance*“ der Klinischen Forschergruppe 218/1.

Dr. Georg Homuth, Janine Golchert und Prof. Dr. Uwe Völker aus der Abteilung für Funktionelle Genomforschung der Universitätsmedizin Greifswald danke ich herzlich für die Durchführung der Transkriptomanalysen und konstruktive Datendiskussion.

Bei Herrn Prof. Dr. Claes Ohlsson (Department of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg) und Andreas Landin sowie Herrn Prof. Dr. Matti Poutanen (Department of Physiology, University of Turku) möchte ich mich für die Analyse des Steroidprofils bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Dr. Eddy Rintjes, Dr. Eva K. Wirth und Dr. Kostja Renko für die hilfreichen Ratschläge und die Unterstützung bei technischen und wissenschaftlichen Fragestellungen. Für ihre exzellente technische Unterstützung möchte ich mich im Besonderen bei Anja Fischbach sowie bei Antje Kretschmer, Raymond Monk und Vartitér Seher bedanken.

Herzlich möchte ich mich auch bei Franziska Wohlgemuth bedanken, die mir zu Beginn im Rahmen der KFO 218 mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die Durchführung und Betreuung der LC-MS/MS-Messungen möchte ich mich bei Dr. Carolin S. Höfig, Dr. Daniel Rathmann und Dr. Keith Richards bedanken.

Vielen Dank auch an die Studentin Priyavathi Dhandapani, die ich während meiner Arbeit betreuen durfte.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich bei Dr. Eva K. Wirth, Dr. Ina Lehmpful und Dr. Carolin S. Höfig sowie meiner Freundin Christina Dürbaum bedanken.

Beim Graduiertenkolleg 1208 "*Hormonal Regulation of Energy Metabolism, Body Weight and Growth*" bedanke ich mich für die Möglichkeit der Aus- und Weiterbildung und des Austauschs mit anderen Doktoranden.

DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt meiner Laborkollegin Nancy Schanze, ohne sie hätte ich meine Doktorandenzeit nur mit halb soviel guter Laune verlebt. Ich danke ihr für die zahlreichen motivierenden und konstruktiven Gespräche.

Außerdem möchte ich mich bei meinen ehemaligen Mitdoktoranden des Instituts für experimentelle als auch pädiatrische Endokrinologie der Charité für die ausgesprochen heiteren Stunden und schönen Erinnerungen im Laufe der Jahre im als auch außerhalb des Labors bedanken.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer und Geduld und für die vielen abwechslungsreichen Momente, die mir immer wieder neue Kraft für den Laboralltag gegeben haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und ihr bedingungsloser Rückhalt.

Zu guter Letzt und von ganzem Herzen möchte ich mich bei Philipp für seine kontinuierliche Unterstützung in jeder Lebenslage, für seine mich immer wieder motivierenden Worte und Geduld bei Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Julika Lietzow, die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Wirkung des Schilddrüsenhormonmetaboliten 3,5-T₂ auf den Energiestoffwechsel und die Schilddrüsenhormonachse in Mäusen unter normaler Diät und Hochfettdiät“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Verfahren zugrundeliegenden Promotionsordnung. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und bin nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Julika Lietzow

Berlin, den 6.3.2017

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Anhang

Positiv exprimierte Gen-Transkripte sind Fett und negativ exprimierte Transkripte kursiv dargestellt, p-Wert $\leq 0,05$, Fold change $\geq 1,5$ fold.

Tab. 33: Differenziell exprimierte hepatische Gene nach 14-tägiger Behandlung mit T₃ in HFD-Mäusen.

Transkript Cluster ID	Gensymbol	Genbezeichnung	ANOVA p-Wert	Fold change
1125648	Akr1c18	aldo-keto reductase family 1, member C18	0,00005	22,58
1125641	Ear11	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 11	0,00993	10,84
1123190	Ugt2b37	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B37	0,00536	5,93
1128040	9030619P08 Rik	RIKEN cDNA 9030619P08 gene	0,01232	4,63
1114381	Gm13775	predicted gene 13775	0,01855	3,73
1121607	Atf3	activating transcription factor 3	0,02083	3,63
1124436	Sult5a1	sulfotransferase family 5A, member 1	0,01166	3,33
1136506	Slc22a7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	0,03334	2,82
1108590	Cdh1	cadherin 1	0,03181	2,52

Tab. 34: Differenziell exprimierte hepatische Gene nach 14-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ in HFD-Mäusen.

