

**Integrierte Omics-Analysen zur Charakterisierung physiologischer  
Effekte von Schilddrüsenhormonen und von spezifischen  
Schilddrüsenhormon-Metaboliten**

---

INAUGURALDISSERTATION

zur

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

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Janine Golchert

geboren am 08.02.1991

Greifswald, 09.03.2020

Dekan: Prof. Dr. Werner Weitschies

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Völker

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaudia Brix

Tag der Promotion: 10.09.2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII</b>
<b>Summary .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biosynthese der klassischen Schilddrüsenhormone T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> in der Schilddrüse .	1
1.2 Transport und Metabolismus der klassischen Schilddrüsenhormone T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> .....	3
1.3 Regulation der Schilddrüsenhormone.....	4
1.4 Molekulare Wirkmechanismen von Schilddrüsenhormonen.....	5
1.5 Physiologische Wirkungen von Schilddrüsenhormonen.....	7
1.6 Fehlfunktionen im Schilddrüsenhormonhaushalt .....	8
1.7 Schilddrüsenhormon-Metabolite .....	9
1.7.1 3-Iodthyronamin (3-T <sub>1</sub> AM).....	9
1.7.2 3,5-Diiodthyronin (3,5-T <sub>2</sub> ).....	12
1.8 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan.....	13
1.8.1 Die Fettleber ( <i>Steatosis hepatis</i> ).....	14
1.9 Wirkungen von Schilddrüsenhormonen auf die Leber.....	14
1.9.1 Wirkungen von T <sub>3</sub> auf die Leber .....	14
1.9.2 Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf die Leber.....	15
1.10 Zielstellungen dieser Arbeit .....	17
<b>2 Material.....</b>	<b>19</b>
2.1 Biologische Materialien.....	19
2.2 Laborgeräte und Hilfsmittel.....	19
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.4 Chemikalien .....	21
2.5 Enzyme und Antikörper .....	22
2.6 Kits.....	23
2.7 Puffer und Lösungen .....	23
2.8 Software und Datenbanken .....	26

<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.1	Arbeiten mit biologischem Material .....	27
3.1.1	Tierhaltung und –behandlung .....	27
3.1.2	Kultivierung von PCCL3-Zellen .....	28
3.2	Arbeiten mit RNA.....	29
3.2.1	RNA-Präparation (TRIzol®-Methode) .....	29
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	30
3.2.3	Qualitätskontrolle von RNA .....	30
3.2.4	DNase-Verdau und RNA-Aufreinigung.....	31
3.2.5	Transkriptomanalyse .....	31
3.2.6	Auswertung der Transkriptomdaten .....	34
3.3	Arbeiten mit Proteinen .....	35
3.3.1	Protein-Präparation (TRIzol®-Methode).....	35
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	36
3.3.3	Trypsinverdau mit vorangehendem Reduzieren und Alkylieren.....	37
3.3.4	Entsalzung von Peptidlösungen an C18-Material.....	37
3.3.5	Massenspektrometrische Analyse .....	38
3.3.6	Auswertung der Proteomdaten .....	40
3.3.7	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE) 42	
3.3.8	Western Blot-Analyse .....	43
3.4	Arbeiten mit Metaboliten.....	44
3.4.1	Analyse von Sexualhormon-Konzentrationen .....	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>47</b>
4.1	Wirkungen von 3-T <sub>1</sub> AM auf das Transkriptom von PCCL3-Zellen.....	47
4.2	Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom von Mäusen unter Hochfettdiät .....	49
4.2.1	Vergleich der Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom von Mäusen unter Hochfett- und Standarddiät .....	53
4.3	Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät .....	55
4.3.1	<i>Pathway</i> -Analysen von 3,5-T <sub>2</sub> induzierten Veränderungen des Leberproteoms von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät .....	60
4.3.2	Ergebnisse der Western Blot-Analysen.....	64

4.4	Vergleich der Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom und Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät .....	65
4.5	Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf Sexualhormon-Spiegel in verschiedenen Geweben....	72
4.6	Wirkungen von Hypo- und Hyperthyreose auf das hepatische Proteom von Mäusen .....	74
4.6.1	<i>Pathway</i> -Analysen von Hypo- und Hyperthyreose-induzierten Veränderungen des Leberproteoms von Mäusen .....	79
4.6.2	Vergleich der Wirkungen von Hypo- und Hyperthyreose auf das hepatische Proteom und Transkriptom von Mäusen .....	83
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1	Wirkungen von 3-T <sub>1</sub> AM auf das Transkriptom von PCCL3-Zellen.....	86
5.2	Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom und Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät .....	89
5.2.1	Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom von Mäusen unter Hochfettdiät .....	91
5.2.2	Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät .....	97
5.2.3	Vergleich der Wirkungen von 3,5-T <sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom und Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät.....	121
5.3	Wirkungen von T <sub>4</sub> - und Methimazol-induzierter Hyper- und Hypothyreose auf das hepatische Proteom von Mäusen.....	123
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	129
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>145</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>151</b>
	<b>Eigenständigkeitserklärung.....</b>	<b>153</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>155</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>157</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>159</b>



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
3,5-T <sub>2</sub>	3,5-Diiodthyronin
3-T <sub>1</sub> AM	3-Iodthyronamin
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ad	auf
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary</i> -DNA
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>et al.</i>	und andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDR	<i>false discovery rate</i>
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
h	Stunde
HFD	Hochfettdiät
<i>HPLC</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPT	<i>Hypothalamic-Pituitary-Thyroid</i>
i. p.	intraperitoneal
IAA	Iodacetamid

IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
k	Kilo
kcal	Kilokalorie
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-MS/MS
m	milli
M	Molar
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
n	nano
<i>n</i>	Anzahl
N/D	nicht detektiert
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
PCA	<i>Principle Component Analysis</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	Reverse Transkription-quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standarddiät
<i>ST</i>	<i>sense target</i>
Stab	Standardabweichung
T <sub>3</sub>	Triiodthyronin
T <sub>4</sub>	Tetraiodthyronin (Thyroxin)
TH	Schilddrüsenhormone
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor
TSH	Thyreoid-stimulierendes-Hormon (Thyreotropin)
ÜN	über Nacht
UT	Urea-Thiourea
vs.	<i>versus</i>
<i>WT</i>	<i>whole transcript</i>

## Zusammenfassung

Die klassischen Schilddrüsenhormone (TH) Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) sind für die Regulation zahlreicher Stoffwechselprozesse von Bedeutung. Dabei beeinflussen sie unter anderem maßgeblich den hepatischen Energie- und Lipidstoffwechsel. In den letzten Jahren haben die beiden Schilddrüsenhormon-Metaboliten 3-Iodthyronamin ( $3-T_1AM$ ) und 3,5-Diiodthyronin ( $3,5-T_2$ ) an Aufmerksamkeit gewonnen, da sie in diversen Studien als endogene, biologisch aktive Substanzen beschrieben wurden.

Die durch  $3-T_1AM$ -vermittelten metabolischen Effekte sind dabei denen der klassischen TH teilweise entgegengesetzt. Zudem konnte eine Interferenz mit der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT)-Achse demonstriert werden. In dieser Arbeit sollte die Hypothese einer direkten  $3-T_1AM$ -Wirkung auf die Schilddrüse überprüft werden. Dazu wurden in einem *in vitro*-Modell  $3-T_1AM$ -behandelte Thyreozyten der Zelllinie PCCL3 mittels Transkriptomanalysen untersucht.

Für den TH-Metaboliten  $3,5-T_2$  konnten in früheren Arbeiten anti-steatotische, anti-lipidemische und kalorogene Effekte demonstriert werden. Aufgrund fehlender thyreotoxischer Nebenwirkungen, wie sie für die klassischen TH typisch sind, liegt ein therapeutisches Potenzial von  $3,5-T_2$  zur Behandlung der mit steigender Inzidenz auftretenden Adipositas und der damit assoziierten Fettleber (*Steatosis hepatis*) nahe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die  $3,5-T_2$ -vermittelten Effekte auf die hepatischen Transkriptions- und Proteinmuster von Mäusen unter Standard- (SD) und Hochfettdiät (HFD) in komplementären Analysen charakterisiert.

Die TH-Homöostase wird durch den negativen Rückkopplungsmechanismus der HPT-Achse reguliert. Im klinischen Alltag wird jedoch häufig eine Störung dieses Gleichgewichts in Form einer Hypo- oder Hyperthyreose beobachtet. Um die physiologischen Auswirkungen dieser Erkrankungen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Proteomanalysen der Lebern von Mäusen mit induzierter Hypo- und Hyperthyreose durchgeführt, um bereits vorliegende korrespondierende Transkriptomdaten zu ergänzen.

In den Transkriptomanalysen der  $3-T_1AM$ -behandelten Thyreozyten konnten keine Genexpressionsänderungen nachgewiesen werden. Um diese Diskrepanz zu den in anderen Studien demonstrierten metabolischen Effekten zu beheben, könnte eine Optimierung des experimentellen Designs sinnvoll sein. Alternativ könnte gefolgert werden, dass vor allem post-transkriptionelle Prozesse die Wirkungen von  $3-T_1AM$  vermitteln.

Die komplementären Transkriptom- und Proteomdaten der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäuse deuteten auf eine Stimulation der hepatischen Cholesterol-, Gallensäure- und lokalen Sexualhormon-Biosynthese in Tieren unter HFD hin. Außerdem konnten in Mäusen unter HFD erhöhte hepatische Spiegel von Sexualhormonen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten zahlreiche Transkripte und Proteine, welche in den Lipidstoffwechsel und Citratzyklus involviert sind, signifikante Mengenveränderungen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung unter SD und HFD. Die in dieser Arbeit unter beiden Diäten beobachteten 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelten Effekte auf Xenobiotika-metabolisierende Proteine könnten dabei unter anderem auf unerwünschte thyreomimetische Nebeneffekte hindeuten. Daher sollte der therapeutische Einsatz von 3,5-T<sub>2</sub> als ein potenzielles anti-steatotisches Agens, wie es diverse vorangegangene Studien propagiert haben, kritisch betrachtet werden.

Die ersten Ergebnisse der hepatischen Proteomanalysen hyperthyreoter Mäuse deuteten auf eine Reduktion von oxidativem Stress und eine Induktion der Proteinbiosynthese hin, während unter hypothyreoten Bedingungen entgegengesetzte Effekte beobachtet wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten umfangreiche globale und komplementäre Datensätze mit Hilfe der Omics-Technologien *Transkriptomics* und *Proteomics*, für die Microarray- und Massenspektrometrie-basierte Analysen zum Einsatz kamen, generiert werden. Diese ermöglichten die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die physiologischen Effekte und Wirkungsweisen der TH-Metabolite 3-T<sub>1</sub>AM und 3,5-T<sub>2</sub> sowie die Krankheitsbilder Hypo- und Hyperthyreose.

## Summary

The classical thyroid hormones (TH) triiodothyronine ( $T_3$ ) and thyroxine ( $T_4$ ) regulate a variety of metabolic processes. Especially the hepatic energy and lipid metabolism is influenced by TH. In the last few years the TH metabolites 3-iodothyronamine (3- $T_1$ AM) and 3,5-diiodothyronine (3,5- $T_2$ ) gained attention as they were demonstrated to represent endogenous biologically active compounds.

The metabolic effects mediated by 3- $T_1$ AM are partially opposing to those of classical TH. Interference with the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis could be demonstrated. The hypothesis of a direct action of 3- $T_1$ AM on the thyroid gland should be investigated in this thesis. Therefore, 3- $T_1$ AM-treated PCCL3 thyrocytes were analyzed in an *in vitro* model using transcriptome profiling.

For the TH metabolite 3,5- $T_2$  anti-steatotic, anti-lipidemic and calorigenic effects were demonstrated in previous studies. Due to obviously missing thyrotoxic side effects as they are typically observed for classical TH, 3,5- $T_2$  was suggested as a potentially therapeutic agent against obesity and fatty liver (*steatosis hepatis*), which emerge with increasing incidence. In the context of this thesis 3,5- $T_2$ -mediated effects on hepatic transcriptome and proteome profiles from mice under standard (SD) and high-fat diet (HFD) were characterized in complementary analyses.

The TH homeostasis is maintained by negative feedback regulation of the HPT axis. However, an imbalance of TH resulting in hypo- or hyperthyroidism is often observed in clinical daily routine. To analyze physiological consequences of these disorders, proteome analyses of livers from mice with induced hypo- and hyperthyroidism were performed, complementing previously generated corresponding transcriptome data.

The transcriptome analyses of 3- $T_1$ AM-treated thyrocytes revealed no gene expression alterations. Since other studies demonstrated metabolic effects of 3- $T_1$ AM, this discrepancy might be due to different experimental designs. Alternatively, one could conclude that particularly post-transcriptional processes mediate 3- $T_1$ AM effects.

Data of complementary transcriptome and proteome analyses from 3,5- $T_2$ -treated mice indicated stimulation of hepatic cholesterol, bile acid and local sex hormone biosynthesis in animals under HFD. Additionally, elevated hepatic levels of sex hormones were detected in mice under HFD. Furthermore, numerous transcripts and proteins involved in lipid metabolism and citric acid cycle exhibited significantly altered amounts after 3,5- $T_2$  treatment under SD and HFD. The 3,5- $T_2$ -mediated effects on xenobiotic metabolizing proteins observed in these

analyses under both diets could indicate adverse thyromimetic side effects. Thus, the therapeutic use of 3,5-T<sub>2</sub> as a potentially anti-steatotic agent, as proposed by previous studies, should be assessed critically.

The first results of the hepatic proteome analyses from hyperthyroid mice indicated reduced oxidative stress and induced protein biosynthesis, while under hypothyroid conditions opposing effects were observed.

In the context of this thesis comprehensive global and complementary datasets were generated using the omics technologies *transcriptomics* and *proteomics*, where microarray- and mass spectrometry-based analyses were performed. These allowed to obtain new insights into physiological effects and modes of action of the TH metabolites 3-T<sub>1</sub>AM and 3,5-T<sub>2</sub> as well as of the disorders hypo- and hyperthyroidism.

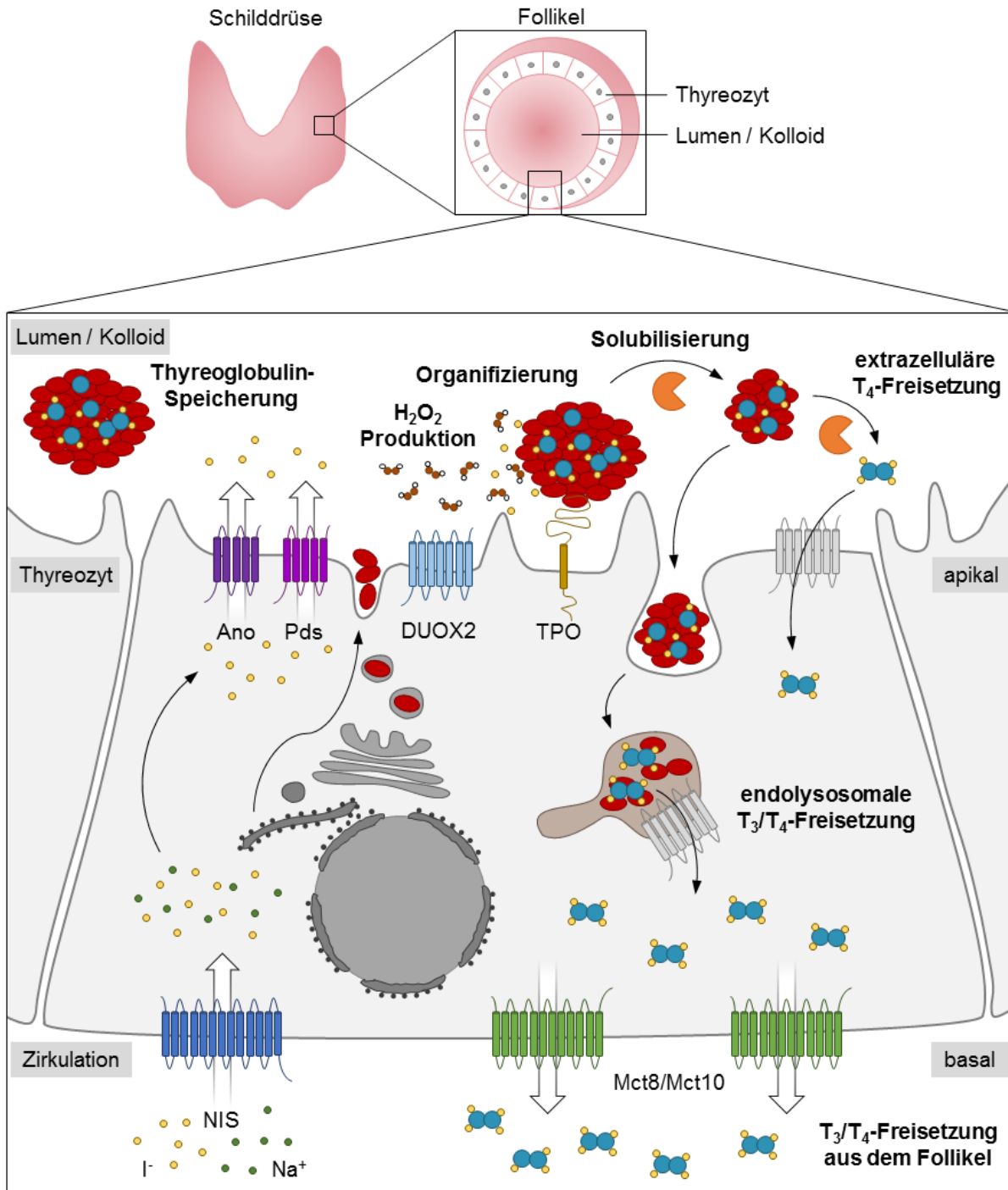
# 1 Einleitung

## 1.1 Biosynthese der klassischen Schilddrüsenhormone $T_3$ und $T_4$ in der Schilddrüse

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) ist die größte endokrine Drüse des Menschen. Sie besteht aus zwei Lappen (Lobi), die über eine Verengung (Isthmus) miteinander verbunden sind und so eine Schmetterlingsform ergeben. Die Schilddrüse befindet sich an der Vorderseite und zu beiden Seiten der Luftröhre (Trachea) unterhalb des Kehlkopfes. Ihre Hauptfunktion besteht in der Synthese, Speicherung und Sekretion der beiden Schilddrüsenhormone (TH) Triiodthyronin (3,3',5-Triiod-L-thyronin,  $T_3$ ) und Thyroxin (3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin,  $T_4$ ). Zudem sind die parafollikulären C-Zellen für die Produktion des Hormons Calcitonin verantwortlich, welches für die Regulation des Calcium- und Phosphathaushaltes von Bedeutung ist (Tortora und Derrickson, 2006).