Transkript Cluster ID	Gensymbol	Genbezeichnung	ANOVA p-Wert	Fold change
10419568	Ear11	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 11	6,94E-03	10,64
10429588	9030619P08Rik	RIKEN cDNA 9030619P08 gene	5,00E-04	6,44
10451291	Slc22a7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	8,00E-04	4,84
10531061	Ugt2b37	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B37	1,72E-02	4,64
10582466	Sult5a1	sulfotransferase family 5A, member 1	2,84E-03	4,40
10361680	B430219N15Rik	RIKEN cDNA B430219N15 gene	1,47E-03	4,30
10505266	Gm13775	predicted gene 13775	1,23E-02	3,50
10361091	Atf3	activating transcription factor 3	1,49E-02	3,21
10601312	Chic1	cysteine-rich hydrophobic domain 1	3,58E-02	2,86
10421648	Slc25a30	solute carrier family 25, member 30	2,40E-02	2,73
10574617	Ces4a	carboxylesterase 4A	3,18E-02	2,53
10405633	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	4,73E-02	2,53
10514912	Dio1	deiodinase, iodothyronine, type I	4,75E-03	2,43
10565727	Tsku	tsukushi	4,51E-03	2,42
10460696	Slc25a45	solute carrier family 25, member 45	1,20E-02	1,92
10585417	Idh3a	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	9,44E-03	1,85
10504375	Npr2	natriuretic peptide receptor 2	2,93E-03	1,85
10383206	Rnf213	ring finger protein 213	4,25E-03	1,85
10372421	Trhde	TRH-degrading enzyme	3,32E-02	1,81
10378572	Tlcd2	TLC domain containing 2	1,84E-02	1,73
10434629	Map3k13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	2,74E-02	1,71
10579532	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	3,27E-02	1,69
10442396	Abca3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	2,69E-02	1,66
10383214	Rnf213	ring finger protein 213	1,55E-02	1,63
10367717	Ginm1	glycoprotein integral membrane 1	4,64E-02	1,63
10383204	Rnf213	ring finger protein 213	2,46E-02	1,61
10418747	Hacl1	2-hydroxyacyl-CoA lyase 1	1,03E-02	1,60
10383212	Rnf213	ring finger protein 213	2,43E-02	1,59
10490632	Helz2	helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator	2,42E-02	1,56
10529313	Letm1	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	3,73E-02	1,51
10451451	Gnmt	glycine N-methyltransferase	3,09E-02	<i>-1,59</i>
10523111	5830473C10Rik	RIKEN cDNA 5830473C10 gene	3,22E-02	<i>-1,66</i>
10556113	Rbm3	RNA binding motif protein 3	3,72E-02	<i>-1,68</i>
10496825	Uox	urate oxidase	1,00E-02	<i>-1,69</i>
10512807	Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	4,80E-02	<i>-1,74</i>
10432918	Krt8	keratin 8	3,35E-03	<i>-1,75</i>
10558265	Lhpg	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	2,89E-02	<i>-1,85</i>
10580678	Ces1g	carboxylesterase 1G	3,38E-02	<i>-1,92</i>
10598075	mt-Ta	mitochondrially encoded tRNA alanine	3,23E-02	<i>-1,96</i>
10508721	Snora44	small nucleolar RNA, H/ACA box 44	7,70E-03	<i>-1,96</i>
10568568	Chst15	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O) sulfotransferase 15	1,19E-02	<i>-2,07</i>
10593981	Cyp1a2	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	1,73E-02	<i>-2,15</i>
10587315	Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4	1,30E-02	<i>-2,17</i>
10541071	8430408G22Rik	RIKEN cDNA 8430408G22 gene	4,40E-02	<i>-2,21</i>
10496727	Ddah1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	1,65E-02	<i>-2,28</i>
10544932	Inmt	indolethylamine N-methyltransferase	3,46E-02	<i>-2,45</i>

ANHANG

Fortsetzung Tab. 34				
10359861	Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3	2,43E-02	-2,51
10580953			1,46E-02	-2,56
10430006	Slc39a4	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4	1,45E-02	-2,61
10501208	Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6	4,60E-04	-2,64
10608661	Raet1e	retinoic acid early transcript 1E	3,18E-02	-2,66
10608648	Raet1d	retinoic acid early transcript delta	2,35E-02	-2,80
10362091	Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	1,22E-02	-2,90
10352344	9130409I23Rik	RIKEN cDNA 9130409I23 gene	2,83E-02	-2,95
10403911	Gpx6	glutathione peroxidase 6	2,69E-02	-2,98
10492306	Sucnr1	succinate receptor 1	4,36E-03	-3,04
10467897	Cyp2c44	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 44	1,34E-02	-3,05
10463027	Cyp2c29	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29	1,11E-02	-3,17
10496077	Agxt211	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	6,41E-03	-3,40
10373334	Hsd17b6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	2,52E-02	-3,47
10389894	Abcc3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	3,19E-02	-3,82
10587331	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	1,72E-02	-3,83
10587323	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	1,72E-02	-4,00
10606928	Serpina7	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7	2,49E-03	-4,62

Tab. 35: Differentiell exprimierte hepatische Gene nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ in HFD-Mäusen.

Transkript Cluster ID	Gensymbol	Genbezeichnung	ANOVA p-Wert	Fold change
10419568	Ear11	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 11	9,87E-13	26,70
10429588	9030619P08Rik	RIKEN cDNA 9030619P08 gene	9,87E-13	6,86
10407435	Akr1c18	aldo-keto reductase family 1, member C18	2,10E-07	6,80
10451291	Slc22a7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	9,87E-13	5,34
10424349	Sqle	squalene epoxidase	3,14E-08	4,76
10582466	Sult5a1	sulfotransferase family 5A, member 1	9,87E-13	4,38
10465734	Slc22a27	solute carrier family 22, member 27	3,98E-02	3,86
10453231	Slc8a1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	2,40E-03	3,72
10468239	Cyp17a1	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	5,10E-04	3,50
10515399	Plk3	polo-like kinase 3	4,27E-03	3,27
10403413	Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	8,51E-07	3,21
10361680	B430219N15Rik	RIKEN cDNA B430219N15 gene	2,47E-02	3,13
10482762	Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	1,14E-06	3,09
10374223	Igf1bp1	insulin-like growth factor binding protein 1	1,70E-04	3,00
10445308	Cyp39a1	cytochrome P450, family 39, subfamily a, polypeptide 1	1,60E-06	2,85
10531061	Ugt2b37	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B37	1,41E-06	2,84
10527920	Cyp51	cytochrome P450, family 51	4,64E-06	2,78
10514912	Dio1	deiodinase, iodothyronine, type I	1,58E-09	2,74
10480275	Nebi	nebullette	3,27E-03	2,66
10421648	Slc25a30	solute carrier family 25, member 30	1,60E-04	2,65
10601312	Chic1	cysteine-rich hydrophobic domain 1	1,37E-02	2,64
10449657	Tff3	trefoil factor 3, intestinal	2,78E-02	2,45
10600082	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	3,60E-04	2,22
10508800	Gm3579	predicted gene 3579	2,98E-03	2,17
10573865	Gm3579	predicted gene 3579	2,98E-03	2,17
10338268			8,76E-03	2,14
10565727	Tsku	tsukushi	3,27E-03	2,11
10489705	Slc13a3	solute carrier family 13 member 3	9,00E-05	2,10
10479047	Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic	7,33E-07	2,09
10539080	St3gal5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	2,85E-02	2,06
10498584	Rarres1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	3,48E-02	2,03
10510221	Gm3579	predicted gene 3579	3,29E-02	2,01
10348410	Spp2	secreted phosphoprotein 2	2,10E-08	1,88
10578916	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like	1,58E-02	1,85
10582811	Irf2bp2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	7,20E-04	1,81
10593713	Cib2	calcium and integrin binding family member 2	4,43E-03	1,80
10575750	Bcmol	beta-carotene 15,15'-monooxygenase	6,80E-04	1,79
10442396	Abca3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	1,70E-02	1,78
10359917	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	2,31E-02	1,77
10608684	Dynll1	dynein light chain LC8-type 1	1,44E-02	1,75
10388938	Wsb1	WD repeat and SOCS box-containing 1	1,90E-02	1,69
10487879	Rnf24	ring finger protein 24	2,20E-02	1,68
10450444	Apom	apolipoprotein M	1,49E-02	1,67
10460696	Slc25a45	solute carrier family 25, member 45	6,01E-03	1,67
10383289	Baiap2	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	2,67E-02	1,63
10367600	Esr1	estrogen receptor 1 (alpha)	3,31E-02	1,58
10566026	Folr2	folate receptor 2 (fetal)	1,78E-02	1,56