Die funktionellen Einheiten der Schilddrüse bilden die Schilddrüsenfollikel, deren zelluläre Basiskomponente die Thyreozyten darstellen. Thyreozyten sind polarisierte Zellen, deren apikale Seite dem Follikel-Lumen zugewandt ist und es dadurch umschließt, während ihre basale Seite an ein dichtes Netz aus Blutgefäßen grenzt. Die Thyreozyten produzieren das Thyreoglobulin, welches ins Lumen abgegeben und dort als sogenanntes Kolloid zur späteren Synthese der TH gespeichert wird. Das für die Synthese von  $T_3$  und  $T_4$  benötigte Iodid, welches durch die Nahrung aufgenommen wird, gelangt über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in der basolateralen Plasmamembran aus dem Blut in die Thyreozyten. Durch apikale Membrantransporter wird das Iodid in das Follikellumen weiter transportiert, wobei Pendrin und Anoctamin als Transportproteine identifiziert wurden. Die Oxidation und Kopplung von Iodid an die Tyrosylreste des Thyreoglobulins (Organifizierung) im Lumen wird durch die membranständige Thyreoperoxidase (TPO) unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) katalysiert. Das  $H_2O_2$  wird dabei von der membranständigen Dualen Oxidase 2 (DUOX2) produziert. Durch die Iodierung des aromatischen Rings an den Positionen 3 und 5 der Tyrosylreste entstehen Monoiodtyrosin (MIT) und Diiodtyrosin (DIT). Die TPO katalysiert anschließend die oxidative Kopplung von zwei benachbarten Iodtyrosinen zu  $T_3$  (MIT + DIT) und  $T_4$  (DIT + DIT), welche so zunächst als Thyreoglobulin-gebundene Moleküle vorliegen. Die Solubilisierung des Thyreoglobulins erfolgt im Lumen durch Cathepsine, bevor es durch Endozytose in die Thyreozyten aufgenommen und durch endolysosomale Proteasen sowie weitere Cathepsine gespalten wird.  $T_3$  und  $T_4$  werden dabei ins Cytoplasma freigesetzt und

können dann an der basolateralen Membran über die Monocarboxylattransporter 8 und 10 (MCT8 und MCT10) ins Blut sezerniert werden (Abbildung 1.1). Die Schilddrüse produziert unter physiologischen Bedingungen vorwiegend das Prohormon  $T_4$ , welches erst in den Zielzellen bzw. in der Leber zum aktiven  $T_3$  deiodiert wird (Behrends *et al.*, 2012; Carvalho und Dupuy, 2017; Weber *et al.*, 2017).



**Abbildung 1.1: Die Biosynthese und Freisetzung von Schilddrüsenhormonen.** Die Schilddrüse besteht aus Follikeln, welche wiederum durch Thyreozyten gebildet werden, die das follikuläre Lumen umschließen. Iodid wird aus der Zirkulation durch den basolateralen Natrium-Iodid-Sympporter (NIS) in die Thyreozyten aufgenommen und über die apikalen Membrantransporter Anoctamin (Ano) und

Pendrin (Pds) ins Lumen transportiert. Thyreoglobulin wird in den Thyreozyten synthetisiert und in das Lumen sekretiert, wo es quervernetzt als Kolloid gespeichert wird. Die Thyreoperoxidase (TPO) katalysiert die Iodierung (Organifizierung) von Tyrosylresten des Thyreoglobulins unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches von der Dualen Oxidase 2 (DUOX2) produziert wird. Dabei entstehen die an Thyreoglobulin gebundenen TH  $T_3$  und  $T_4$ . Nach der Solubilisierung durch Cathepsine wird Thyreoglobulin endozytiert und  $T_3/T_4$  nach endolysosomaler Spaltung ins Cytoplasma freigesetzt.  $T_4$  kann auch extrazellulär im follikulären Lumen durch Cathepsine freigesetzt und durch einen noch unbekanntem Transporter in die Thyreozyten transportiert werden. Der  $T_3/T_4$ -Export aus dem Follikel ins Blut erfolgt über die basolateralen Monocarboxylattransporter 8 und 10 (MCT8, MCT10) (nach Carvalho und Dupuy, 2017; Weber *et al.*, 2017).

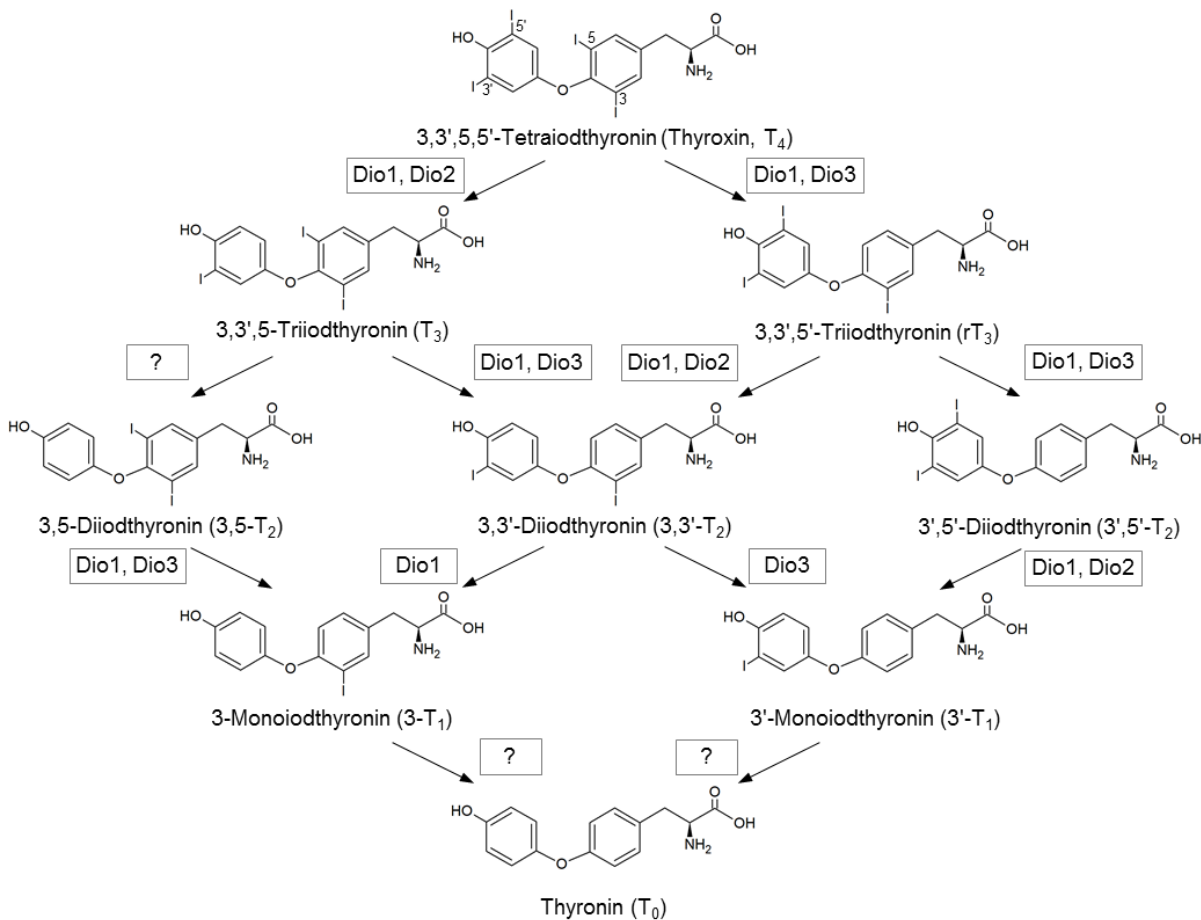
## 1.2 Transport und Metabolismus der klassischen Schilddrüsenhormone $T_3$ und $T_4$

Der Transport der hydrophoben TH  $T_3$  und  $T_4$  im Blut erfolgt zu mehr als 99 % gebunden an Transportproteine. Dabei sind 75 % des  $T_4$  an das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) gebunden, 20 % liegen gebunden an das Thyroxin-bindende Präalbumin (Transthyretin, TTR) vor und der Rest wird von Albumin transportiert (Refetoff, 2000). Die Bindung der TH an Transportproteine hat eine Stabilisierung und damit eine Erhöhung der Halbwertszeit zur Folge, welche bei  $T_4$  7 Tage und bei  $T_3$  hingegen nur einen Tag beträgt (Behrends *et al.*, 2012).

Die Aufnahme von TH aus dem Blut in Zielzellen findet mit Hilfe von membranständigen Transportproteinen statt. Unter ihnen gibt es jedoch nur wenige mit hoher Spezifität für TH. Zu diesen TH-Transportern gehören neben dem äußerst spezifischen MCT8 auch die weniger spezifischen Transporter MCT10, der Organo-Anion-Transporter 1C1 (OATP1C1) sowie die L-Typ Aminosäure-Transporter 1 und 2 (LAT1 und LAT2) (Visser *et al.*, 2011).

Die Umwandlung von TH in den Zielzellen wird durch gewebsspezifische Deiodasen katalysiert, welche zur Familie der Selenoproteine gehören. Die Deiodasen vom Typ I (Dio1) und Typ II (Dio2) katalysieren dabei die Entstehung des biologisch aktiven  $T_3$  aus  $T_4$ , während die Deiodase vom Typ III (Dio3) zusammen mit der Dio1 die Bildung von Metaboliten aus  $T_4$  und  $T_3$ , wie das transkriptionell inaktive *reverse*  $T_3$  ( $rT_3$ ) katalysiert (Abbildung 1.2) (Moreno *et al.*, 2008). Dio1 kommt überwiegend in der Plasmamembran von Zellen der Leber, Niere und Schilddrüse vor, während Dio2 im Endoplasmatischen Retikulum des zentralen Nervensystems, der Hypophyse, der Schilddrüse und des braunen Fettgewebes synthetisiert wird. Dio3 hingegen ist in der Plasmamembran der Haut, von vaskulärem Gewebe und der Plazenta lokalisiert (Mullur *et al.*, 2014). Die Deiodasen Dio1, Dio2 und Dio3 katalysieren außerdem die weitere Metabolisierung der TH zu Diiodthyroninen, wie 3,3'-Diiodthyronin (3,3'- $T_2$ ), 3',5'-Diiodthyronin (3',5'- $T_2$ ) und eventuell 3,5-Diiodthyronin (3,5- $T_2$ ). Diese können in der

Folge in Monoiodthyronine ( $T_1$ ) und schließlich in Thyronine ( $T_0$ ) transformiert werden (Mondal *et al.*, 2016).



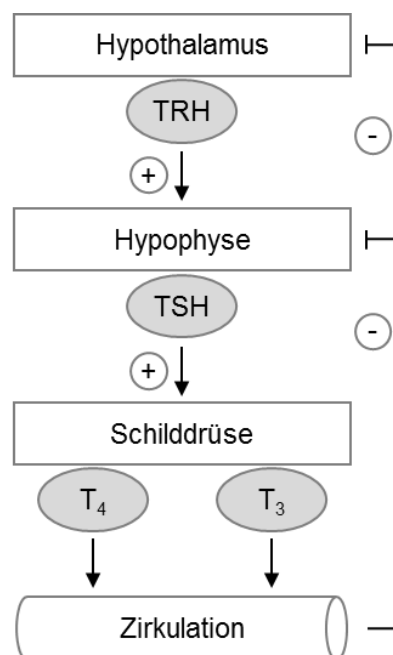
**Abbildung 1.2: Die sequenzielle Monodeiodierungs-Kaskade.** Durch schrittweise Deiodierung entstehen die TH-Metabolite aus Thyroxin ( $T_4$ ). Die Deiodierung erfolgt durch Deiodasen vom Typ I, II und III (Dio1, Dio2, Dio3). Fragezeichen markieren bisher unbekannte Reaktionen (nach Mondal *et al.*, 2016; Gnocchi *et al.*, 2016).

### 1.3 Regulation der Schilddrüsenhormone

Die Synthese und Sekretion der TH wird über einen komplexen Rückkopplungsmechanismus, die sogenannte Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (englisch: *hypothalamic-pituitary-thyroid*)-Achse, kurz HPT-Achse, reguliert (Abbildung 1.3). Im Hypothalamus synthetisieren Neuronen im paraventriculären Nucleus das Tripeptid Thyreotropin-*Releasing*-Hormon (TRH), welches über die Eminentia mediana und das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem direkt in den Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) gelangt. Dort stimuliert TRH die Synthese und Sekretion des Thyreoida-stimulierenden-Hormons (Thyreotropin, TSH) in den thyreotropen Zellen. Das Glykoprotein TSH gelangt dann über den Blutkreislauf zur Schilddrüse, wo es an den G-Protein gekoppelten TSH-Rezeptor der

Thyreozyten bindet. Als Folge der G-Protein-vermittelten Stimulation der Adenylatcyclase steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel an, wodurch die Iodid-Aufnahme in die Thyreozyten sowie die Synthese und Organifizierung des Thyreoglobulins verstärkt werden, was letztlich die Produktion der TH induziert. Eine hohe TH-Konzentration im Blut führt wiederum zu einer negativen Rückkopplung auf die Expression der für TRH und TSH kodierenden Gene im Hypothalamus und der Hypophyse (Zoeller *et al.*, 2007).

Zudem können auch Umwelteinflüsse, wie z. B. Fasten oder eine fettreiche Ernährung, die TRH-Freisetzung in den Neuronen des Hypothalamus und so die TH-Synthese beeinflussen (Fekete und Lechan, 2014).

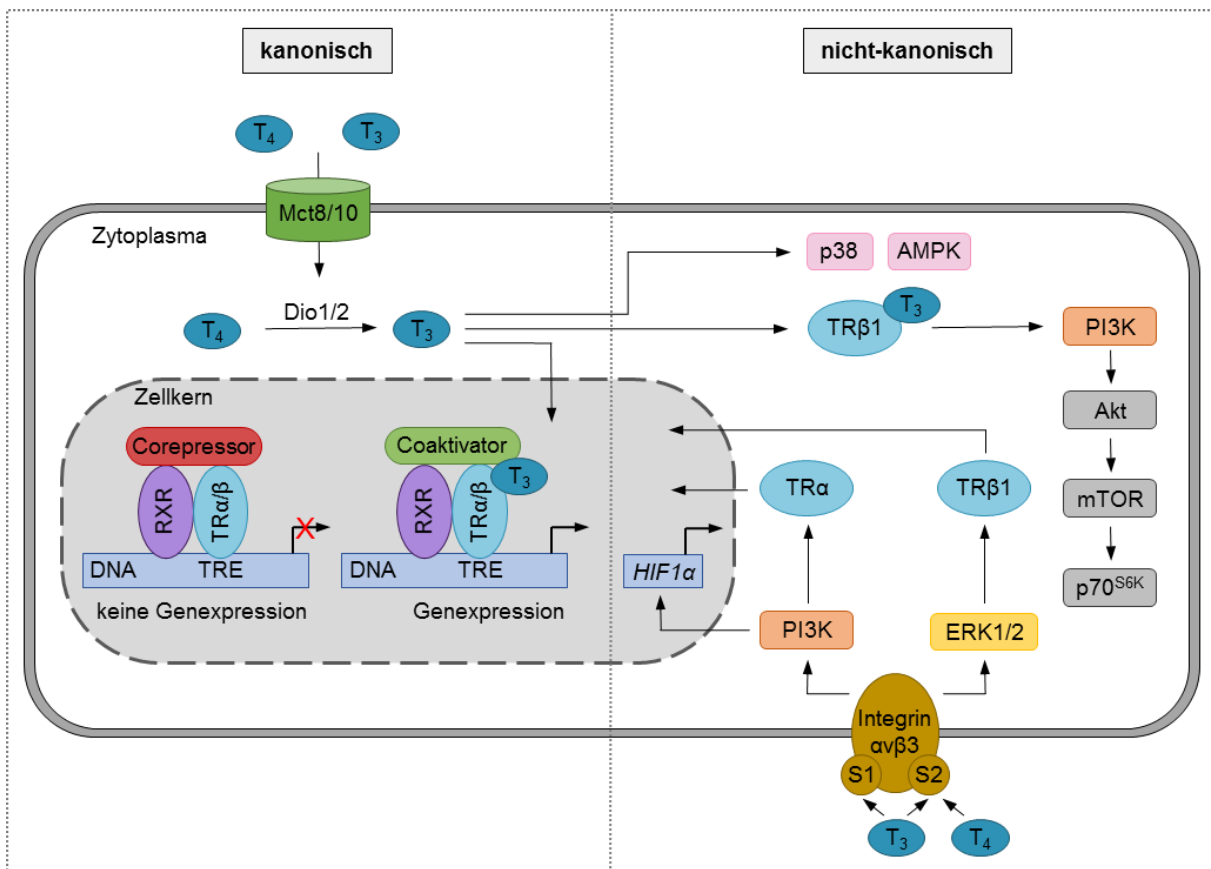


**Abbildung 1.3: Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT)-Achse.** Das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) wird aus dem Hypothalamus freigesetzt und stimuliert in der Hypophyse die Synthese sowie Sekretion des Thyreoidea-stimulierenden-Hormons (TSH). TSH wiederum erhöht die Produktion der Schilddrüsenhormone  $T_3$  und  $T_4$  in der Schilddrüse, welche in die Blutzirkulation sezerniert werden und in einer negativen Rückkopplung die TRH- und TSH-Bildung hemmen können.

#### 1.4 Molekulare Wirkmechanismen von Schilddrüsenhormonen

Die Wirkungen von TH werden nach klassischer Lehrmeinung auf molekularer Ebene überwiegend durch den kanonischen (genomischen) Signalweg vermittelt, wobei nukleäre TH-Rezeptoren (TR) die zentrale Rolle spielen. TR können als Transkriptionsfaktoren zusammen mit nukleären Corepressoren oder Coaktivatoren an TH-responsive Elemente (TRE) im Bereich von Zielgenen binden und so die Genexpression beeinflussen. In den meisten Fällen wird die Genexpression positiv reguliert. Dabei rekrutiert der an das TRE

gebundene TR in Abwesenheit von T<sub>3</sub> Corepressoren und inhibiert so die Zielgenexpression. Werden TH jedoch über TH-Transporter in die Zelle aufgenommen und T<sub>4</sub> intrazellulär durch Deiodasen zu T<sub>3</sub> umgewandelt, transloziert T<sub>3</sub> in den Zellkern und bindet dort an den TR. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Dissoziation der Corepressoren und Bindung von Coaktivatoren bewirkt. In Folge wird die Expression der Zielgene induziert. Ein Beispiel für negative Regulation durch TH stellen die in der HPT-Achse zentralen Gene *TRH* und *TSHB* dar, deren Expression durch Bindung von T<sub>3</sub> an den TR supprimiert wird. Meist binden TRs als Heterodimere an TREs, wobei der TR bevorzugt mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) heterodimerisiert (Abbildung 1.4). Außerdem können TRs mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren, wie z. B. dem Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) oder dem Leber-X-Rezeptor (LXR), interagieren (Brent, 2012).



**Abbildung 1.4: Die kanonischen und nicht-kanonischen Wirkmechanismen von Schilddrüsenhormonen.** Einzelheiten siehe Text (nach Brent, 2012; Cao *et al.*, 2005; Bergh *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009; Irrcher *et al.*, 2008).

TRs liegen in den wesentlichen Isoformen TRα und TRβ vor, welche beim Menschen durch die beiden Gene *THRA* und *THRB* kodiert werden. Durch alternatives Spleißen der *THRA*-mRNA entstehen die Isoformen TRα1, TRα2 und TRα3, wobei nur erstere TH binden kann. Hingegen besitzen alle drei TRβ-Isoformen, namentlich TRβ1, TRβ2 und TRβ3, die Fähigkeit

T<sub>3</sub> zu binden (Brent, 2012). Die TR-kodierenden Gene werden gewebespezifisch exprimiert, wobei TR $\alpha$ 1 im Herzen, der Skelettmuskulatur, dem zentralen Nervensystem und dem Gastrointestinaltrakt dominiert. TR $\beta$ 1 wird hingegen überwiegend in der Leber und der Niere gebildet. TR $\beta$ 2 kommt insbesondere in der Hypophyse, dem Hypothalamus, dem Innenohr und der Retina vor (Moran und Chatterjee, 2015).

Neben dem kanonischen Signalweg der direkten Beeinflussung der Genexpression über T<sub>3</sub>-gebundene TRs sind auch verschiedene nicht-kanonische (nicht-genomische) Wirkmechanismen beschrieben (Abbildung 1.4). So kann T<sub>3</sub> beispielsweise an den cytosolischen TR $\beta$ 1 binden, welcher dann die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Die aktivierte PI3K wiederum induziert daraufhin die PKB/Akt-mTOR-p70<sup>S6K</sup>- (Proteinkinase B/mechanistic target of rapamycin/p70-S6-Kinase) Phosphorylierungskaskade (Cao *et al.*, 2005). Zudem können TH auch ohne direkte Bindung an TRs Signalkaskaden aktivieren, indem sie an den Plasmamembranrezeptor Integrin  $\alpha\beta$ 3 binden (Bergh *et al.*, 2005). Der Integrinrezeptor besitzt zwei Bindestellen für TH, wobei an die S1 nur T<sub>3</sub> bindet. Dies aktiviert die PI3K und führt zur Translokation von TR $\alpha$  in den Nukleus sowie der Transkriptionsinitiation des für den Hypoxie-induzierten Faktor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) kodierenden Gens. An der Bindestelle S2 kann neben T<sub>3</sub> auch T<sub>4</sub> binden und somit ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) aktivieren, wodurch TR $\beta$ 1 in den Nukleus transloziert (Lin *et al.*, 2009). Darüber hinaus sind weitere T<sub>3</sub>-abhängig induzierte Phosphorylierungskaskaden nachgewiesen worden. Dazu zählen z. B. die Aktivierung der p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) sowie der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) (Irrcher *et al.*, 2008).

## 1.5 Physiologische Wirkungen von Schilddrüsenhormonen

TH spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse. Ihre Rezeptoren sind in nahezu allen Organen vorhanden und so beeinflussen sie nicht nur anabole und katabole Stoffwechselprozesse, sondern sind auch für Wachstums- und Differenzierungsprozesse von essentieller Bedeutung. Zu den wichtigsten Zielgeweben der TH zählen das Gehirn, die Leber, das Herz-Kreislauf-System, die Skelettmuskulatur, Knochen, weißes und braunes Fettgewebe, der Darm sowie das Pankreas. Die Wirkungen der TH werden nach klassischer Lehrmeinung überwiegend über den kanonischen TR-vermittelten Signalweg durch Initiation der Expression von Zielgenen reguliert (siehe Kapitel 1.4) (Mullur *et al.*, 2014), wobei die Ergebnisse jüngerer Studien auf eine möglicherweise weitaus größere Bedeutung der nicht-kanonischen Signaltransduktion hindeuten als ursprünglich angenommen (Hönes *et al.*, 2017).

Im Rahmen des Energiestoffwechsels sind TH für die Regulation von Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel wichtig. So können TH die Gluconeogenese, Glycolyse sowie die Glycogenolyse stimulieren. Im Lipidstoffwechsel der Leber werden der Triglycerid-Abbau zu

Fettsäuren (Lipolyse) und die Triglycerid-Synthese (Lipogenese) sowie die Synthese und Aufnahme von Cholesterol und dessen Abbau zu Gallensäuren angeregt (Mullur *et al.*, 2014). Die Wirkungen der TH auf die Leber, welche in dieser Arbeit von besonderem Interesse waren, werden in Kapitel 1.9 genauer erläutert.

Durch die TH-aktivierten Stoffwechselprozesse erhöhen TH außerdem den Grundumsatz, wodurch auch die mitochondriale Entkopplung, die Thermogenese und der Sauerstoffverbrauch verstärkt sowie das Körpergewicht reduziert werden. Zudem üben TH kardiovaskuläre Effekte aus, indem sie Herzfrequenz und Blutdruck stimulieren. Eine essentielle Rolle spielen TH auch während der Entwicklung des Gehirns und der Bildung der Knochen (Mullur *et al.*, 2014).

### **1.6 Fehlfunktionen im Schilddrüsenhormonhaushalt**

Die TH-Homöostase wird durch den negativen Rückkopplungsmechanismus der HPT-Achse reguliert (siehe Kapitel 1.3). Jedoch kann es durch verschiedene Fehlfunktionen zu einem Ungleichgewicht der TH und somit zu diversen Krankheitsbildern kommen. Zumeist sind morphologische Veränderungen oder Störungen der Funktion der Schilddrüse Ursache für genetisch bedingte oder erworbene Erkrankungen (Pfreundschuh und Schölmerich, 2004). Im Folgenden werden einige Fehlfunktionen genauer erläutert.

Eine Überfunktion der Schilddrüse wird als Hyperthyreose bezeichnet und ist durch eine pathologisch erhöhte Synthese und Sekretion von TH gekennzeichnet. Die häufigste Ursache für Hyperthyreose ist Morbus Basedow, wobei es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, die u. a. durch ein krankhaftes Hervortreten des Augapfels (Exophthalmus) charakterisiert ist. Dabei werden Autoantikörper gegen den thyreoidalen TSH-Rezeptor gebildet, welcher durch die Antikörperbindung dauerhaft aktiviert wird und daraufhin vermehrt TH produziert. Die Hyperthyreose kann außerdem in einer multifokalen Autonomie der Schilddrüse begründet sein, wobei mehrere sogenannte heiße Schilddrüsenknoten unabhängig von der Regulation durch die HPT-Achse TH produzieren (de Leo *et al.*, 2016).

Eine Unterfunktion der Schilddrüse wird als Hypothyreose bezeichnet und ist durch einen Mangel an Schilddrüsenhormonen charakterisiert. Die Hypothyreose wird meist durch eine chronische Autoimmunerkrankung, welche als Hashimoto-Thyreoiditis bezeichnet wird, verursacht. Charakteristisch hierfür sind in der Zirkulation nachweisbare Autoantikörper gegen die TPO und Thyreoglobulin. Weitere Ursachen einer Hypothyreose können Iodmangel oder Fehlfunktionen der Hypophyse und des Hypothalamus sein. Bei Kindern kann eine Hypothyreose zum sogenannten Kretinismus führen, welcher sich in verminderter mentaler und physischer Entwicklung äußert (Chaker *et al.*, 2017). Iodmangel ist außerdem die häufigste Ursache für die Entstehung einer Struma, welche die gutartige Vergrößerung des Schilddrüsengewebes bezeichnet (Zimmermann und Boelaert, 2015).

Neben Erkrankungen der Schilddrüse können auch Mutationen, welche die Wirkung von TH in peripheren Organen beeinträchtigen ursächlich für verschiedene Fehlfunktionen sein. Diese treten jedoch deutlich seltener auf. Hier sei beispielsweise das Allan-Herndon-Dudley-Syndrom genannt, welches eine X-chromosomale Erkrankung mit mentaler und psychomotorischer Retardierung ist. Sie wird durch eine Mutation im für den TH-Transporter MCT8 kodierenden Gen hervorgerufen und verhindert die Aufnahme von  $T_3$  in primäre kortikale Neurone (Dumitrescu *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2009). Ein weiteres Beispiel ist die Resistenz gegenüber TH, die sogenannte RTH $\alpha$  und RTH $\beta$ , welche durch Mutationen in den für TR kodierenden Genen *THRA* bzw. *THRB* verursacht werden. Patienten mit RTH $\beta$  weisen erhöhte TH- und normale bis erhöhte TSH-Spiegel sowie Struma, Tachykardie, Schwerhörigkeit und Sehschwäche auf. Hingegen zeigen RTH $\alpha$ -Patienten nahezu normale TH- und TSH-Spiegel bei verzögertem Knochenwachstum, Bradykardie und chronischer Konstipation (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2014).

## 1.7 Schilddrüsenhormon-Metabolite

Die klassischen TH  $T_3$  und  $T_4$  können durch schrittweise Deiodierung mittels verschiedener Deiodasen neben  $rT_3$  auch zu Diiodthyroninen ( $T_2$ ), wie 3,3'- $T_2$ , 3',5'- $T_2$  und 3,5- $T_2$ , sowie Monoiodthyroninen ( $T_1$ ) und Thyroninen ( $T_0$ ) umgewandelt werden (siehe Kapitel 1.1) (Mondal *et al.*, 2016). Zusätzlich zur Deiodierung können TH auch am Alaninrest decarboxyliert werden, wodurch die sogenannten Thyronamine entstehen. Zu diesen TH-Derivaten zählen 3-Iodthyronamin (3- $T_1$ AM) und Thyronamin ( $T_0$ AM), für die physiologische Effekte demonstriert werden konnten (Moreno *et al.*, 2008). Weiterhin werden TH auch in anderen biochemischen Prozessen metabolisiert. Dazu zählt beispielsweise die Konjugation der phenolischen Hydroxylgruppe mit Sulfat oder Glucuronsäure, was zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit und somit erleichterten Ausscheidung über Galle bzw. Urin führt. Außerdem können durch Decarboxylierung und Deaminierung der TH die sogenannten Essigsäure-TH-Analoga, wie z. B. Triac (*triiodothyroacetic acid*) und Tetrac (*tetraiodothyroacetic acid*), gebildet werden (Senese *et al.*, 2014).

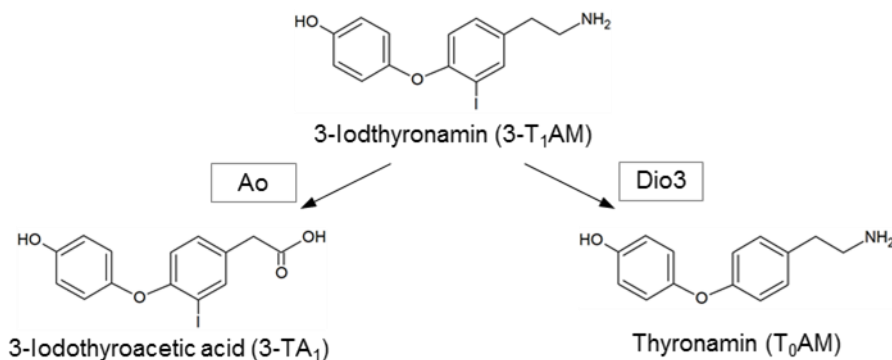
Im Folgenden wird auf die beiden TH-Metabolite 3,5- $T_2$  und 3- $T_1$ AM genauer eingegangen, da sie in dieser Arbeit von besonderer Relevanz sind.

### 1.7.1 3-Iodthyronamin (3- $T_1$ AM)

3-Iodthyronamin (3- $T_1$ AM) wurde erstmals 2004 als ein endogenes und biologisch aktives TH-Derivat in Nagern detektiert (Scanlan *et al.*, 2004). Auch in humanem Serum konnte 3- $T_1$ AM mittels Chemilumineszenz-Immunoassay mit einer durchschnittlichen Konzentration von 66nM nachgewiesen werden (Hoefig *et al.*, 2011). Als Transportprotein im Blut dient das

Apolipoprotein B-100, welches 3-T<sub>1</sub>AM mit hoher Affinität bindet (Roy *et al.*, 2012). Die 3-T<sub>1</sub>AM-Synthese aus T<sub>3</sub> erscheint zwar wahrscheinlich, wurde aber noch nicht nachgewiesen. Der genaue Syntheseort ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, wobei die Schilddrüse selbst nicht ausgeschlossen werden kann, jedoch eine extrathyreoidale Synthese vorgeschlagen wurde (Hoefig *et al.*, 2011). Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass 3-T<sub>1</sub>AM in murinem Darmgewebe *ex vivo* aus T<sub>4</sub> unter Beteiligung der intestinalen Ornithindecaboxylase (ODC) synthetisiert werden kann (Hoefig *et al.*, 2015).

Obwohl die Aufnahme von 3-T<sub>1</sub>AM in verschiedene Zelltypen demonstriert wurde, ist der Transportmechanismus über die Zellmembran noch weitgehend unbekannt (Saba *et al.*, 2010; Ianculescu *et al.*, 2009). 3-T<sub>1</sub>AM bindet nicht an die Rezeptoren der klassischen TH, jedoch wurde der *trace amine-associated receptor 1* (TAAR1) als 3-T<sub>1</sub>AM-Rezeptor charakterisiert (Scanlan *et al.*, 2004). TAAR1 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher durch Bindung von 3-T<sub>1</sub>AM aktiviert wird und über Stimulation der Adenylatcyclase einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt (Borowsky *et al.*, 2001). Außerdem kann 3-T<sub>1</sub>AM weitere Rezeptoren wie den alpha-2A adrenergen Rezeptor (ADRA2A) binden, was entgegengesetzt zur TAAR1-Aktivierung den intrazellulären cAMP-Spiegel senkt (Regard *et al.*, 2007; Dinter *et al.*, 2015b). Weiterhin können auch β-adrenerge Rezeptoren sowie TAAR5, ein weiteres Mitglied der TAAR-Familie, direkt durch 3-T<sub>1</sub>AM-Bindung reguliert werden (Dinter *et al.*, 2015a; Dinter *et al.*, 2015c). In Zellen des Auges ist 3-T<sub>1</sub>AM in der Lage durch Aktivierung des *transient receptor potential melastatin 8* (TRPM8) Kanals die intrazelluläre Calcium-Konzentration zu erhöhen (Khajavi *et al.*, 2015; Lucius *et al.*, 2016).



**Abbildung 1.5: 3-Iodthyronamin (3-T<sub>1</sub>AM) und seine Metabolite.** 3-Iodothyroacetic acid (3-TA<sub>1</sub>) und Thyronamin (T<sub>0</sub>AM) entstehen aus 3-T<sub>1</sub>AM durch Desaminierung und Deiodierung. Ao: Aminoxidase; Dio3: Diodase Typ III (nach Piehl *et al.*, 2008b; Wood *et al.*, 2009).

3-T<sub>1</sub>AM kann intrazellulär durch Sulfotransferasen sulfatiert, durch Deiodasen in Thyronamin (T<sub>0</sub>AM) konvertiert oder durch Desaminierung in 3-TA<sub>1</sub> (*3-iodothyroacetic acid*) umgesetzt werden (Abbildung 1.5) (Pietsch *et al.*, 2007; Piehl *et al.*, 2008b; Wood *et al.*, 2009). Diese komplexen Reaktionen und die 3-T<sub>1</sub>AM-Metabolite konnten *in vivo* im Serum von Mäusen

verifiziert werden, was die Aufklärung der Wirkmechanismen von 3-T<sub>1</sub>AM deutlich erschwert (Hackenmueller und Scanlan, 2012).

In einer von Scanlan *et al.* (2004) durchgeführten Studie an Nagern führte die intraperitoneale Verabreichung von 50 mg/kg 3-T<sub>1</sub>AM innerhalb weniger Minuten zu einer ausgeprägten Hypothermie und Bradykardie. Aufgrund dieser im Vergleich zu jenen der klassischen TH antagonistischen Effekte wurde 3-T<sub>1</sub>AM zunächst nur als eine Art Feedback-Regulator betrachtet. Jedoch wurden in zahlreichen nachfolgenden Studien im Tiermodell auch metabolische Effekte von 3-T<sub>1</sub>AM beschrieben, die mit denen der klassischen TH einhergehen. Zu diesen metabolischen Effekten zählte vor allem der Einfluss von 3-T<sub>1</sub>AM auf den Lipid- und Glucosestoffwechsel (Braulke *et al.*, 2008; Klieverik *et al.*, 2009; Regard *et al.*, 2007; Manni *et al.*, 2012; Manni *et al.*, 2013; Haviland *et al.*, 2013; Mariotti *et al.*, 2014): In Nagern führte die einmalige Gabe von 50 mg/kg 3-T<sub>1</sub>AM zu einer Verminderung des Grundumsatzes, des respiratorischen Quotienten und des Körperfettes sowie zu Ketonurie. Dies deutet darauf hin, dass der Metabolismus von Kohlenhydrat- auf Lipidverwertung umgestellt wird (Braulke *et al.*, 2008). Außerdem führt dieselbe Dosis 3-T<sub>1</sub>AM zu einer Steigerung der Glucose- und Glucagonkonzentration sowie zur Verringerung der Insulinkonzentration im Plasma von Nagern (Klieverik *et al.*, 2009; Regard *et al.*, 2007). In späteren Studien, bei denen um mehrere Zehnerpotenzen geringere Dosen 3-T<sub>1</sub>AM intracerebroventrikulär injiziert wurden, konnte der Effekt auf die Plasma-Glucosekonzentration ebenfalls nachgewiesen werden (Manni *et al.*, 2012; Manni *et al.*, 2013). Untersuchungen zur fortlaufenden 3-T<sub>1</sub>AM Applikation (10 mg/kg täglich über 8 Tage) in einem adipösen Mausmodell führten zu erhöhter Lipolyse und einem Gewichtsverlust, welcher auch 2 Wochen nach Beendigung der 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung anhielt (Haviland *et al.*, 2013). Die Steigerung der Lipolyse konnte ebenfalls in Microarray-basierten Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden. Hierbei führte die Injektion von 3-T<sub>1</sub>AM in Ratten (10 mg/kg 2-mal täglich über 5 Tage) im Leber- und Fettgewebe zur veränderten Expression von Genen, deren kodierte Proteine in Lipolyse, Beta-Oxidation, Adipogenese und den Lipoprotein-Metabolismus involviert sind (Mariotti *et al.*, 2014). Eine mögliche klinische Relevanz von 3-T<sub>1</sub>AM wurde in einer humanen Studie im Jahr 2012 demonstriert. Hierbei wurde gezeigt, dass die 3-T<sub>1</sub>AM-Serumkonzentration in Typ-2-Diabetes Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist und mit der des glykierten Hämoglobins korreliert (Galli *et al.*, 2012). Bezüglich der Funktion von 3-T<sub>1</sub>AM als Feedback-Regulator konnte eine Interferenz mit der HPT-Achse gezeigt werden, da die 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung in Tiermodellen zu verringerten T<sub>3</sub>-, T<sub>4</sub>- und TSH-Konzentrationen führte (Manni *et al.*, 2012; Klieverik *et al.*, 2009). Weiterhin sind für die intracerebroventrikuläre Applikation von 3-T<sub>1</sub>AM neurologische Effekte in Nagern beschrieben worden, zu denen eine verbesserte Lernfähigkeit, eine

verringerte Schmerzempfindlichkeit und ein verändertes Schlafverhalten zählen (Manni *et al.*, 2013; James *et al.*, 2013).

### 1.7.2 3,5-Diiodthyronin (3,5-T<sub>2</sub>)

Der endogene und biologisch aktive TH-Metabolit 3,5-Diiodthyronin (3,5-T<sub>2</sub>) hat in den letzten Jahren aufgrund seiner besonderen metabolischen Effekte an Aufmerksamkeit gewonnen (Goglia, 2014). Der natürlich vorkommende Metabolit konnte in humanem Serum in subnanomolaren Konzentrationen von durchschnittlich 0,2 - 0,3 nM mittels Chemilumineszenz-Immunoassay nachgewiesen werden (Lehmpful *et al.*, 2014; Pietzner *et al.*, 2015). Die Synthese von 3,5-T<sub>2</sub> erfolgt vermutlich direkt durch Deiodierung aus T<sub>3</sub>, wobei der genaue Syntheseweg von endogenem 3,5-T<sub>2</sub> aber immer noch unklar ist. Zwar konnte die 3,5-T<sub>2</sub>-Entstehung aus T<sub>3</sub> *in vivo* in Ratten und menschlichen Probanden demonstriert werden (Moreno *et al.*, 2002; Faber *et al.*, 1982), allerdings fehlt bisher noch der biochemische Nachweis *in vitro* (Piehl *et al.*, 2008a). Die Syntheseorte von 3,5-T<sub>2</sub> sind ebenfalls noch nicht abschließend charakterisiert, jedoch wird auch eine extrathyreoidale Produktion vermutet, da 3,5-T<sub>2</sub> im Serum thyreoidektomierter, Thyroxin-supplementierter Patienten detektiert wurde (Lehmpful *et al.*, 2014).