ANHANG

Fortsetzung Tab. 35				
10426110	Pim3	proviral integration site 3	3,78E-03	1,54
10579532	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2	8,43E-03	1,53
10574166	Cpne2	copine II	2,51E-02	1,52
10338042			1,26E-02	1,51
10556701	Acsm5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5	3,90E-02	-1,50
10496825	Uox	urate oxidase	1,04E-02	-1,53
10382136	1810010H24Rik	RIKEN cDNA 1810010H24 gene	2,11E-02	-1,54
10434758	St6gal1	beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1	2,50E-02	-1,55
10404649	Dsp	desmoplakin	7,00E-05	-1,57
10523111	5830473C10Rik	RIKEN cDNA 5830473C10 gene	1,58E-02	-1,63
10580663	Ces1f	carboxylesterase 1F	3,20E-02	-1,63
10541446	Gm10319	predicted pseudogene 10319	1,70E-02	-1,65
10496023	Casp6	caspase 6	3,17E-02	-1,69
10419850	Cebpe	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	2,68E-02	-1,69
10598638	Mid1ip1	Mid1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12-like (zebrafish))	1,72E-02	-1,70
10531087	Sult1b1	sulfotransferase family 1B, member 1	3,05E-03	-1,74
10507520	Hyi	hydroxypyruvate isomerase homolog (E. coli)	1,48E-03	-1,75
10535174	Tmem184a	transmembrane protein 184a	3,57E-03	-1,76
10357878	Adora1	adenosine A1 receptor	4,79E-03	-1,77
10480459	Hnmt	histamine N-methyltransferase	3,00E-05	-1,78
10541426	Mug2	murinoglobulin 2	8,91E-03	-1,79
10400304	Egln3	EGL nine homolog 3 (C. elegans)	1,19E-03	-1,79
10398859	Adssl1	adenylosuccinate synthetase like 1	9,41E-03	-1,85
10386473	Srebf1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	7,90E-04	-1,87
10496251	Bdh2	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	5,19E-03	-1,94
10398224	Cyp46a1	cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1	4,68E-03	-1,95
10490854	Chmp4c	charged multivesicular body protein 4C	1,75E-02	-1,95
10587315	Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4	7,00E-05	-1,95
10501208	Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6	1,80E-04	-2,06
10518335	Gm13163	predicted gene 13163	1,10E-02	-2,10
10574498	Ces2a	carboxylesterase 2A	6,92E-07	-2,15
10502214	Cyp2u1	cytochrome P450, family 2, subfamily u, polypeptide 1	2,72E-02	-2,20
10390860	Krt23	keratin 23	1,37E-02	-2,32
10562500	Dpy19l3	dpy-19-like 3 (C. elegans)	3,48E-03	-2,34
10403063			1,26E-02	-2,35
10425763	Cyp2d9	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 9	2,39E-02	-2,36
10492306	Sucnr1	succinate receptor 1	2,70E-02	-2,45
10518346	Gm13146	predicted gene 13146	3,80E-03	-2,49
10510215	Gm13139	predicted gene 13139	2,39E-02	-2,51
10353450	Gm4956	predicted gene 4956	2,00E-05	-2,55
10544932	Inmt	indolethylamine N-methyltransferase	1,48E-03	-2,76
10496727	Ddah1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	2,53E-02	-2,77
10513538	Mup21	major urinary protein 21	6,00E-05	-2,79
10583753	Gm6484	predicted gene 6484	1,20E-04	-2,89
10403911	Gpx6	glutathione peroxidase 6	1,33E-08	-3,19
10587339	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	7,22E-06	-3,25
10595148	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	3,71E-06	-3,25
10496077	Agxt211	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	3,03E-03	-3,42
10373334	Hsd17b6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	1,07E-03	-3,48
10430006	Slc39a4	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4	5,37E-10	-3,74
10587331	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	2,23E-07	-3,80
10467897	Cyp2c44	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 44	8,09E-08	-3,85
10587323	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	2,59E-07	-4,14
10606928	Serpina7	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A member 7	4,50E-04	-4,24
10389894	Abcc3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	2,95E-10	-6,48
10344096			1,00E-04	-6,83
10507143	Cyp4a12a	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a	1,37E-02	-9,82
10507152	Cyp4a12b	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12B	4,06E-03	-10,28
10470175	Obp2a	odorant binding protein 2A	2,21E-09	-18,34

Tab. 36: Differenziell exprimierte hepatische Gene nach 28-tägiger Behandlung mit 3,5-T₂ in SD-Mäusen.

Transkript Cluster ID	Gensymbol	Genbezeichnung	ANOVA p-Wert	Fold change
10551218	Cyp2b9	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9	3,95E-13	54,21
10419568	Ear11	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 11	2,88E-10	31,03
10505266	Gm13775	predicted gene 13775	3,95E-13	26,18
10429588	9030619P08Rik	RIKEN cDNA 9030619P08 gene	3,95E-13	14,69
10505268	Mup-ps16	major urinary protein, pseudogene 16	3,95E-13	8,39
10407435	Akr1c18	aldo-keto reductase family 1, member C18	5,45E-08	7,77
10451291	Slc22a7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	3,95E-13	6,20

ANHANG

Fortsetzung Tab. 36				
10465734	Slc22a27	solute carrier family 22, member 27	3,00E-05	5,79
10498584	Rarres1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	2,00E-05	4,82
10514912	Dio1	deiodinase, iodothyronine, type I	3,95E-13	4,55
10582466	Sult5a1	sulfotransferase family 5A, member 1	3,95E-13	4,46
10421648	Slc25a30	solute carrier family 25, member 30	1,00E-05	4,27
10587639	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	3,95E-13	4,12
10543017	Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	9,00E-05	4,12
10468239	Cyp17a1	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	2,38E-07	3,91
10505237	Snx30	sorting nexin family member 30	1,68E-08	3,58
10505252	Mup-ps7	major urinary protein, pseudogene 7	2,70E-04	3,47
10563780	E2f8	E2F transcription factor 8	3,70E-04	3,30
10505261	Mup-ps15	major urinary protein, pseudogene 15	7,57E-12	3,26
10443463	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	2,00E-05	3,22
10438575	Ehhadh	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	2,88E-10	3,08
10500360	Gm15441	predicted gene 15441	3,11E-02	3,03
10361680	B430219N15Rik	RIKEN cDNA B430219N15 gene	1,48E-03	3,00
10554938	Rab30	RAB30, member RAS oncogene family	2,50E-04	2,96
10378572	Tlcd2	TLC domain containing 2	2,90E-07	2,94
10505240	Mup-ps13	major urinary protein, pseudogene 13	3,95E-13	2,91
10551209	Cyp2b13	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 13	1,11E-02	2,77
10601312	Chic1	cysteine-rich hydrophobic domain 1	9,68E-03	2,70
10515399	Plk3	polo-like kinase 3	1,46E-06	2,70
10362138	Vnn1	vanin 1	1,48E-03	2,67
10434629	Map3k13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	3,79E-06	2,57
10487879	Rnf24	ring finger protein 24	5,93E-07	2,57
10361246	G0s2	G0/G1 switch gene 2	4,72E-02	2,54
10463037	Cyp2c39	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 39	4,05E-03	2,52
10596454	Alas1	aminolevulinic acid synthase 1	5,30E-04	2,49
10405211	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	1,54E-02	2,48
10397148	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1	1,48E-03	2,46
10505249	Mup-ps1	major urinary protein, pseudogene 1	1,10E-04	2,44
10385872	Slc22a5	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5	1,00E-04	2,43