In zahlreichen Studien wurde der Einfluss von 3,5-T<sub>2</sub> auf den Energie- und Lipidmetabolismus beschrieben, ohne dass sich dabei thyreomimetische Nebenwirkungen, welche typischerweise bei T<sub>3</sub>-Gabe auftreten, einstellten. Daher wurde 3,5-T<sub>2</sub> zunächst als ein potenzielles hypolipidemisches Agens gegen Adipositas und *Steatosis hepatis* (Fettleber) diskutiert (Coppola *et al.*, 2014). Jedoch wurden kürzlich thyreomimetische Effekte von 3,5-T<sub>2</sub>, wie die Suppression der HPT-Achse und kardiale Effekte, demonstriert, was einen therapeutischen Einsatz in Frage stellt (Jonas *et al.*, 2015) (siehe Kapitel 1.9.2).

Die molekularen Wirkmechanismen von 3,5-T<sub>2</sub> sind noch nicht vollständig geklärt. Der Transporter, welcher den Transport von 3,5-T<sub>2</sub> in die Zielzellen vermittelt, wurde noch nicht identifiziert, jedoch konnte MCT8 aufgrund fehlender Affinität ausgeschlossen werden (Kinne *et al.*, 2010). Intrazellulär kann 3,5-T<sub>2</sub> den TR binden, allerdings ist seine Bindungsaffinität im Vergleich zu T<sub>3</sub> bis zu 500-fach geringer (Ball *et al.*, 1997). Daher ist es bei hinreichend hoher Konzentration des Metaboliten möglich, dass 3,5-T<sub>2</sub> über den kanonischen TR-vermittelten Signalweg die Genexpression beeinflussen kann. Der Einfluss von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Expression TH-responsiver Gene konnte tatsächlich unter Verabreichung suprphysiologischer Konzentrationen demonstriert werden (Lietzow *et al.*, 2016). Weiterhin wurden in Knochenfischen die Bindung von 3,5-T<sub>2</sub> an die lange TRβ1-Isoform und deren Aktivierung gezeigt (Mendoza *et al.*, 2013; Navarrete-Ramírez *et al.*, 2014). Die Wirkung von 3,5-T<sub>2</sub> über nicht-TR-vermittelte, nicht-kanonische Signalwege konnte ebenfalls bestätigt werden. In Mitochondrien ist die Va Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (COX) der mitochondrialen

Atmungskette als 3,5-T<sub>2</sub>-spezifische Bindungsstelle nachgewiesen worden. Dadurch wird die allosterische ATP-Inhibition von COX aufgehoben und die oxidative Phosphorylierung ineffektiver, d. h. 3,5-T<sub>2</sub> kann die Atmungskette entkoppeln (Arnold *et al.*, 1998). Außerdem wurde in Hochfett-diät-gefütterten Ratten gezeigt, dass 3,5-T<sub>2</sub> die hepatische Aktivität der Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) erhöht und somit nachgeschaltete Signalwege beeinflusst (de Lange *et al.*, 2011).

## 1.8 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan

Die Leber ist im rechten Oberbauch unterhalb des Zwerchfells lokalisiert. Sie ist in zwei Leberlappen unterteilt, welche wiederum aus zahlreichen Leberläppchen bestehen, die eine sechseckige Struktur bilden und die Funktionseinheiten der Leber darstellen. Letztere bestehen vorwiegend aus Hepatozyten, welche um eine zentrale Vene angeordnet sind, zwischen denen sich die sinusoiden Leberkapillaren befinden, welche spezielle stationäre Makrophagen (Kupffer-Zellen) enthalten. An den Ecken der Leberläppchen finden sich zudem die sogenannten Glisson-Trias, welche jeweils aus Verzweigungen der Pfortader, der Leberarterie und des Gallengangs bestehen. Über die Glisson-Trias gelangt sauerstoffreiches Blut aus der Leberarterie sowie sauerstoffarmes, nährstoffreiches Blut aus der Pfortader vom Magen-Darm-Trakt zu den sinusoiden Leberkapillaren. Dort kommt es zum Stoffaustausch mit den Hepatozyten, wobei Sauerstoff, Nährstoffe und bestimmte Giftstoffe aufgenommen und endogen synthetisierte Substanzen sowie Nährstoffe für andere Zellen ins Blut abgegeben werden. Das Blut fließt anschließend in die Zentralvene und weiter in die Lebervene (Tortora und Derrickson, 2006).

Die Leber spielt eine zentrale Rolle in zahlreichen Stoffwechselprozessen, wobei sie vor allem im Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel bedeutsam ist. Der Kohlenhydratstoffwechsel beinhaltet den Umbau von Triglyceriden und Proteinen zu Glucose (Gluconeogenese), die Speicherung von Glucose in Form von Glykogen (Glykogenese) und den Abbau von Glykogen zu Glucose (Glykogenolyse) zur Aufrechterhaltung des Blutglucosespiegels. Zum Lipidstoffwechsel zählen die Lipogenese (Triglycerid-Synthese), Triglycerid-Speicherung und Lipolyse (Triglycerid-Abbau zu Fettsäuren) sowie die Synthese von Lipoproteinen, Ketonkörpern und Cholesterin, aus dem wiederum Gallensäuren gebildet werden. Der Proteinstoffwechsel umfasst die Desaminierung von Aminosäuren, den Abbau des daraus entstehenden Ammoniaks zu Harnstoff sowie die Synthese der Plasmaproteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulin, Albumin, Prothrombin und Fibrinogen. Weitere wichtige Funktionen der Leber bestehen in der Gallensekretion sowie dem Abbau und der Entgiftung von Arzneistoffen, Hormonen, Erythrozyten und Bilirubin. Weiterhin ist sie an der Synthese und Speicherung einiger Vitamine sowie der Immunabwehr mittels der Kupffer-Zellen beteiligt (Tortora und Derrickson, 2006).

### 1.8.1 Die Fettleber (*Steatosis hepatis*)

Eine der häufigsten chronischen Erkrankungen der Leber ist die Fettleber (lateinisch: *Steatosis hepatis*). Hierbei kommt es in den Hepatozyten zu einer übermäßigen ektopischen Akkumulation von Lipiden, vorwiegend Triglyceriden. Die größten Risikofaktoren der *Steatosis hepatis* sind Fettleibigkeit (Adipositas), Fettstoffwechselstörungen, Typ-2-Diabetes und Bluthochdruck, weshalb sie vor allem in der westlichen Gesellschaft mit etwa 20 – 30 % eine wachsende klinische Relevanz besitzt (Ibrahim *et al.*, 2013; Neuschwander-Tetri, 2017). Auch wenn die Pathogenese der *Steatosis hepatis* noch nicht vollständig geklärt ist, spielen wahrscheinlich eine verringerte hepatische  $\beta$ -Oxidation, eine gesteigerte Lipogenese, eine erhöhte Zufuhr von freien Fettsäuren durch Lipolyse im Fettgewebe sowie mitochondriale Fehlfunktionen eine bedeutende Rolle (Postic und Girard, 2008; Pessayre, 2007).

Die *Steatosis hepatis* wird in zwei Kategorien unterteilt, die alkoholische Fettleber (AFLD, *alcoholic fatty liver disease*) und die nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD, *nonalcoholic fatty liver disease*). Die NAFLD kann ein breites Spektrum an hepatischen Läsionen aufweisen. Diese umfassen neben der Akkumulation von Triglyceriden in Hepatozyten (*Steatosis hepatis*) auch die mit einer Inflammation einhergehende nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) sowie schließlich die Leberfibrose und Leberzirrhose (Coppola *et al.*, 2014). Obwohl der genaue Mechanismus der Entstehung der NASH nicht bekannt ist stellt die „two-hit“ Hypothese eine plausible Erklärung dar. Demnach kommt es zuerst aufgrund einer Insulinresistenz, welche durch Übergewicht bzw. damit assoziiertem Typ-2-Diabetes hervorgerufen wird, zur Ausbildung der *Steatosis hepatis*. In einem zweiten Schritt kann sich dann durch eine Kombination aus oxidativem Stress, Lipidperoxidation und freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren eine NASH entwickeln (McCullough, 2006).

Da es derzeit keine zugelassenen Medikamente gibt, basiert die Behandlung der NAFLD in erster Linie auf einer Gewichtsreduktion. Als mögliche pharmakologische Therapeutika werden jedoch Insulin-Sensitizer, Antioxidantien und antiinflammatorische Wirkstoffe erforscht (Ibrahim *et al.*, 2013).

## 1.9 Wirkungen von Schilddrüsenhormonen auf die Leber

### 1.9.1 Wirkungen von $T_3$ auf die Leber

In der Leber sind die TH maßgeblich an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt. Hier beeinflussen sie die Expression zahlreicher Gene, wobei dies meist über den kanonischen TR-vermittelten Signalweg durch Bindung an die TREs der Zielgene erfolgt. Dazu zählen insbesondere Gene, die für Proteine der Lipogenese und Fettsäureoxidation kodieren, wie beispielsweise die Fettsäure-Synthase (FAS), das *thyroid hormone-inducible hepatic protein* (THRSP), die Acyl-CoA-Synthetase 5 (ACSL5), das Malatenzym (ME1), die Glucose-6-

phosphat-Dehydrogenase (G6PD), das *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c, *SREBF1*), Fettsäure-bindende Proteine (FABPs), die Lipoproteinlipase (LPL) und die Carnitin-Palmityltransferase 1 $\alpha$  (CPT-1 $\alpha$ ) (Flores-Morales *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2006; Mynatt *et al.*, 1994). Außerdem wurde gezeigt, dass SIRT1 an der Regulation der Fettsäureoxidation durch T<sub>3</sub> beteiligt ist, da sie direkt mit TR $\beta$ 1 interagieren und so PPAR $\alpha$  und den *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$*  (PGC-1 $\alpha$ ) aktivieren kann, wodurch die Expression entsprechender Gene initiiert wird (Thakran *et al.*, 2013). Weiterhin steigert T<sub>3</sub> die Synthese von Cholesterin durch erhöhte Genexpression der HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, HMGCR), stimuliert die Cholesterin-Aufnahme durch Induktion der Genexpression des LDL-Rezeptors (*low density lipoprotein receptor*, LDLR) und begünstigt den Abbau von Cholesterin zu Gallensäuren durch gesteigerte Genexpression der Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) (Ness *et al.*, 1990).

Diese positiven Effekte von T<sub>3</sub> auf den Lipidstoffwechsel legen ein therapeutisches Potenzial zur Behandlung der *Steatosis hepatis* nahe. In einem Rattenmodell konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass T<sub>3</sub> der Ausbildung einer *Steatosis hepatis* entgegenwirkt und eine ausgeprägte *Steatosis hepatis* durch T<sub>3</sub>-Gabe vollständig zurückgebildet werden kann. Damit assoziiert waren eine Reduktion der hepatischen Triglycerid-Konzentration, Lipidperoxidation und Proteinmenge von Cyclooxygenase-2 (COX2) sowie eine verringerte Aktivierung der JNK- (c-Jun N-terminale Kinase) und STAT3- (*signal transducer and activator of transcription 3*) Signalwege, welche üblicherweise während inflammatorischer Prozesse aktiviert werden (Perra *et al.*, 2008). Jedoch ruft eine hohe Konzentration an TH auch unerwünschte thyreotoxische Nebenwirkungen insbesondere auf Herz (Tachykardie), Knochen und HPT-Achse hervor, weshalb T<sub>3</sub> nicht als anti-steatotisches Agens eingesetzt werden sollte. Daher werden Schilddrüsenhormon-Analoga, auch Thyreomimetika genannt, als Alternativen mit Schilddrüsenhormon-ähnlichen Effekten, aber ohne schädliche Nebenwirkungen, intensiv erforscht. Diese können selektive Effekte auf die Leber haben, indem sie spezifisch an TR $\beta$  und nicht an TR $\alpha$ , welcher im Herzen vorkommt, binden. Auch physiologische TH-Metabolite wie 3,5-T<sub>2</sub> werden als potenzielle anti-hyperlipidämische Wirkstoffe diskutiert (Moreno *et al.*, 2008).

### 1.9.2 Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Leber

Während der letzten Jahrzehnte wurde 3,5-T<sub>2</sub> in zahlreichen Interventions-Studien in Nagern als ein metabolisch aktives TH-Metabolit beschrieben, weshalb es als Therapeutikum gegen Adipositas und die damit assoziierten Begleiterkrankungen diskutiert wird (Coppola *et al.*, 2014). Daher sollen seine Effekte insbesondere auf den Lebermetabolismus im Folgenden im Detail erläutert werden.

Bereits vor 30 Jahren wurde für aus hypothyreoten Ratten isolierten und mit 1 pM 3,5-T<sub>2</sub> behandelten Lebern eine schnelle Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs demonstriert (Horst *et al.*, 1989). Weiterhin wurde die Stimulation der mitochondrialen Respiration durch 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung der Cytochrom-c-Oxidase (COX) nachgewiesen (Lanni *et al.*, 1992, 1993; Lanni *et al.*, 1994). Zudem konnte die Va Untereinheit der COX als eine 3,5-T<sub>2</sub>-spezifische Bindungsstelle identifiziert werden, wodurch die allosterische Inhibition der Atmung durch ATP aufgehoben und die oxidative Phosphorylierung ineffektiver wird (Goglia *et al.*, 1994; Arnold *et al.*, 1998). In hypothyreoten Ratten die mit unterschiedlichen Dosen 3,5-T<sub>2</sub> behandelt wurden, konnte der Grundumsatz dosisabhängig gesteigert werden (Lanni *et al.*, 1996; Moreno *et al.*, 1997). Für Hochfett-diät (HFD) gefütterte Ratten konnte eine parallele Gabe von 0,25 µg/g Körpergewicht 3,5-T<sub>2</sub> über 4 Wochen die Zunahme an Körpergewicht und die hepatische Fettakkumulation verhindern, die Körperfettmasse verringern, die Fettsäureoxidation steigern sowie die Triglycerid- und Cholesterol-Spiegel im Serum reduzieren (Lanni *et al.*, 2005; Mollica *et al.*, 2009; de Lange *et al.*, 2011; Grasselli *et al.*, 2012). Zudem wurde durch 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung die Entstehung einer HFD-induzierten Insulinresistenz vermieden (de Lange *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2011). Dieser Effekt wird durch die direkte 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung der Deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) hervorgerufen, da SIRT1 nachfolgend PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator 1α*) und SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*) deacetyliert. Gleichzeitig werden Gene der mitochondrialen Biogenese und PPARα/δ-abhängige Gene induziert sowie Gene der Lipogenese und Gluconeogenese inhibiert (de Lange *et al.*, 2011). Die Aktivität der im Glucosemetabolismus zentralen Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Malatenzym (ME1) konnte ebenfalls durch 3,5-T<sub>2</sub> gesteigert werden (Lombardi *et al.*, 2000). In Bezug auf die Stimulation der Fettsäureoxidation durch 3,5-T<sub>2</sub> konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivität des Carnitin-Palmityltransferase (CPT)-Systems als auch die Expression von *Cpt1a* und *Cpt2* induziert ist, wodurch der Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien erhöht wird (Lanni *et al.*, 2005; Mollica *et al.*, 2009; de Lange *et al.*, 2011). In den hepatischen Mitochondrien wird durch 3,5-T<sub>2</sub> außerdem der Sauerstoffverbrauch gesteigert, die mitochondriale Entkopplung stimuliert und oxidativer Stress reduziert (Lanni *et al.*, 2005; Mollica *et al.*, 2009). Weiterhin konnten HFD-induzierte Lipidperoxidation sowie Steigerung des Wasserstoffperoxid-Metabolismus durch die parallele 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung verhindert werden, was eine Reduktion von oxidativem Stress impliziert (Grasselli *et al.*, 2008).

Neben diesen Studien im Tiermodell wurden auch *in vitro*-Studien durchgeführt, um zu untersuchen, ob die 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelten anti-steatotischen Effekte auf einer direkten hepatischen Wirkung oder auf sekundären Effekten beruhen. Dafür wurden Hepatozyten, die keine funktionsfähigen TRs exprimieren, zunächst mit Fettsäuren beladen, um eine *Steatosis*

*hepatitis* zu simulieren, und anschließend mit 3,5-T<sub>2</sub> behandelt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass 3,5-T<sub>2</sub> direkt und TR-unabhängig den Lipidgehalt in Hepatozyten senken kann (Grasselli *et al.*, 2011). In einer humanen Studie mit 2 Probanden führte die chronische 3,5-T<sub>2</sub> Applikation ähnlich wie im Tiermodell zu einem erhöhten Grundumsatz und einem verringerten Körpergewicht, wobei keine Veränderungen der TH- und TSH-Spiegel im Plasma oder kardiale Nebeneffekte beobachtet wurden (Antonelli *et al.*, 2011).

In den bisher zitierten Tierstudien konnte keine thyreomimetische Beeinflussung der T<sub>3</sub>-, T<sub>4</sub>- und TSH-Serumkonzentrationen oder der HPT-Achse durch 3,5-T<sub>2</sub> nachgewiesen werden (Lanni *et al.*, 2005; Mollica *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2011). Aufgrund dieser fehlenden thyreotoxischen Nebenwirkungen und der offensichtlichen anti-steatotischen, anti-lipidemischen und kalorigenen Effekte, wird 3,5-T<sub>2</sub> als ein potenzielles Mittel gegen Übergewicht, NAFDL und Typ-2-Diabetes diskutiert (Goglia, 2014; Coppola *et al.*, 2014; Coppola *et al.*, 2016).

Jedoch gibt es vor allem in neueren Studien vermehrt Hinweise auf selektive thyreomimetische Effekte, die das therapeutische Potenzial von 3,5-T<sub>2</sub> in Frage stellen. Dabei wurde beispielsweise eine 3,5-T<sub>2</sub>-dosisabhängige Abnahme der T<sub>3</sub>-, T<sub>4</sub>- und TSH-Serumkonzentrationen demonstriert (Goldberg *et al.*, 2012; Padron *et al.*, 2014; Jonas *et al.*, 2015). Die Beeinflussung der HPT-Achse zeigte sich auch in der reprimierten Expression TH-abhängiger Gene in der Hypophyse (Baur *et al.*, 1997; Jonas *et al.*, 2015). Zudem war die Dio1-Aktivität in der Leber erhöht, was auf einen verstärkten hepatischen Metabolismus aktiver TH und somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus hindeutet (Baur *et al.*, 1997; Padron *et al.*, 2014; Jonas *et al.*, 2015). Von besonderer Bedeutung war auch die Demonstration eines erhöhten Herzgewichts, welche kardiale Nebeneffekte aufzeigte (Goldberg *et al.*, 2012; Jonas *et al.*, 2015). Interessanterweise haben Jonas *et al.* (2015) zudem gezeigt, dass eine Gewichtszunahme in HFD-gefütterten Mäusen nicht durch parallele 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung verhindert werden konnte, da es zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme kam. Jedoch kam es auch zu einer gleichzeitigen vorteilhaften Verschiebung des Anteils von Körperfettmasse zu Magermasse. Weiterhin wurde in einer Studie mit Ratten die 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Prophylaxe einer *Steatosis hepatis* und Insulinresistenz angezweifelt (Vatner *et al.*, 2015).