10574617	Ces4a	carboxylesterase 4A	6,00E-05	2,41
10397158	Acot3	acyl-CoA thioesterase 3	7,86E-03	2,34
10424400	Myc	myelocytomatosis oncogene	1,94E-02	2,34
10587077	Gm16551	predicted gene 16551	3,54E-02	2,33
10397145	Acot2	acyl-CoA thioesterase 2	2,30E-04	2,28
10362472	Rsph4a	radial spoke head 4 homolog A (Chlamydomonas)	4,47E-02	2,25
10531061	Ugt2b37	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B37	4,24E-03	2,23
10523128	Ppbp	pro-platelet basic protein	8,00E-05	2,23
10372208	Acss3	acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	3,50E-03	2,22
10472162	Gpd2	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	1,76E-10	2,19
10523547	Agpat9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	1,80E-04	2,18
10587871	Paqr9	progesterin and adipoQ receptor family member IX	4,87E-07	2,16
10460696	Slc25a45	solute carrier family 25, member 45	3,68E-06	2,13
10439321	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	8,10E-03	2,13
10380566	Phospho1	phosphatase, orphan 1	2,79E-02	2,13
10465753	Slc22a29	solute carrier family 22, member 29	3,67E-03	2,12
10405633	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	2,43E-02	2,11
10608668	Mup6	major urinary protein 6	1,46E-06	2,10
10564805	Pex11a	peroxisomal biogenesis factor 11 alpha	2,91E-03	2,04
10387791	Slc16a13	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 13	5,40E-04	1,98
10416071	Chrna2	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 2 (neuronal)	1,54E-02	1,97
10359181	Tor3a	torsin family 3, member A	8,92E-03	1,96
10431697	Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	2,11E-02	1,93
10458262	Slc23a1	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1	1,20E-04	1,92
10574488	Pdp2	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2	1,60E-03	1,91
10511886	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase	1,10E-06	1,88
10505258	LOC101055795	major urinary protein 5-like	4,10E-04	1,88
10505246	LOC101055795	major urinary protein 5-like	4,10E-04	1,88
10539080	St3gal5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	2,29E-02	1,87
10499132	Mab21l2	mab-21-like 2 (C. elegans)	3,49E-02	1,86
10481474	Crat	carnitine acetyltransferase	5,10E-04	1,86
10461909	Nmrk1	nicotinamide riboside kinase 1	4,94E-03	1,84
10584941	Bace1	beta-site APP cleaving enzyme 1	6,60E-04	1,84
10481577	Uck1	uridine-cytidine kinase 1	3,80E-04	1,81
10397153	Acot4	acyl-CoA thioesterase 4	9,56E-03	1,81
10367717	Ginm1	glycoprotein integral membrane 1	4,00E-05	1,80
10435733	Igsf11	immunoglobulin superfamily, member 11	4,93E-03	1,80
10491083	Nceh1	neutral cholesterol ester hydrolase 1	4,10E-04	1,79
10457114	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase	1,33E-06	1,78
10462507	Papss2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	1,35E-02	1,77

ANHANG

Fortsetzung Tab. 36				
10515086	9630013D21Rik	RIKEN cDNA 9630013D21 gene	3,16E-03	1,77
10539894	Ruvb1l	RuvB-like protein 1	2,72E-02	1,76
10442396	Abca3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	4,00E-05	1,76
10508992	Paqr7	progesterin and adipoQ receptor family member VII	2,97E-02	1,76
10348410	Spp2	secreted phosphoprotein 2	3,49E-02	1,73
10389783	Gm10276	predicted gene 10276	1,59E-02	1,72
10505254	Mup-ps7	major urinary protein, pseudogene 7	1,50E-03	1,71
10412607	Abhd6	abhydrolase domain containing 6	1,94E-02	1,71
10585417	Idh3a	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	1,00E-05	1,69
10501832	Abcd3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	4,87E-07	1,69
10598032	mt-Tm	mitochondrially encoded tRNA methionine	5,92E-03	1,68
10578649	Tenm3	teneurin transmembrane protein 3	3,03E-02	1,66
10400095	Ifrd1	interferon-related developmental regulator 1	3,51E-02	1,66
10514221	Plin2	perilipin 2	1,10E-02	1,66
10505200	Hsd1l2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	3,81E-02	1,66
10508412	Fndc5	fibronectin type III domain containing 5	3,61E-02	1,65
10467372	Cyp2c38	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38	4,56E-02	1,65
10588037	Rbp1	retinol binding protein 1, cellular	2,09E-02	1,65
10490632	Helz2	helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator	3,00E-05	1,64
10489368	Fitm2	fat storage-inducing transmembrane protein 2	3,68E-02	1,64
10467871	Dnmbp	dynamin binding protein	6,90E-04	1,63
10445758	Trem14	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4	2,97E-02	1,62
10597648	Myd88	myeloid differentiation primary response gene 88	2,13E-02	1,61
10545436	Elmod3	ELMO/CED-12 domain containing 3	9,85E-03	1,61
10394054	Cd7	CD7 antigen	6,81E-03	1,60
10367600	Esr1	estrogen receptor 1 (alpha)	3,90E-02	1,60
10477644	Trp53inp2	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2	1,20E-03	1,60
10488797	Pxmp4	peroxisomal membrane protein 4	3,67E-03	1,59
10514865	Acot11	acyl-CoA thioesterase 11	1,93E-02	1,59
10579199	Slc25a42	solute carrier family 25, member 42	2,30E-04	1,58
10440427	D16Erd472e	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 472, expressed	8,10E-03	1,58
10442606	Meiob	meiosis specific with OB domains	2,57E-02	1,58
10512886	Acnat2	acyl-coenzyme A amino acid N-acyltransferase 2	1,22E-02	1,56
10450038	Angptl4	angiopoietin-like 4	7,23E-03	1,56
10436392	Cpox	coproporphyrinogen oxidase	2,01E-03	1,55
10476207	Atrn	attractin	6,44E-03	1,55
10468980	Fam107b	family with sequence similarity 107, member B	2,82E-02	1,52
10544062	D630045J12Rik	RIKEN cDNA D630045J12 gene	1,53E-02	1,51
10369661	Ccar1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	4,72E-02	1,50
10502655	Cyr61	cysteine rich protein 61	1,38E-02	-1,50
10404077	Slc17a2	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 2	1,08E-02	-1,52
10532310			2,78E-03	-1,52
10479938	Echdc3	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	8,66E-03	-1,54
10437516	Ppl	periplakin	1,53E-02	-1,56
10371970	Amdhd1	amidohydrolase domain containing 1	3,91E-02	-1,56
10541446	Gm10319	predicted pseudogene 10319	2,08E-02	-1,56
10509204	Tcea3	transcription elongation factor A (SII), 3	4,00E-05	-1,56
10531073	Ugt2b38	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B38	1,92E-02	-1,58
10362294	Arhgap18	Rho GTPase activating protein 18	3,51E-02	-1,58
10480725	BC029214	cDNA sequence BC029214	3,59E-02	-1,58
10454807	Snhg4	small nucleolar RNA host gene 4 (non-protein coding)	1,67E-02	-1,58
10489239	9430008C03Rik	RIKEN cDNA 9430008C03 gene	1,24E-02	-1,59
10371277	Zfp938	zinc finger protein 938	1,30E-04	-1,59
10499130	Rnu73b	U73B small nuclear RNA	4,50E-04	-1,60
10602372	Alas2	aminolevulinic acid synthase 2, erythroid	8,27E-03	-1,61
10501229	Gstm1	glutathione S-transferase, mu 1	5,50E-04	-1,62
10526085			1,57E-02	-1,62
10496825	Uox	urate oxidase	6,03E-03	-1,62
10493307			2,85E-02	-1,62
10436828	Olig1	oligodendrocyte transcription factor 1	1,53E-02	-1,62
10556208	Akip1	A kinase (PRKA) interacting protein 1	6,00E-05	-1,63
10540075	Hdac11	histone deacetylase 11	3,54E-02	-1,65
10419850	Cebpe	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	2,36E-02	-1,66
10468881	5830428H23Rik	RIKEN cDNA 5830428H23 gene	9,00E-05	-1,66
10607877	Prps2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	3,00E-05	-1,66
10501208	Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6	6,60E-04	-1,66
10496023	Casp6	caspase 6	1,08E-02	-1,69
10507520	Hyi	hydroxypyruvate isomerase homolog (E. coli)	7,80E-04	-1,71
10541426	Mug2	murinoglobulin 2	1,96E-02	-1,71
10598075	mt-Ta	mitochondrially encoded tRNA alanine	7,59E-06	-1,72
10480459	Hnmt	histamine N-methyltransferase	5,44E-08	-1,72
10556244	Ipo7	importin 7	1,81E-03	-1,72