## 1.10 Zielstellungen dieser Arbeit

Die klassischen TH T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen. Für den TH-Metaboliten 3-T<sub>1</sub>AM konnten ebenfalls metabolische Effekte nachgewiesen werden, welche denen der klassischen TH teilweise entgegengesetzt sind. Zudem konnte eine negative Interferenz von 3-T<sub>1</sub>AM mit der HPT-Achse gezeigt werden, wobei der Metabolit möglicherweise eine direkte Wirkung auf die Schilddrüse ausübt. Im

Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Wirkung von 3-T<sub>1</sub>AM auf die Schilddrüse mithilfe eines *in vitro*-Modells untersucht werden. Dazu wurden Transkriptomanalysen von 3-T<sub>1</sub>AM-behandelten Thyreozyten durchgeführt.

In der Leber vermitteln TH einen positiven Einfluss auf den Energiestoffwechsel und insbesondere Lipolyse und oxidative Phosphorylierung, was ein therapeutisches Potenzial zur Behandlung von Adipositas und *Steatosis hepatis* nahelegt. Auch der TH-Metabolit 3,5-T<sub>2</sub> wird als potenzielles Therapeutikum diskutiert, da er thyreomimetische Effekte besitzt und bislang keine unerwünschten thyreotoxischen Nebenwirkungen, wie sie die klassischen TH typischerweise hervorrufen, beschrieben wurden. Dies motivierte bereits in einer vorangegangenen Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) die Analyse der Effekte von 3,5-T<sub>2</sub> auf die hepatischen Transkriptome von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät. Diese Transkriptomanalysen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erweitert und durch zusätzliche Proteomanalysen ergänzt werden, um einen komplementären Datensatz zu erhalten.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden die Effekte einer aus dem Gleichgewicht geratenen TH-Homöostase untersucht, durch die es zum Auftreten der Erkrankungen Hypo- und Hyperthyreose kommt. Hierzu wurden im Vorfeld in einer Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) bereits die Transkriptome der Lebern von Mäusen mit induzierter Hypo- und Hyperthyreose analysiert. Zur Ergänzung dieser Daten wurden in dieser Arbeit komplementäre Proteomanalysen derselben Proben durchgeführt.

Das Ziel sämtlicher Analysen dieser Arbeit bestand darin, Effekte von 3-T<sub>1</sub>AM und 3,5-T<sub>2</sub> sowie einer Hypo- und Hyperthyreose auf das murine thyreoidale Transkriptom bzw. hepatische Transkriptom und Proteom zu charakterisieren bzw. zu validieren. Dabei sollten vor allem die abgeleiteten Wirkungsweisen und involvierten *Pathways* auf Transkript- und Proteinebene näher charakterisiert werden. Um diese Ziele zu erreichen wurden globale Microarray-basierte Transkriptom- sowie Massenspektrometrie-basierte Proteomanalysen durchgeführt.

## 2 Material

### 2.1 Biologische Materialien

**Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Mausstämme**

Mausstamm	Geschlecht	Referenz
C57BL/6J	männlich	Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE) Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA)
C57BL/6NTac	männlich	Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen, Universitätsklinikum Essen (Taconic Europe A/S, Dänemark)

**Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung	Referenz
PCCL3	<i>Rattus norvegicus</i>	Institut für Experimentelle Endokrinologie, Charité Universitätsmedizin Berlin

### 2.2 Laborgeräte und Hilfsmittel

**Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte und Hilfsmittel**

Laborgerät/Hilfsmittel	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Acclaim™ PepMap 100-C18 (2 cm x 75 µm, 3 µm, 100 Å), Vorsäule	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Accucore 150-C18 (25 cm x 75 µm, 2,6 µm, 150 Å), Analytische Säule	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adventurer Pro AV 264C Feinwaage	OHAUS Corporation, Parsippany, USA
Blotter Milliblot Graphit Electroblotter II	Merck Millipore, Billerica, USA
Bunsenbrenner	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg

Concentrator Plus (SpeedVac)	Eppendorf AG, Hamburg
Criterion™ Cell Laufkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>GeneChip® Fluidics Station 450</i>	Affymetrix, Santa Clara, USA
<i>GeneChip® Hybridization Oven 640</i>	Affymetrix, Santa Clara, USA
<i>GeneChip® Scanner 3000</i>	Affymetrix, Santa Clara, USA
Heraeus Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hubpipetten	GILSON, Middleton, USA
Hubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Hubpipetten	VWR International GmbH, Darmstadt
Kugeln aus Wolframcarbid (Ø ca. 7 mm)	Sartorius AG, Göttingen
MagnaRack™ Magnetic Separation Rack	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikro-Dismembrator S	Sartorius AG, Göttingen
Mörser und Stößel	Haldenwanger, Waldkraiburg
Nano Drop 8000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nanospray Flex™ Ionenquelle	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Odyssey CLx	LI-COR Biosciences-GmbH, Lincoln, USA
Orbitalschüttler GFL 3005	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
<i>Powerpac 200 Power Supply</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PTFE-Gefäße (5 ml)	Sartorius AG, Göttingen
Q Exactive™ Plus Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spatel / Mikro-Löffelspatel	VWR International GmbH, Darmstadt
T1 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Thermoblock QBT 2	Grant Instruments, Shepreth, GB
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
UltiMate 3000 RSLC System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
UltraRocker™ Rocking Platform	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultrospec 2100 pro Photometer	GE Healthcare Europe GmbH, München
Vortex Schüttler, VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Western Blot Inkubationsboxen	LI-COR Biosciences-GmbH, Lincoln, USA
Zentrifuge Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Micro Star 17	VWR International GmbH, Darmstadt
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg

---

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting Papier	VWR International GmbH, Darmstadt
Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
<i>GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array</i>	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array</i>	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immobilon-FL PVDF Membran	Merck Millipore, Billerica, USA
Microvials 1,5ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Midi-Gel Adapter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Midi Protein Gele	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (für MS)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (für MS)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (RNase-frei)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (RNase-frei)	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal Microcentrifuge Tubes	Sorenson Bioscience Inc., USA
Schraubflaschen	Schott Instruments GmbH, Mainz
ZipTip®-Spitzen, µC-18 P10	Merck Millipore, Billerica, USA

## 2.4 Chemikalien

**Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, NL
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Deutschland
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories, München
Chloroform	Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie-Brilliant-Blau G250	Merck Millipore, Billerica, USA
Dithiothreitol	Amersham Biosciences AB, Uppsala, SE

Essigsäure für MS	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>HPLC-grade</i> Wasser	J.T. Baker, Deventer, NL
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Isopropanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Li-Cor Protein Loading Buffer (4x)	LI-COR Biosciences-GmbH, Lincoln, USA
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Ambion, Life Technologies, Carlsbad, USA
NuPAGE™ Antioxidant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Odyssey® Blocking Buffer (TBS)</i>	LI-COR Biosciences-GmbH, Lincoln, USA
ortho-Phosphorsäure (85 %)	Merck Millipore, Billerica, USA
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RBS Neutral T	Roth GmbH, Karlsruhe
RNaseZap® RNase Decontamination Solution	Ambion, Life Technologies, Carlsbad, USA
Salzsäure (32 %)	Roth GmbH, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth GmbH, Karlsruhe
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tris	Roth GmbH, Karlsruhe
TRIzol® Reagent	Ambion, Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland

---

## 2.5 Enzyme und Antikörper

**Tabelle 2.6: In dieser Arbeit verwendete Enzyme**

<b>Enzym/Antikörper</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Seq. Grade Modified</i> Trypsin	<i>Sus scrofa</i>	Promega Corporation, Madison, USA
Anti-Cyp7a1 primärer Antikörper	Kaninchen	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
β-Aktin primärer Antikörper	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

---

<i>IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG sekundärer Antikörper</i>	Ziege	LI-COR Biosciences-GmbH, Lincoln, USA
--	-------	---------------------------------------

## 2.6 Kits

**Tabelle 2.7: In dieser Arbeit verwendete Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit</i>	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>GeneChip® WT PLUS Reagent Kit</i>	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>RNA Clean-Up and Concentration Micro Kit</i>	Norgen Biotek Corp., Thorold, CA
<i>RNase-Free DNase Set</i>	QIAGEN GmbH, Hilden

## 2.7 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2.8: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Protein-Präparation**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
0,3 M Guanidinhydrochlorid	14,3 g ad 500 ml	Guanidinhydrochlorid 95 % Ethanol
1x Urea-Thiourea (UT)-Puffer	1,92 g (8 M) 0,61 g (2 M) ad 4 ml	Harnstoff Thioharnstoff A. bidest.

**Tabelle 2.9: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für den Trypsinverdau mit vorangehendem Reduzieren und Alkylieren**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
20 mM Ammoniumbicarbonat (ABC)	20 mg 12,5 ml	ABC <i>HPLC-grade</i> Wasser
25 mM Dithiothreitol (DTT)	3,8 mg 1 ml	DTT 20 mM ABC
100 mM Iodacetamid (IAA)	18 mg 1 ml	IAA 20 mM ABC
Trypsinlösung (10 ng/µl)	10 mg	Trypsin

Material

	1 ml	20 mM ABC
5 % Essigsäure	5 ml	Essigsäure
	95 ml	HPLC-grade Wasser

**Tabelle 2.10: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Entsalzung von Peptidlösungen an C18-Material**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
80 % Acetonitril (ACN)	1200 µl	100 % ACN
(in 1 % Essigsäure)	300 µl	5 % Essigsäure
50 % ACN (in 1 % Essigsäure)	750 µl	100 % ACN
	300 µl	5 % Essigsäure
	450 µl	HPLC-grade Wasser
30 % ACN (in 1 % Essigsäure)	450 µl	100 % ACN
	300 µl	5 % Essigsäure
	750 µl	HPLC-grade Wasser
1 % Essigsäure	300 µl	5 % Essigsäure
	1200 µl	HPLC-grade Wasser
Puffer A (2 % ACN; 0,1 % Essigsäure)	3,84 ml	HPLC-grade Wasser
	80 µl	100 % ACN
	80 µl	5 % Essigsäure

**Tabelle 2.11: In dieser Arbeit verwendete Puffer für die LC-MS/MS**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Puffer A	0,1 % Essigsäure in HPLC-grade Wasser
Puffer B	0,1 % Essigsäure in ACN

**Tabelle 2.12: In dieser Arbeit verwendete Puffer für die 1D-SDS-PAGE**

Puffer	Zusammensetzung	
Li-Cor Probenpuffer (4x)	270 µl	4x Li-Cor Protein Loading Buffer
	30 µl	β-Mercaptoethanol
1x NuPAGE™ MES SDS Laufpuffer	50 ml	20x NuPAGE™ MES SDS Running Buffer

	ad 1l	A. bidest.
Laufpuffer für Adapter	175 ml	1x NuPAGE™ MES SDS Laufpuffer
	435 µl	NuPAGE™ Antioxidant

**Tabelle 2.13: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>		<b>Endkonzentration</b>
10x TBS	60,57 g	Tris	0,5 M
	87,66 g	NaCl	1,5 M
	ad 1 l	A. bidest. pH 7,6	
1x TBS-T	100 ml	10x TBS	10 %
	1 ml	Tween-20	0,1 %
	ad 1 l	A. bidest.	
10x Transferpuffer	30,3 g	Tris	250 mM
	144,1 g	Glycin	1,9 M
	ad 1 l	A. bidest. pH 8,5	
1x Transferpuffer	200 ml	10x Transferpuffer	10 %
	400 ml	Methanol	20 %
	5 ml	SDS (20 %)	
	ad 2 l	A. bidest.	
Primäre Antikörperlösung	20 µl	Tween-20	0,2 %
	5 µl	Primärer Antikörper	1:2000
	ad 10 ml	Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	
Sekundäre Antikörperlösung	20 µl	Tween-20	0,2 %
	5 µl	SDS (20 %)	0,01 %
	1 µl	Sekundärer Antikörper	1:10.000
	ad 10 ml	Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	

**Tabelle 2.14: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Coomassie-Färbung**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
CBB-Stock	5 g	Coomassie-Brilliant-Blau G-250
	ad 100 ml	A. bidest.

## Material

---

CDD-Stock	50 g	Ammoniumsulfat
	6 ml	Phosphorsäure (85 %)
	10 ml	CBB-Stock
	ad 500 ml	A. bidest.
CSS-Färbelösung	200 ml	CDD-Stock
	50 ml	Methanol

---

## 2.8 Software und Datenbanken

**Tabelle 2.15: In dieser Arbeit verwendete Software und Datenbanken**

<b>Software/Internetangebot</b>	<b>Hersteller</b>
<i>2100 Expert Software</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>Affymetrix® Expression Console™ Software</i>	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>GeneChip® Command Console® Software</i>	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>GeneData Analyst 10.0.3</i>	Genedata AG, Basel, Schweiz
<i>GeneData Refiner MS 10.0.3</i>	Genedata AG, Basel, Schweiz
<i>GraphPad Prism 5</i>	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
<i>Image Studio™ 5.2 Software</i>	LI-COR Biosciences-GmbH, Lincoln, USA
<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>MaxQuant 1.6.0.16</i>	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
<i>Microsoft Office 2016</i>	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<i>NanoDrop 8000 Software 2.2.1</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Rosetta Resolver® 7.2</i>	Rosetta Biosoftware
<i>Sorcerer</i>	Sage-N Research, Milpitas, CA, USA
<i>Swift II</i>	GE Healthcare Europe GmbH, München
<i>Xcalibur 2.1</i>	Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA

---

## 3 Methoden

### 3.1 Arbeiten mit biologischem Material

#### 3.1.1 Tierhaltung und –behandlung

##### 3.1.1.1 Mausstamm C57BL/6J zur Analyse der 3,5-T<sub>2</sub>-Effekte

Die Haltung der C57BL/6J Mäuse und die Tierexperimente zur Analyse der Wirkung von 3,5-T<sub>2</sub> erfolgten am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIfE) durch Dr. Wenke Jonas unter Einhaltung der geltenden Versuchstierrichtlinien.

Die C57BL/6J Mäuse wurden unter Standardbedingungen bei 22 °C und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und erhielten Standardfutter (ssniff, Soest) sowie Wasser *ad libitum*. Die männlichen Mäuse wurden nach der Trennung von der Mutter (Absetzen) entsprechend der Versuchsbedingungen in verschiedene Gruppen eingeteilt. Dabei erhielten sie *ad libitum* entweder eine Standarddiät (SD, 10 kcal % Fett, D12450B, Research Diets Inc, New Brunswick, USA) oder eine Hochfettdiät (HFD, 60 kcal % Fett, D12492, Research Diets Inc, New Brunswick, USA). Im Alter von 20 Wochen wurden die Mäuse in Behandlungs- und Diätgruppen separiert, nachdem durch die HFD eine Diät-induzierte Adipositas (DIO) induziert wurde, während die Mäuse unter SD normalgewichtig blieben. Von den insgesamt vier experimentellen Gruppen zu jeweils 6 – 8 Tieren wurde jeweils einer Gruppe der normalgewichtigen (SD) sowie der adipösen (HFD) Mäuse über einen Zeitraum von 28 Tagen täglich i. p. 2,5 µg/g Körpergewicht 3,5-T<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) injiziert. Die anderen beiden Gruppen dienten als Kontrollgruppen der jeweiligen Diät und erhielten täglich i. p. Injektionen physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Die in diesem Versuch eingesetzte Dosis 3,5-T<sub>2</sub> wurde anhand eines Vorversuchs ermittelt. Während der Behandlungsdauer wurden Körpergewicht sowie Futteraufnahme der Tiere überwacht.

Nach abgeschlossener Behandlung wurde das Lebergewebe am DIfE entnommen, unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte in der Abteilung für Funktionelle Genomforschung der Universitätsmedizin Greifswald im Rahmen dieser Doktorarbeit.

##### 3.1.1.2 Mausstamm C57BL/6NTac zur Analyse der Hypo- und Hyperthyreose-Effekte

Die Haltung der C57BL/6NTac Mäuse und die Tierexperimente zur Analyse des Effekts einer Hypo- und Hyperthyreose erfolgten am Universitätsklinikum Essen unter Leitung der Klinik für

Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen unter Einhaltung der geltenden Versuchstierrichtlinien.

Die C57BL/6NTac Mäuse wurden unter Standardbedingungen bei  $23 \pm 1$  °C in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten, wobei ihnen Standardfutter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt wurden. Im Alter von fünf Monaten wurden männliche Mäuse willkürlich den drei Behandlungsgruppen hypothyreot, hyperthyreot und euthyreot zugeordnet. Die Behandlung erfolgte in allen Gruppen über einen Zeitraum von sieben Wochen.

Die Hyperthyreose wurde durch Einstellung hoher Schilddrüsenhormon-Spiegel etabliert. Dazu wurde den Mäusen i. p. 1 µg/g Körpergewicht Levothyroxin [T<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich T2376, St. Louis, USA; Stammlösung: 2 mg/ml T<sub>4</sub> gelöst in 0,01 M NaOH, 0,1 % BSA (Sigma-Aldrich A7906, St. Louis, USA); Injektionslösung: Stammlösung 1:10 verdünnt mit PBS] injiziert. Die T<sub>4</sub>-Injektionen erfolgten während der ersten drei Wochen der Behandlung jeweils dreimal pro Woche am Montag, Mittwoch und Freitag. In den letzten vier Wochen der Behandlung wurde den Mäusen alle 48 h T<sub>4</sub> i. p. appliziert. Zur Gewährleistung einer äquivalenten Energiemenge erhielten die hyperthyreoten Tiere eine Kontroll-Iod-Diät (Harlan Teklad Co., TD.97350).

Die Hypothyreose wurde durch Suppression der endogenen Schilddrüsenhormon-Produktion induziert. Dies wurde durch Gabe einer Niedrig-Iod-Diät (LoI; Harlan Teklad Co., TD.95007) und Zugabe von 0,02 % Methimazol (MMI; Sigma-Aldrich 310514), 0,5 % Perchlorat (ClO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich 301507) und 0,3 % Saccharin als Süßungsmittel (Sigma-Aldrich 240931) zum Trinkwasser erzielt (LoI/MMI/ClO<sub>4</sub>). Während der Behandlungsdauer erhielten die hypothyreoten Mäuse äquivalent zu den Zeitintervallen der hyperthyreoten Gruppe i. p. Injektionen mit 150 µl PBS.

Die euthyreote Gruppe erhielt zur Kontrolle i. p. Injektionen von 150 µl PBS äquivalent zu den Zeitintervallen der anderen beiden Gruppen. Außerdem wurde den euthyreoten Mäusen zur Gewährleistung einer äquivalenten Energiemenge eine Kontroll-Iod-Diät (Harlan Teklad Co.; TD.97350) verabreicht.

### 3.1.2 Kultivierung von PCCL3-Zellen

Bei PCCL3 handelt es sich um eine nichttransformierte ausdifferenzierte Zelllinie von Follikel epithelzellen der Ratte (Fusco *et al.*, 1987), die in dieser Arbeit als *in vitro*-Modell für Thyreozyten diente. Sie wurde wie in Schanze *et al.* (2017) beschrieben in Coon's F12 Vollmedium, welches mit fetalem Kälberserum (FKS), TSH und anderen Hormonen supplementiert war, über mehrere Passagen kultiviert. Vor dem eigentlichen Experiment wurden die Zellen ohne FKS- und TSH-Zugabe kultiviert, um sie von Schilddrüsenhormonen und deren Metaboliten sowie TSH zu depletieren und ihre Reaktion auf die folgende Stimulation zu verstärken. Die Stimulation der depletierten PCCL3-Zellen erfolgte durch

Zugabe von 0,1 mU / ml TSH und 1  $\mu$ M 3-T1AM zum Medium für 3 h, wobei lediglich mit TSH stimulierte Zellen als Kontrolle dienen.

Diese Kultivierungen wurden am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité Berlin durch Dr. Nancy Schanze durchgeführt. Durch sie erfolgte ebenfalls die Präparation jener RNA-Proben aus den PCCL3-Zellen, die anschließend im Rahmen dieser Doktorarbeit für die Transkriptomanalysen eingesetzt wurden.

## 3.2 Arbeiten mit RNA

### 3.2.1 RNA-Präparation (TRIZOL®-Methode)

Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte nach einer abgewandelten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mithilfe des TRIZOL® *Reagent*, welches die parallele Isolation von RNA, DNA und Protein aus einer Probe ermöglicht. Die monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat besitzt chaotrope Eigenschaften, wodurch bei der Proben-Homogenisierung Zellen lysiert und Proteine denaturiert werden, was die Gewährleistung der RNA-Integrität durch Inaktivierung von RNasen ermöglicht.

Zunächst wurden die gefrorenen murinen Leberproben in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser mit einem Stößel zerkleinert. Eine kleine Menge Gewebe wurde dann in ein mit Stickstoff gefülltes Teflon-Gefäß überführt und mit 500  $\mu$ l Trizol® *Reagent* versetzt. Nach der anschließenden Homogenisierung im Mikro-Dismembrator S für 2 min bei 2.600 rpm, wurden weitere 500  $\mu$ l Trizol® *Reagent* zur pulverisierten Probe gegeben. Die gefrorene Probe wurde mit Hilfe eines Spatels in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Prozessierung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Proben wurden dazu bei RT aufgetaut und für 5 min bei 20 °C inkubiert, bevor sie zwecks Sedimentierung von Zelltrümmern 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Nach dem Überführen des Überstands in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß wurde dieser mit 200  $\mu$ l Chloroform versetzt. Dann wurden die Proben für 15 s geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Die Phasen-Separation erfolgte anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4 °C. Die entstandenen drei Phasen gliedern sich in eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, eine Interphase, in der die DNA angereichert ist, und eine untere organische Phase, in welcher die denaturierten Proteine enthalten sind. Nun wurde die obere wässrige Phase in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und mit 500  $\mu$ l eiskaltem Isopropanol versetzt. Nach Invertieren des Gemisches erfolgte die Präzipitation der RNA ÜN bei -20 °C. Zur darauffolgenden Pelletierung wurden die Proben 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem 75 %igem Ethanol gewaschen. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 7.500 g und 4 °C, bevor der Überstand abgenommen und der Wasch- sowie der Zentrifugationsschritt noch einmal wiederholt wurden. Die restliche Flüssigkeit wurde komplett abgenommen und

das Pellet für 5 – 10 min neben der Flamme eines Bunsenbrenners getrocknet. Abschließend wurde die RNA für 3 h auf Eis und 30 min bei RT in einem der Pelletgröße entsprechenden Volumen Nuklease-freiem Wasser gelöst.

### 3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop-8000 Spektralphotometers bestimmt. Die Methode beruht auf der Messung der Absorption von Biomolekülen in wässriger Lösung bei unterschiedlichen Wellenlängen. Da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, ermöglicht der gemessene  $A_{260}$ -Wert die Berechnung der Konzentration der Probe in ng/ $\mu$ l in Abhängigkeit vom Typ der Nukleinsäure (Sambrook *et al.*, 1989). Eine  $A_{260}$ -Einheit entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l, einer ssDNA (Einzelstrang (englisch: *single stranded*)-DNA)-Konzentration von 33 ng/ $\mu$ l und einer dsDNA (Doppelstrang (englisch: *double stranded*)-DNA)-Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l. Die Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  sind ein Maß für die Reinheit der Probe. Die Kontamination der Probe mit Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt wird durch das  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis angegeben, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 eine reine Nukleinsäurelösung anzeigt. Das  $A_{260}/A_{230}$ -Verhältnis beschreibt hingegen die Verunreinigung der Probe mit Phenol und anderen organischen Substanzen, die ein Absorptionsmaximum bei 230 nm besitzen. Hier liegt eine reine Nukleinsäurelösung vor, wenn das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,2 liegt. Für die Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 1,3  $\mu$ l Probe eingesetzt.

### 3.2.3 Qualitätskontrolle von RNA

Die Qualitätskontrolle von RNA-Präparationen wurde mit Hilfe des „Agilent 2100 Bioanalyzers“ sowie des „Agilent RNA 6000 Nano Kits“ und der „Total RNA Nano Chips“ durchgeführt. Die Methode beruht auf der kapillar-elektrophoretischen Auftrennung der RNA nach ihrer Molekularmasse. Dabei können die mittels eines Basen-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs markierten RNA-Moleküle in den Kanälen eines Chips durch Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert werden, wobei die Fluoreszenzintensität mit der RNA-Menge korreliert.

Zunächst wurden die Proben auf eine Konzentration von 100 ng/ $\mu$ l eingestellt und für 2 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurden sie nach Angaben des Herstellerprotokolls weiter prozessiert. Für die Analyse wurde die *2100 Expert Software* mit der Einstellung *Eukaryote Total RNA Nano* verwendet. Zur Beurteilung der RNA-Qualität berechnet die Software basierend auf dem jeweiligen Elektropherogramm einer Probe die sogenannte RIN (*RNA Integrity Number*). Bei einer RIN von 9,0 bis 10,0 handelt es sich um qualitativ hochwertige RNA, wohingegen bei einer RIN von  $\leq 7,5$  bereits von einer partiellen Degradation

ausgegangen werden muss. Daher wurden für die anschließenden Microarray-Analysen nur RNA-Proben mit einer RIN von mindestens 7,5 verwendet.

### 3.2.4 DNase-Verdau und RNA-Aufreinigung

Nach der RNA-Präparation und Qualitätskontrolle erfolgte ein DNase-Verdau mit anschließender RNA-Aufreinigung, um möglichst reine Gesamt-RNA zu erhalten. Für den DNase-Verdau wurde das *RNase-Free DNase Set* verwendet und bis zu 35 µg RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 87,5 µl eingestellt. Nach Zugabe von 10 µl RDD-Puffer und 2,5 µl DNase I erfolgte der Verdau für 10 min bei RT. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mittels des *RNA Clean-Up and Concentration Micro Kits* nach Herstellerangaben. Hierzu wurde die Probe mit *Binding Solution* und Ethanol versetzt und auf eine Säule aufgetragen. Dabei wird nur die RNA an die Separations-Matrix gebunden, während Verunreinigungen wie Proteine und DNA durch Waschen mit *Wash Solution* entfernt wurden. Die gereinigte Gesamt-RNA wurde abschließend mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

### 3.2.5 Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalysen wurden entweder *GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST (Sense Target) Arrays* oder *GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Arrays* eingesetzt. Dabei wurden die gereinigten Gesamt-RNA-Proben mittels des *GeneChip® WT PLUS Reagent Kit* nach Herstellerangaben prozessiert (Abbildung 3.1). Pro Probe wurden jeweils 200 ng RNA durch reverse Transkription in cDNA (englisch: *complementary DNA*) umgeschrieben, wobei Zufalls-Primer mit einer T7-Promotorsequenz verwendet wurden. In der darauffolgenden *in vitro*-Transkription unter Nutzung einer T7-RNA-Polymerase wurde die doppelsträngige cDNA als Matrize für die Antisense-RNA (aRNA)-Synthese genutzt. Die aRNA wurde anschließend mit Hilfe magnetischer *beads* aufgereinigt und ihre Konzentration mit dem NanoDrop-8000 Spektralphotometer bestimmt (siehe 3.2.2). Für die folgende reverse Transkription in einzelsträngige cDNA, die dem kodierenden Strang entsprach, wurden 15 µg aRNA eingesetzt. Hierbei wurden Zufalls-Primer und ein Gemisch aus dNTPs verwendet, wobei auch dUTPs enthalten waren. Nach der Hydrolyse der aRNA mit Hilfe von RNase H wurde die einzelsträngige cDNA mittels magnetischer *beads* aufgereinigt und ihre Konzentration bestimmt. Im Anschluss wurden 5,5 µg einzelsträngige cDNA für die Fragmentierung eingesetzt. Dabei wurde die einzelsträngige cDNA durch Zugabe einer Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und einer AP (apurinische bzw. apyrimidinische)-Endonuklease (APE 1) an den Positionen der inkorporierten Uracil-Nukleotide gespalten. Mit Hilfe des „Agilent 2100 Bioanalyzers“ wurde die Effizienz der Fragmentierung überprüft. Daraufhin fand die

Markierung der fragmentierten einzelsträngigen cDNA statt, wobei Biotin durch eine terminale Desoxyribonukleotidyltransferase an das 3'-Ende der Fragmente angefügt wurde.

Anschließend erfolgte die Hybridisierung der fragmentierten, Biotin-markierten cDNA in einem Hybridisierungs-Cocktail-Gemisch mit dem jeweiligen *GeneChip*<sup>®</sup> *Gene 1.0 ST Array* bei 45 °C für 16 h.

Danach wurden die Arrays in der *GeneChip*<sup>®</sup> *Fluidics Station 450* nach dem Standardprotokoll gewaschen und mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt. Das abschließende Scannen der Arrays wurde mit dem *GeneChip*<sup>®</sup> *Scanner 3000* durchgeführt. Die Steuerung beider Geräte erfolgte mit Hilfe der *GeneChip*<sup>®</sup> *Command Console*<sup>®</sup> *Software* (AGCC).

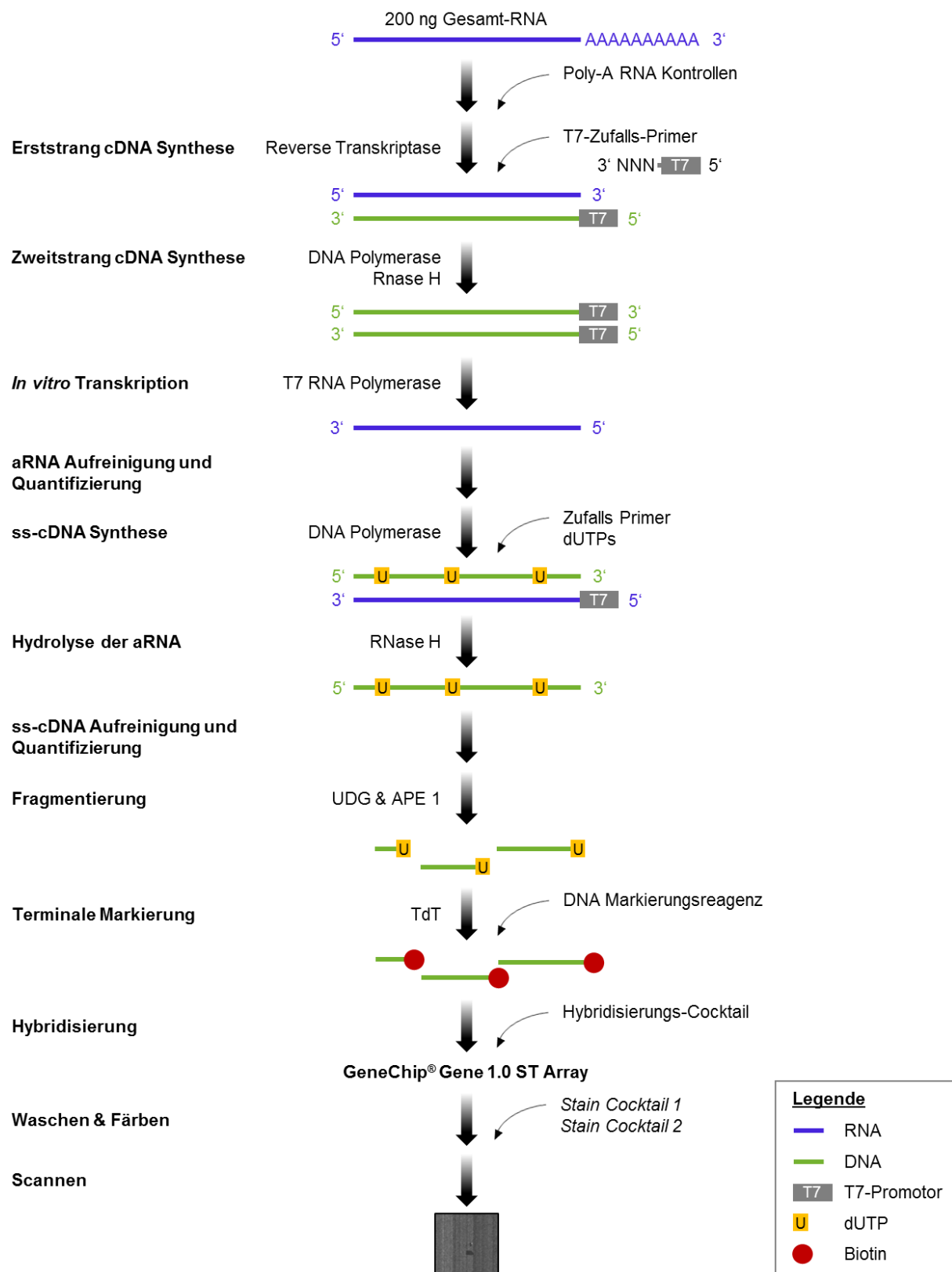


Abbildung 3.1: Ablauf der Transkriptomanalyse unter Nutzung des *GeneChip® WT PLUS Reagent Kits*. Modifiziert nach „Data Sheet - GeneChip® Gene 1.0 ST Array System for Human, Mouse and Rat“ (Affymetrix).

### 3.2.6 Auswertung der Transkriptomdaten

#### 3.2.6.1 Qualitätskontrolle mittels AGCC und *Affymetrix® Expression Console™* Software

Für die Qualitätskontrolle der Hybridisierung wurden die gescannten Array-Bilder zunächst in der AGCC visuell beurteilt. Danach wurden die \*Cel-Dateien mit den Intensitätswerten in die *Affymetrix® Expression Console™* Software importiert. Hier wurden die exogenen Markierungs- und Hybridisierungs-Kontrollen, welche den Proben zu verschiedenen Zeitpunkten des Protokolls hinzugefügt wurden, ausgewertet. Bei den Markierungs-Kontrollen handelt es sich um polyadenylierte RNA-Transkripte von *Bacillus subtilis*-Genen (*lys*, *phe*, *thr* und *dap*), welche in Eukaryoten nicht vorkommen. Durch diese *in vitro* synthetisierten exogenen Positiv-Kontrollen kann der gesamte Markierungs-Prozess überprüft werden, da sie in verschiedenen definierten Verdünnungen zu Beginn des Protokolls den Gesamt-RNA-Proben hinzugefügt werden (Tabelle 3.1). Die Poly-A-RNA-Kontrollen sollten in ihren Intensitätswerten der Reihenfolge ihrer Verdünnungsstufen entsprechen.

**Tabelle 3.1: Endverdünnungen der Poly-A-RNA-Kontrollen**

Poly-A-RNA-Kontrolle	Endverdünnung
<i>lys</i>	1:100.000
<i>phe</i>	1:50.000
<i>thr</i>	1:25.000
<i>dap</i>	1:6.667

**Tabelle 3.2: Endkonzentrationen der Hybridisierungs-Kontrollen**

Hybridisierungs-Kontrolle	Endkonzentration
<i>bioB</i>	1,5 pM
<i>bioC</i>	5 pM
<i>bioD</i>	25 pM
<i>cre</i>	100 pM

Die Array-Hybridisierungs-Effizienz konnte anhand der Hybridisierungs-Kontrollen (*bioB*, *bioC*, *bioD* und *cre*) beurteilt werden, die zum Hybridisierungs-Cocktail hinzugefügt wurden und unabhängig von der vorangegangenen Proben-Prozessierung sind. Hier sollten sich die verschiedenen definierten Konzentrationen ebenfalls in der Reihenfolge der Intensitätswerte widerspiegeln (Tabelle 3.2).

Mit Hilfe der *Affymetrix® Expression Console™* Software wurden zusätzlich alle Array-Metriken, Signal-Histogramme und relativen log-Expressions-Signale überprüft.

Alle prozessierten Arrays erfüllten die Kriterien der Qualitätskontrolle und wurden daher in die anschließende Datenauswertung einbezogen.

### 3.2.6.2 Datenauswertung mittels Rosetta Resolver-Software

Für die Datenauswertung wurden die \*Cel-Dateien zunächst in die *Rosetta Resolver 7.2*-Software importiert. Die Software bietet vorgefertigte Protokolle, mit Hilfe derer die Daten-Normalisierung und statistische Auswertung erfolgte.

Zunächst wurden die Expressionswerte gruppenabhängig unter Nutzung des Software-Moduls *Intensity Profile Builder Tool* mittels RMA (*Robust Multi-array Average*) normalisiert. Dabei wurden Hintergrund-korrigierte und auf Sequenzebene zusammengefasste Werte ausgegeben.

Im Software-Modul *Intensity Experiment Builder* wurden die Expressionswerte der einzelnen Arrays einer Gruppe durch Mittelwertbildung kombiniert, da sie biologische Replikate darstellten. Hier wurden erneut Sequenzebenen-basierte Ergebnisse und deren Varianzen ausgegeben.

Die Verhältnisse der Expressionsmittelwerte zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe des *Ratio Builder Tools* berechnet. Dabei wurde zudem ein zweiseitiger Zweistichproben-t-Test der Signal-Intensitäten durchgeführt, wodurch für jedes Verhältnis ein  $p$ -Wert berechnet wurde. In die Berechnung des  $p$ -Wertes floss außerdem die Varianz der Signal-Intensitäten der einzelnen Sonden jedes Gen-spezifischen Transkripts ein.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels eines zweiseitigen Zweistichproben-t-Tests mit nachfolgender Fehler-gewichteter (*Error-weighted*) *false discovery rate* (FDR)-basierter multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg.

Für die Detektion Gen-spezifischer Transkripte, die zwischen zwei Bedingungen signifikant unterschiedliche Mengen aufwiesen, wurden die folgenden drei Kriterien verwendet: Die  $p$ -Werte der Signal-Korrektur-Statistik des *Ratio Builder Tools* sowie des t-Tests mit Benjamini-Hochberg FDR mussten signifikant ( $p$  bzw.  $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ) sein und der *fold change*  $\geq 1,5$ -fach.

## 3.3 Arbeiten mit Proteinen

### 3.3.1 Protein-Präparation (TRIZOL®-Methode)

Die Protein-Präparation fand im Anschluss an die TRIZOL®-RNA-Präparation aus der verbliebenen organischen Phase der Probe statt (siehe 3.2.1). Zunächst wurde die restliche wässrige Phase oberhalb der Interphase abgenommen und verworfen. Danach wurden die Proben mit 300  $\mu\text{l}$  100 % Ethanol versetzt, gründlich invertiert und für 3 min bei RT inkubiert, bevor durch Zentrifugation für 5 min bei 2.000 g und 4 °C die DNA pelletiert wurde. Der

Phenol-Ethanol-Überstand wurde in zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit jeweils 750 µl Isopropanol versetzt. Nachfolgend wurden die Proteine durch Inkubation für 10 min bei RT präzipitiert. Durch das anschließende Zentrifugieren für 10 min bei 12.000 g und 4 °C wurden die Proteine pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protein-Pellet mit 1 ml Waschlösung, bestehend aus 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol (Tabelle 2.8), gewaschen. Nach einer Inkubation von 20 min bei 75 rpm und RT auf dem Wippschüttler wurden die Proben 5 min bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Waschlösung abgenommen und der Waschschrift zweimal wiederholt. Danach wurde das Protein-Pellet mit 700 µl 100 % Ethanol versetzt, mittels eines Vortex-Geräts durchmischt und erneut für 20 min bei 75 rpm und RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Dann wurden die Proben 5 min bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vollständig verworfen und das Pellet 5-10 min an der Luft getrocknet. Das Protein-Pellet wurde im Anschluss je nach Pelletgröße in einem entsprechenden Volumen UT-Puffer (Tabelle 2.8) resuspendiert. Zum vollständigen Lösen des Pellets wurden die Proben für 30 min bei 750 rpm und RT im Schüttler inkubiert. Zum Entfernen von unlöslichem Material wurden die Proben für 10 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wobei die zu Beginn aufgeteilten Proben vereinigt wurden. Die Protein-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der photometrischen Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Das Bradford-Reagenz enthält den komplexbildenden Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant Blue G-250, welcher sich in saurer Lösung an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und Proteine so unspezifisch anfärbt. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Proteine von 465 nm zu 595 nm, weshalb die gemessene Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration genutzt werden kann. Zudem kommt es zu einem Farbumschlag von rot zu blau, da die anionische Sulfonatform des Farbstoffes durch die Komplexbildung mit Proteinen stabilisiert wird.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde zunächst eine Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard-Protein erstellt (Tabelle 3.3). Dazu wurde BSA in verschiedenen Konzentrationen von 1-12 µg/µl eingesetzt und eine Probe ohne Proteine diente als Leerwert. Die Proben wurden bei 595 nm am Photometer vermessen und die Eichgerade mit Hilfe der *Swift II*-Software erstellt.