ANHANG

Fortsetzung Tab. 36				
10464583	Gstp1	glutathione S-transferase, pi 1	4,09E-02	-1,73
10563099	Snord35b	small nucleolar RNA, C/D box 35B	1,01E-03	-1,74
10518346	Gm13146	predicted gene 13146	3,98E-02	-1,74
10390505	Snora21	small nucleolar RNA, H/ACA box 21	8,66E-03	-1,74
10480842	Tmem141	transmembrane protein 141	7,76E-03	-1,75
10384579	Ugp2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	5,60E-04	-1,76
10598073	mt-Tq	mitochondrially encoded tRNA glutamine	1,63E-03	-1,77
10410452	Srd5a1	steroid 5 alpha-reductase 1	4,44E-02	-1,78
10598062	mt-Th	mitochondrially encoded tRNA histidine	3,76E-02	-1,78
10359861	Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3	6,14E-03	-1,78
10508719	Taf12	RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	1,95E-02	-1,80
10565910	Plekhb1	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	3,69E-02	-1,81
10420372	Cry1l	crystallin, lambda 1	9,80E-04	-1,81
10532301	5430403G16Rik	RIKEN cDNA 5430403G16 gene	1,49E-02	-1,82
10507870			8,10E-03	-1,83
10409014			7,48E-03	-1,84
10478075			4,77E-02	-1,84
10461758	Kegl	kidney expressed gene 1	4,69E-02	-1,85
10507872			8,55E-03	-1,89
10511429	Car8	carbonic anhydrase 8	1,00E-05	-1,90
10351380	Ildr2	immunoglobulin-like domain containing receptor 2	5,86E-03	-1,91
10570432			2,38E-07	-1,93
10434745			1,07E-02	-1,94
10500547	Hsd3b2	3 beta- and steroid delta-isomerase 2	2,86E-03	-1,94
10463043	Cyp2c37	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 37	1,29E-02	-1,96
10496251	Bdh2	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	1,64E-03	-1,98
10508721	Snora44	small nucleolar RNA, H/ACA box 44	9,10E-04	-2,00
10556206	Rpl27a	ribosomal protein L27A	5,86E-09	-2,01
10403291	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	9,00E-05	-2,03
10454113	Dsg1a	desmoglein 1 alpha	2,14E-02	-2,07
10512807	Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	1,08E-07	-2,09
10403312	Akr1c19	aldo-keto reductase family 1, member C19	3,90E-04	-2,09
10357878	Adora1	adenosine A1 receptor	3,80E-04	-2,09
10346374	Aox1	aldehyde oxidase 1	1,00E-05	-2,10
10604076	Snora69	small nucleolar RNA, H/ACA box 69	2,38E-07	-2,11
10399428	Snord118	small nucleolar RNA, C/D box 118	1,93E-02	-2,12
10377429	Snord118	small nucleolar RNA, C/D box 118	1,93E-02	-2,12
10588263	Slco2a1	solute carrier organic anion transporter family, member 2a1	1,19E-06	-2,19
10513538	Mup21	major urinary protein 21	1,10E-04	-2,20
10502214	Cyp2u1	cytochrome P450, family 2, subfamily u, polypeptide 1	1,83E-02	-2,21
10544932	Inmt	indolethylamine N-methyltransferase	2,50E-04	-2,23
10405189			1,60E-04	-2,23
10492306	Sucnr1	succinate receptor 1	3,60E-04	-2,24
10580953			9,00E-05	-2,25
10352344	9130409I23Rik	RIKEN cDNA 9130409I23 gene	1,01E-02	-2,25
10583753	Gm6484	predicted gene 6484	4,24E-03	-2,27
10455015	Zmat2	zinc finger, matrin type 2	3,00E-05	-2,42
10408666	Rpp40	ribonuclease P 40 subunit	1,85E-02	-2,45
10406407	Arrdc3	arrestin domain containing 3	2,30E-04	-2,48
10587315	Gsta4	glutathione S-transferase, alpha 4	3,00E-05	-2,49
10463027	Cyp2c29	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29	5,24E-10	-2,53
10392522	Abca8a	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a	7,55E-07	-2,55
10432176	Snora34	small nucleolar RNA, H/ACA box 34	7,34E-08	-2,80
10496727	Ddah1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	2,80E-02	-2,81
10562500	Dpy19l3	dpy-19-like 3 (C. elegans)	2,80E-02	-2,83
10554752	Nox4	NADPH oxidase 4	2,01E-07	-3,15
10587339	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	5,00E-04	-3,16
10445251	Gpr110	G protein-coupled receptor 110	4,32E-06	-3,20
10467897	Cyp2c44	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 44	6,00E-05	-3,49
10606928	Serpina7	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A member 7	3,50E-02	-3,53
10595148	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	6,80E-04	-3,69
10542112	Clec2h	C-type lectin domain family 2, member h	6,00E-05	-3,76
10587331	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	2,90E-04	-4,49
10389894	Abcc3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	3,95E-12	-4,67
10587323	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	1,20E-04	-5,13
10507143	Cyp4a12a	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a	1,12E-03	-5,33
10496077	Agxt2l1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	3,95E-13	-5,69
10507152	Cyp4a12b	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12B	1,10E-04	-6,51
10373334	Hsd17b6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	5,88E-09	-7,75