Für die eigentliche Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben zunächst in A. bidest. verdünnt und dann 10 µl dieser Verdünnung auf 800 µl mit A. bidest. aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz wurden die Proben gründlich durchmischt und bei

595 nm am Photometer gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz mit einer den Proben entsprechend gleichen Konzentration an UT-Puffer. Die Proteinkonzentration wurde abschließend als Mittelwert aus drei Replikaten pro Probe und mit Hilfe der *Swift II*-Software anhand der zuvor erstellten Eichgerade berechnet.

**Tabelle 3.3: Eichgerade für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

<b>BSA [<math>\mu</math>g]</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
BSA-Stammlösung (0,1 mg/ml) [ $\mu$ l]	0	10	20	40	60	80	100	120
A. bidest. [ $\mu$ l]	800	790	780	760	740	720	700	680
Bradford-Reagenz [ $\mu$ l]	200	200	200	200	200	200	200	200

### 3.3.3 Trypsinverdau mit vorangehendem Reduzieren und Alkylieren

Die für die LC-MS/MS-Messungen verwendeten Protein-Proben wurden zunächst mit dem Enzym Trypsin proteolytisch verdaut. Trypsin ist eine Endopeptidase, die Peptidbindungen spezifisch nach den Aminosäuren Arginin und Lysin hydrolytisch spaltet.

Von den in 1 x UT-Puffer gelösten Proben wurden je 4  $\mu$ g Protein in 20 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) (Tabelle 2.9) verdünnt und auf ein Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l eingestellt. Dies sollte eine basische, pH-optimale Umgebung für die Aktivität von Trypsin gewährleisten. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 1  $\mu$ l Dithiothreitol (DTT; Endkonzentration 2,5 mM) (Tabelle 2.9) für 1 h bei 60 °C inkubiert, wodurch die Disulfidbrücken der Proteine reduziert wurden. Anschließend wurden die Proben mit 20 mM ABC auf 18  $\mu$ l aufgefüllt, bevor sie mit 2  $\mu$ l Iodacetamid (IAA; Endkonzentration 10 mM) (Tabelle 2.9) versetzt wurden. Durch eine Inkubation für 30 min bei 37 °C im Dunkeln wurden die Proben alkyliert und somit eine Reoxidierung der Thiolgruppen der Proteine verhindert. Für die proteolytische Spaltung der Proteine wurde Trypsin im Verhältnis 1:25 (Tabelle 2.9) zu den Proben gegeben und ÜN für 16 h bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen des Verdaus erfolgte durch Zugabe 5%iger Essigsäure (Endkonzentration 1 %) (Tabelle 2.9).

### 3.3.4 Entsalzung von Peptidlösungen an C18-Material

Nach dem Trypsinverdau wurden die Peptidlösungen mit Hilfe von sogenannten ZipTip-Spitzen ( $\mu$ C-18 P10, 2  $\mu$ g Kapazität) entsalzt und gereinigt. Die Spitzen enthalten C18-Material, an welches die hydrophoben Peptide binden, während hydrophile Bestandteile der Lösung, wie z. B. bei der massenspektrometrischen Analyse störende Salze, gewaschen

werden. Die Elution der Peptide kann dann in einem für die Massenspektrometrie geeigneten Puffer erfolgen.

Zunächst wurde das C18-Material der ZipTip-Spitzen dreimal mit je 10 µl 100 % Acetonitril (ACN) und danach je fünfmal mit 10 µl 80 %, 50 % und 30 % ACN in 1 % Essigsäure (Tabelle 2.10) äquilibriert. Anschließend wurde das C18-Material zweimal mit 10 µl 1 % Essigsäure (Tabelle 2.10) gewaschen und die Peptide durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren der Peptidlösung an das Trägermaterial gebunden. Dann wurden durch fünfmaliges Waschen mit 1 % Essigsäure Verunreinigungen entfernt. Danach folgte die Elution der Peptide durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren in je 5 µl 50 % ACN und 80 % ACN in 1 % Essigsäure. In einem Microvial wurden beide Eluate vereinigt und in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac) bzw. im Gefriertrockner eingengt. Abschließend wurden die Proben mit 20 µl Puffer A (Tabelle 2.10) aufgefüllt, um eine Endkonzentration von 100 ng/µl einzustellen.

### 3.3.5 Massenspektrometrische Analyse

Die Protein-Proben wurden für die Proteomanalysen *via* Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) untersucht. Hierzu wurden die tryptisch verdauten und gereinigten Peptidlösungen zunächst mit Hilfe einer *nano-reverse-phase* Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung eines UltiMate 3000 RSLC Systems chromatografisch aufgetrennt. Die Peptidgemische wurden auf eine Acclaim PepMap 100-C18-Vorsäule (2 cm x 75 µm Säule, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) geladen, die Separation des Peptidgemisches erfolgte auf einer analytischen Accucore 150-C18-Säule (25 cm x 75 µm Säule, 2,6 µm Partikelgröße, 150 Å Porengröße). Dabei wurde ein binäres Puffersystem bestehend aus polarem Puffer A und unpolarem Puffer B (Tabelle 2.11) genutzt. Die Elution der Peptide erfolgte mittels eines linearen Gradienten (2 – 25 % ACN in 0,1 % Essigsäure) über 120 min bei einer konstanten Flussrate von 300 nl/min (Abbildung 3.2).

Die massenspektrometrischen Daten wurden in einem Daten-abhängigen Analyseverfahren (*data dependent acquisition*, DDA) an einem Q Exactive™ Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer oder einem Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer unter Verwendung der in Tabelle 3.4 aufgeführten Parameter erhoben. Die Nanospray-Ionisierung erfolgte unter Verwendung einer Nanospray Flex™ Ionenquelle.

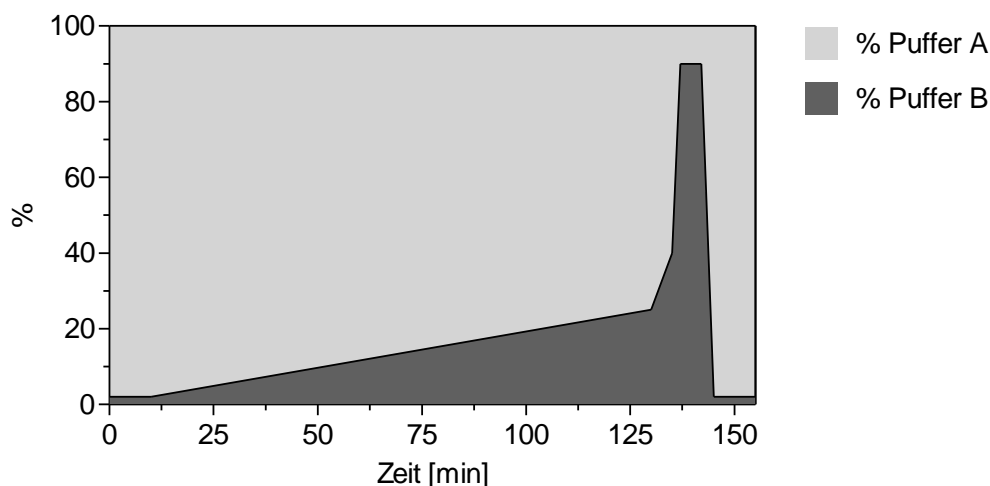


Abbildung 3.2: Gradient für die Auftrennung und Elution der Peptide am UltiMate 3000 RSLC System

Tabelle 3.4: Parameter der massenspektrometrischen Analyse

Parameter	Einstellung	
<b>MS1</b>	MS-Scan Auflösung	70.000
	Zielintensität ( <i>automatic gain control (AGC)</i> )	$3 \times 10^6$
	Maximale Injektionszeit (MS1 Scans)	120 ms
	Scan-Bereich	333 bis 1650 m/z
	Spectra-Datentyp	profile
<b>MS2</b>	Auflösung	17.500
	MS/MS Zielintensität (AGC)	$2 \times 10^5$
	Maximale Injektionszeit (MS/MS Scans)	120 ms
	Spectra-Datentyp	centroid
	Selektion für MS/MS	die 10 höchst-abundanten Isotopen-Spektren (Ladung $\geq 2$ ) aus dem Übersichtsscan
	Isolationsfenster	3 m/z
	Fixierte erste Masse	100 m/z
	Scan-Bereich	200 bis 2000 m/z
	Dissoziationsmodus	HCD ( <i>higher energy collisional dissociation</i> )
	Normalisierte Kollisionsenergie	27,5 %
	Dynamischer Ausschluss	30 s
	Ladungsausschluss	1; > 6

### 3.3.6 Auswertung der Proteomdaten

#### 3.3.6.1 Auswertung der Proteomdaten zur Analyse der 3,5-T<sub>2</sub>-Effekte

Im Anschluss an die LC-ESI-MS/MS wurden die erhaltenen Chromatogramme der Protein-Proben zunächst mittels der Xcalibur™ Software visuell überprüft. Die generierten Rohdaten wurden dann zur Proteinidentifizierung und quantitativen Analyse mit Hilfe der Software *GeneData Refiner MS 10.0.3* prozessiert. Der Ablauf der Datenauswertung beinhaltete die Reduktion des chromatographischen Rauschens, die Anpassung (*alignment*) der Retentionszeit über alle Proben, die Extraktion von qualitativen und quantitativen Signalen (*features*) sowie die Bildung von Isotopen-Clustern. Um Peptide und Proteine zu identifizieren wurden die Rohdaten durch einen im Programm eingebundenen Mascot-Algorithmus gegen eine murine UniProt/Swiss-Prot Datenbank (10/2016) gesucht. In Tabelle 3.5 sind die für die Proteinidentifikation verwendeten Parameter aufgelistet.

**Tabelle 3.5: Zur Proteinidentifikation in *GeneData Refiner MS 10.0.3* verwendete Parameter**

Parameter	Auswahl
Datenbank	UniProt/Swiss-Prot (10/2016); murin
Enzym	Trypsin
Peptidtoleranz	10 ppm
Fragmenttoleranz	0,02 Da
<i>Missed cleavages</i>	0
<i>False discovery rate</i>	≤ 1 %
Statische Modifikationen	Carbamidomethylierung von Cystein (+57,021 Da)
Variable Modifikationen	Oxidation von Methionin (+15,995 Da)
Quantifizierung	Hi3-Methode

Für die relative Quantifizierung wurden die Intensitäten von nicht-redundanten (*uniquen*) Peptiden mit der Hi3-Quantifizierung (Silva *et al.*, 2006) zu Proteinintensitäten aufsummiert. Dabei wird der Mittelwert der drei Peptide pro Protein mit der höchsten Intensität über alle Proben berechnet und dann für die weitere Analyse genutzt. Anschließend wurden die Proteinintensitäten in die Software *GeneData Analyst 10.0.3* importiert, log<sub>10</sub>-transformiert und Median-normalisiert, wobei nur Proteine ohne Fehlwerte einbezogen wurden.

Zur statistischen Analyse wurde zunächst ein Welch-Test durchgeführt. Dabei wurden nur Proteine eingeschlossen, die in mindestens drei von vier bzw. zwei von drei Tieren in beiden zu vergleichenden Gruppen identifiziert wurden. Dabei wurden Proteine, die einen *p*-Wert ≤ 0,05 und einen *fold change* ≥ |1,5| aufwiesen als statistisch signifikant verändert angesehen. Proteine, welche nur in einer der beiden zu vergleichenden Gruppen in mindestens drei Tieren

detektiert werden konnten, wurden im Welch-Test nicht berücksichtigt und daher anschließend separat ausgewertet. Als signifikant verändert wurden hier Proteine angesehen, deren 2-fache Standardabweichung der Intensitätswerte des Proteins in der detektierten Gruppe größer oder kleiner als der Intensitäts-Mittelwert des Proteins der zu vergleichenden Gruppe war. Außerdem wurden nur Proteine mit einem *fold change*  $\geq |1,5|$  betrachtet. Für Proteine, die in einer der beiden Gruppen überhaupt nicht detektiert werden konnten, wurde der *fold change* auf ein Maximum von  $|100|$  gesetzt.

### 3.3.6.2 Auswertung der Proteomdaten zur Analyse der Hypo- und Hyperthyreose-Effekte

Nach der LC-ESI-MS/MS erfolgte zunächst die visuelle Überprüfung der erhaltenen Chromatogramme der Protein-Proben unter Nutzung der Xcalibur™-Software. Mittels der Software *MaxQuant 1.6.0.16* wurden die generierten Rohdaten anschließend zur Proteinidentifizierung prozessiert, wobei hier kein *Alignment* der Chromatogramme stattfand. Durch eine eingebundene Andromeda-Suchmaschine konnten die Rohdaten gegen eine murine UniProt/Swiss-Prot Datenbank (10/2016) gesucht und Peptide sowie Proteine identifiziert werden. Die für die Proteinidentifikation verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

**Tabelle 3.6: Zur Proteinidentifikation in *MaxQuant 1.6.0.16* verwendete Parameter**

Parameter	Auswahl
Datenbank	UniProt/Swiss-Prot (10/2016); murin
Enzym	Trypsin
Peptidtoleranz	10 ppm
Fragmenttoleranz	0,02 Da
<i>Missed cleavages</i>	2
Minimale Peptidlänge	7
Statische Modifikationen	Carbamidomethylierung von Cystein (+57,021 Da)
Variable Modifikationen	Oxidation von Methionin (+15,995 Da)
Identifikationen	<i>Matched between runs</i>

Zur relativen Quantifizierung wurden die von der Software *MaxQuant* berechneten LFQ (*label-free quantification*)-Intensitätswerte als Proteinintensitäten eingesetzt, welche durch Normalisierung der Rohintensitäten generiert wurden (Cox *et al.*, 2014). Daraufhin wurden die LFQ-Intensitätswerte in die Software *GeneData Analyst 10.0.3* importiert und log<sub>10</sub>-transformiert.

Für die statistische Analyse wurde ein Welch-Test mit anschließender multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg durchgeführt, wobei nur Proteine eingeschlossen wurden, die mindestens in drei von sieben, acht bzw. neun Tieren in beiden zu vergleichenden Gruppen identifiziert wurden. Proteine, die einen  $p(\text{FDR})$ -Wert  $\leq 0,05$  und einen  $fold\ change \geq |1,5|$  aufwiesen wurden als statistisch signifikant verändert angesehen. Da Proteine, die nur in einer der beiden zu vergleichenden Gruppen in mindestens drei Tieren detektiert werden konnten, keine Berücksichtigung im Welch-Test fanden, wurden diese im Anschluss separat ausgewertet. Dabei wurden Proteine, deren 2-fache Standardabweichung der LFQ-Intensitätswerte des Proteins in der detektierten Gruppe größer oder kleiner als der LFQ-Intensitäts-Mittelwert des Proteins der zu vergleichenden Gruppe war, als signifikant verändert angesehen. Zusätzlich wurden nur Proteine mit einem  $fold\ change \geq |1,5|$  berücksichtigt. Konnten Proteine in einer der beiden Gruppen überhaupt nicht detektiert werden, wurde der  $fold\ change$  auf ein Maximum von  $|100|$  gesetzt.

### 3.3.6.3 Pathway-Analysen mittels der Software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA)

Mit Hilfe der Software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) wurden *in silico*-Pathway-Analysen der in den Proteom- bzw. Transkriptomanalysen als signifikant differenziell abundant identifizierten Proteine bzw. Gen-spezifischen Transkripte durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen UniProt-Annotationen,  $p$ -Werte und  $fold\ changes$  in die Software geladen. Die Software identifizierte auf Grundlage aller in der Datenbank annotierten Proteine bzw. Gene jene kanonische *Pathways*, die in dem eingeladenen Datensatz signifikant angereichert waren. Zusätzlich wurden die entsprechenden  $p$ -Werte der *Pathways*, Ratios der detektierten zu den insgesamt im *Pathway* enthaltenen Proteine bzw. Gene sowie die Bezeichnung der identifizierten Proteine bzw. Gene ausgegeben.

### 3.3.7 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE)

Bei der eindimensionalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, durch die partiell denaturierte Proteine elektrophoretisch nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden können (Laemmli, 1970). Durch Aufkochen sowie Zugabe des Detergens SDS, welches sich an Proteine anlagert bzw. in diese interkaliert, werden diese denaturiert und liegen durchweg mit negativer, zu ihrer Molekularmasse proportionaler Ladung vor. Dadurch können sie im Anschluss in einem elektrischen Feld elektrophoretisch entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Für die 1D-SDS-PAGE wurden je Probe 30  $\mu\text{g}$  Protein mit 1x UT-Puffer auf ein Volumen von 30  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 10  $\mu\text{l}$  4x Li-Cor Probenpuffer, welcher den Farbstoff Orange G enthält und mit 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt wurde, gemischt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei

95 °C denaturiert und anschließend auf ein NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Midi Proteingel aufgetragen. Das Fertiggel wurde zuvor in der Laufkammer positioniert, welche mit 1x NuPAGE™ MES SDS Laufpuffer befüllt wurde (Tabelle 2.12). In den oben am Gel angebrachten Adapter wurde zusätzlich NuPAGE™ Antioxidant zum Laufpuffer hinzugegeben (Tabelle 2.12). Als Größenstandard wurden 2,5 µl der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 175 V für ca. 60 min.

### 3.3.8 Western Blot-Analyse

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse konnten die zuvor in der 1D-SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und Zielproteine anschließend durch Nutzung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper nachgewiesen werden.

Dafür wurde das Gel nach der Gelelektrophorese zunächst für 15 min in 1x Transferpuffer auf dem Orbitalschüttler bei 75 rpm äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 15 s in 100 % Methanol unter Schütteln aktiviert und anschließend ebenso wie die Blotting-Papiere für 10 min in 1x Transferpuffer auf dem Orbitalschüttler bei 75 rpm äquilibriert. Die Übertragung (Blotten) der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte mittels des Semi-Dry-Verfahrens. Dabei wurde der Blot Sandwichartig entsprechend der Richtung des Stromflusses auf der Unterseite des Blotters aufgebaut und bestand aus drei Lagen Blotting-Papier, der PVDF-Membran, dem Polyacrylamidgel und drei weiteren Lagen Blotting-Papier. Mit einem Roller wurden Luftblasen aus dem Sandwich entfernt und der Deckel aufgesetzt. Das Blotten erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> der Membran.

Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran zunächst anhand des Größenstandards horizontal zwischen den erwarteten Banden beider Zielproteine durchgeschnitten. Danach wurde sie kurz in A. bidest. und dann in TBS-T-Puffer für 15 min bei 75 rpm auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Die Effizienz des Proteintransfers wurde parallel durch Färbung des Polyacrylamidgels mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 überprüft. Die Membran wurde anschließend in 20 ml *Odyssey Blocking Buffer (TBS)* für 1,5 h bei 75 rpm blockiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Die Inkubation in 10 ml der primären Antikörperlösung erfolgte ÜN bei 4 °C und 75 rpm auf dem Orbitalschüttler. Hierbei wurden sowohl der Antikörper für das Zielprotein Cyp7a1 als auch der Antikörper für den internen Standard  $\beta$ -Aktin in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt und separat mit dem entsprechenden Teil der zuvor geteilten Membran inkubiert. Die Membran wurde nach Bindung des primären Antikörpers an die Zielproteine viermal für 5 min bei 75 rpm und RT mit TBS-T-Puffer auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation in

10 ml der sekundären Antikörperlösung für 1 h bei 75 rpm und RT auf dem Orbitalschüttler, wobei der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff (*IRDye<sup>®</sup> 800CW*) markiert war. Danach wurde die Membran fünfmal mit TBS-T- und einmal mit TBS-Puffer für 5 min bei 75 rpm und RT auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Abschließend wurde die Membran für ca. 20 min bei 65 °C getrocknet, bevor sie mit Hilfe des *Odyssey<sup>®</sup> CLx Imaging Systems* und der zugehörigen *Image Studio<sup>™</sup> 5.2 Software* im 800 nm Kanal gescannt werden konnte. Die Software wurde ebenfalls zur Quantifizierung der detektierten Proteinbanden genutzt, wobei die erhaltenen Signalintensitäten automatisch einer Hintergrundkorrektur unterzogen wurden.

Für die Auswertung wurden die prozentualen Anteile aller Signalintensitäten für den internen Standard  $\beta$ -Aktin relativ zur höchsten detektierten Signalintensität für  $\beta$ -Aktin berechnet. Die Signalintensitäten für das Zielprotein CYP7A1 wurden dann jeweils pro Probe durch den zugehörigen prozentualen Wert geteilt und somit normalisiert. Für die einzelnen experimentellen Bedingungen wurden danach die Mittelwerte ermittelt, welche schließlich für die Berechnung des *fold changes* dienten. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde mit Hilfe der Software *GraphPad Prism 5* ein ungepaarter t-Test durchgeführt.

### **3.4 Arbeiten mit Metaboliten**

#### **3.4.1 Analyse von Sexualhormon-Konzentrationen**

Die Konzentrationen der Sexualhormone Progesteron, Androstendion, Testosteron und Dihydrotestosteron wurden in Lebergewebe, Serum sowie inguinalem und gonadalem weißen Fettgewebe von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD und den entsprechenden Kontrolltieren analysiert. Dabei wurde die Serum- bzw. Gewebekonzentration mittels Gaschromatographie-Tandem Massenspektrometrie (GC-MS/MS) in einzelnen Messungen wie in Nilsson *et al.* (2015) beschrieben untersucht. Diese Analysen wurden unter der Leitung von Andreas Landin und Prof. Claes Ohlsson in der Abteilung Innere Medizin der Sahlgrenska Akademie an der Universität Göteborg in Schweden durchgeführt.

Den Proben wurde hierbei zunächst ein isotopenmarkierter Standard zugesetzt, bevor die Steroide mit Chlorbutan extrahiert wurden. Anschließend erfolgte deren Reinigung über Silikagel-Säulen und Derivatisierung mittels Pentafluorbenzylhydroxylamin-Hydrochlorid, gefolgt von Pentafluorbenzoylchlorid. Die Steroide wurden nach negativer chemischer Ionisation durch Elektroneneinfang im „*Multiple Reaction Monitoring*“ (MRM)-Modus unter Nutzung eines Agilent 7000 dreifach Quadrupol Massenspektrometers detektiert. Die Nachweisgrenzen für Progesteron, Androstendion, Testosteron und Dihydrotestosteron lagen bei 75, 7,5, 40 und 4,0 pg / g. Proben, die Sexualhormon-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze aufwiesen, wurden in der Auswertung als Nullwerte betrachtet. Estradiol und Estron konnten in keinem der untersuchten Gewebe bzw. Seren nachgewiesen werden.

Für die statistische Auswertung der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt, wobei Änderungen der Steroid-Konzentrationen mit einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurden.



## 4 Ergebnisse

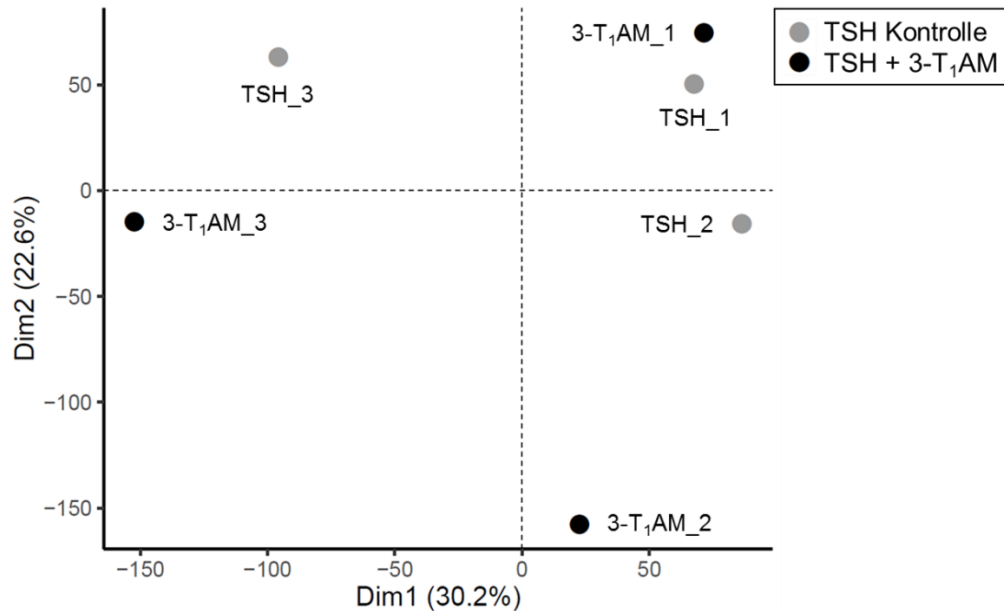
### 4.1 Wirkungen von 3-T<sub>1</sub>AM auf das Transkriptom von PCCL3-Zellen

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung potenzieller Wirkungen von 3-T<sub>1</sub>AM auf das Transkriptom von Thyreozyten in einem *in vitro*-Modell. Dazu wurden PCCL3-Zellen der Ratte genutzt, welche zunächst in Gegenwart von FKS und TSH kultiviert wurden. Vor Beginn des eigentlichen Experiments hingegen erfolgte die Kultivierung ohne FKS und TSH. Die Restimulation der derart depletierten Zellen erfolgte durch Zugabe von 0,1 mU / ml TSH zum Medium, wobei dies die Kontroll-Bedingung darstellte. Die 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung erfolgte neben der TSH-Stimulation durch zusätzliche Gabe von 1 µM 3-T<sub>1</sub>AM für 3 h (jeweils  $n = 3$ ).

Die präparierte Gesamt-RNA der PCCL3-Zellen wurde zunächst einer Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle unterzogen. Daraufhin wurden die RNA-Proben mit DNase behandelt und gereinigt, bevor erneut RNA-Konzentration und -Qualität bestimmt wurden. Die Proben wiesen durchweg eine RIN (*RNA Integrity Number*) von 10,0 auf und waren somit von höchster Qualität. Für die folgende Transkriptomanalyse wurden 200 ng Gesamt-RNA eingesetzt und mittels der *GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Arrays* untersucht. Die gescannten Arrays wurden für die Auswertung zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen und dabei alle als qualitativ zufriedenstellend eingestuft. Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe der *Rosetta Resolver*-Software, welche für Normalisierung und statistische Analyse der Transkriptomdaten genutzt wurde.

Außerdem wurde für die Signalintensitäten aller Gen-spezifischen Transkripte jedes Arrays eine Hauptkomponentenanalyse (*Principle Component Analysis*, PCA) durchgeführt. Diese sollte die biologische Varianz der Zellen innerhalb derselben experimentellen Gruppe sowie die durch die 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung hervorgerufenen Unterschiede zwischen den beiden experimentellen Gruppen aufzeigen. Die PCA, welche die ersten beiden Hauptkomponenten bzw. Dimensionen dieser Transkriptomdaten abbildet, ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Darin ist keine Auftrennung der Proben entsprechend der beiden experimentellen Gruppen „TSH Kontrolle“ (hellgrau) und „TSH mit 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung“ (schwarz) ersichtlich. Die Proben beider Gruppen streuen sehr stark, wobei die Streuung in der 3-T<sub>1</sub>AM-behandelten Gruppe noch stärker zu sein scheint. Dies lässt auf eine starke biologische Variabilität innerhalb beider experimenteller Bedingungen schließen. Jedoch fällt bei genauerer Betrachtung auf, dass die einzelnen Proben dazu tendieren nach dem Durchgang ihrer Kultivierung zu clustern, d. h.,

dass die TSH-Kontrollen und TSH-Proben mit 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung derselben Kultivierung eher beieinanderliegen als dass sie sich zu den Proben ihrer jeweiligen experimentellen Bedingung gruppieren.



**Abbildung 4.1: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-basierten Genexpressionsmuster von PCCL3-Zellen unter TSH-Stimulation mit bzw. ohne 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung für 3 h.** Dargestellt sind jeweils drei Bio-Replikate der Gruppen „TSH-Kontrolle“ (hellgrau) und „TSH mit 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung“ (schwarz). Aufgetragen ist die zweite gegen die erste Dimension.

Wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben, erfolgte die Detektion differenziell exprimierter Gene auf der Basis der generierten Transkriptomdaten. Von den insgesamt 27596 auf dem Array repräsentierten Gen-spezifischen Transkripten zeigte allerdings keines signifikant veränderte mRNA-Mengen unter 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung. Weiterhin gab es keine Transkripte, die einen signifikanten  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  aufwiesen. Bei ausschließlicher Betrachtung der *fold changes* fiel auf, dass nur ein einziges annotiertes Gen-spezifisches Transkript einen *fold change*  $\geq |1,5|$  aufwies. Des Weiteren konnten nur 149 annotierte Gen-spezifische Transkripte mit einem *fold change*  $\geq |1,2|$  identifiziert werden. Dies deutet ebenso wie die PCA darauf hin, dass die Kontroll-Zellen und die 3-T<sub>1</sub>AM-behandelten Zellen sich in ihren Transkriptomen kaum voneinander unterscheiden und folglich die 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung nach 3 h keinen Einfluss auf mRNA-Ebene zeigt.

Eine Übersicht über alle in der Transkriptomanalyse erfassten Gen-spezifischen Transkripte mit den dazugehörigen  $p$ -Werten und *fold changes* ist im Anhang in Tabelle A-I aufgeführt.

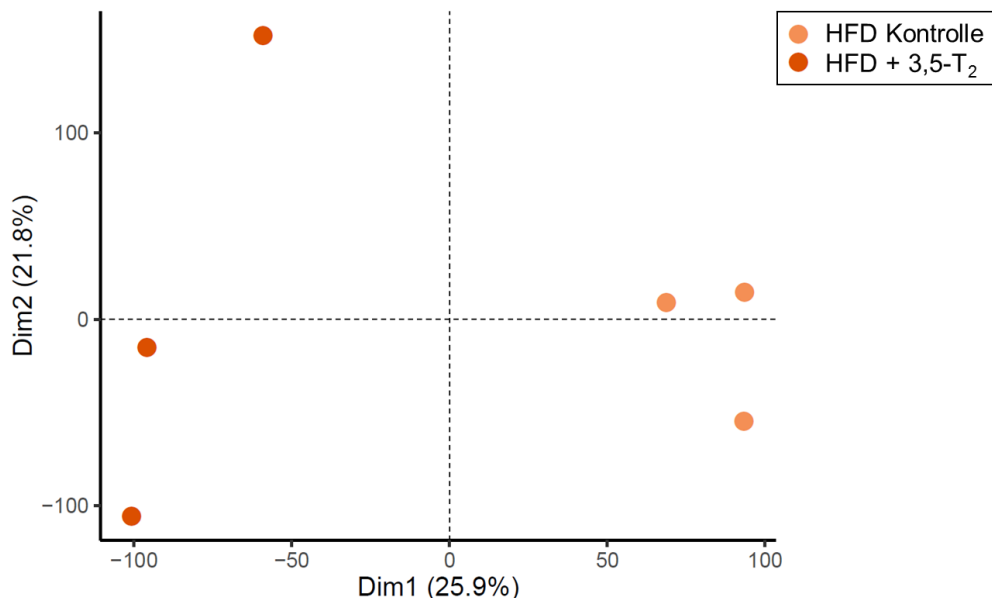
## 4.2 Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom von Mäusen unter Hochfettdiät

Die Untersuchung der Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom von Mäusen unter Hochfettdiät (HFD) führte vorangegangene Analysen im Rahmen einer Masterarbeit fort (Masterarbeit Janine Golchert, 2014). In dieser Masterarbeit wurden Transkriptomanalysen der Lebern adipöser Mäuse unter HFD durchgeführt, die parallel 14 Tage lang einmal täglich entweder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle appliziert bekamen oder T<sub>3</sub> (0,03 µg/g Körpergewicht), eine geringe Dosis 3,5-T<sub>2</sub> (0,25 µg/g Körpergewicht) oder eine hohe Dosis 3,5-T<sub>2</sub> (2,5 µg/g Körpergewicht). Zusätzlich gab es eine zweite Gruppe mit normalgewichtigen Mäusen, die eine Standarddiät (SD) erhielten und denen parallel für 28 Tage einmal täglich entweder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle oder eine hohe Dosis 3,5-T<sub>2</sub> (2,5 µg/g Körpergewicht) injiziert wurde. Da es zum Zeitpunkt der Masterarbeit jedoch noch keine korrespondierende HFD-Gruppe mit 28-tägiger 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung (2,5 µg/g Körpergewicht) gab, sollten die Untersuchungen mit diesen experimentellen Bedingungen im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit, anknüpfend an die Ergebnisse der Masterarbeit, durchgeführt werden.

Die somatometrischen Parameter der Tiergruppen wurden durch Dr. Wenke Jonas (DIfE) und Dr. Julika Lietzow (Charité) erhoben und ausgewertet (Jonas *et al.*, 2015) und werden im Diskussionsteil dieser Arbeit genauer erläutert.

Die Lebergewebe wurden nach Tötung der Mäuse entnommen und mittels der Trizol<sup>®</sup>-Methode die Gesamt-RNA präpariert. Daraufhin wurden die Konzentration sowie Qualität der RNA bestimmt und die Proben einem DNase-Verdau mit anschließender Aufreinigung unterzogen. Nach erneuter Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle wurden die Proben mit einer RIN ≥ 8,0, die somit keine ausgeprägte Degradation aufwiesen, für die Transkriptomanalysen eingesetzt. Dafür wurden initial 200 ng Gesamt-RNA von jeweils drei Bio-Replikaten (Einzeltieren) eingesetzt und die Proben unter Nutzung von *GeneChip<sup>®</sup> Mouse Gene 1.0 ST Arrays* analysiert. Für die Auswertung der Transkriptomdaten wurden die gescannten Dateien zunächst einer Qualitätskontrolle unterzogen, wobei alle Arrays als qualitativ hinreichend eingestuft wurden und somit für die weitere Auswertung verwendet werden konnten. Mithilfe der *Rosetta Resolver* Software wurden die Daten anschließend normalisiert und statistisch ausgewertet. Zudem wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*Principle Component Analysis*, PCA) der Signalintensitäten aller mittels des Microarrays detektierten Gen-spezifischen Transkripte durchgeführt, um die biologische Variabilität der Primärdaten zwischen den Tieren einer Gruppe sowie Unterschiede der Tiere zwischen den beiden Gruppen infolge der 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung aufzuzeigen. In Abbildung 4.2 ist die PCA der Transkriptomanalyse dargestellt, wobei die ersten beiden Hauptkomponenten bzw. Dimensionen gegeneinander aufgetragen wurden. Daraus wird die Zuordnung der insgesamt

sechs Proben zu zwei in der ersten Hauptkomponente deutlich voneinander abgegrenzten Gruppen deutlich, welche der Kontroll- (hellorange) und der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten (dunkelorange) Gruppe entsprechen. Innerhalb der Gruppen ist vor allem in der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Gruppe eine starke biologische Variabilität zu erkennen, da die Proben in der zweiten Hauptkomponente deutlich streuen.



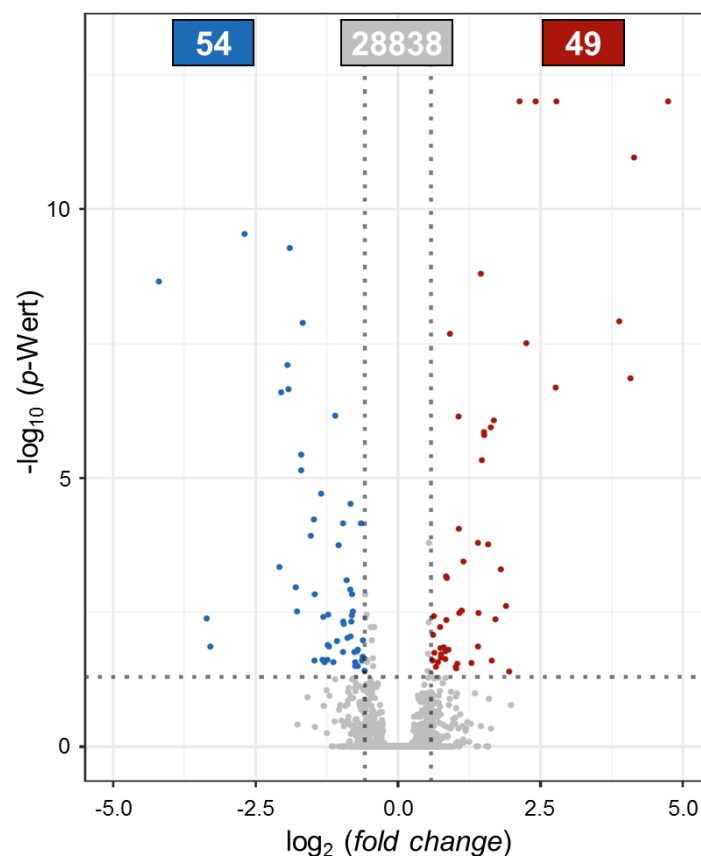
**Abbildung 4.2: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-basierten hepatischen Genexpressionsmuster von HFD-gefütterten Mäusen mit und ohne 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung.** Dargestellt sind jeweils drei Bio-Replikate der Gruppen „Kontrolle“ (hellorange) und „3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung“ (dunkelorange). Aufgetragen ist die zweite gegen die erste Dimension.

Die Vorgehensweise zur Identifizierung signifikant differenziell exprimierter Gene zwischen den beiden experimentellen Bedingungen ist in Kapitel 3.2.6.2 ausgeführt. Von den 28944 mit dem Microarray detektierbaren Gen-spezifischen Transkripten wiesen 118 in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zur HFD-Kontrollgruppe einen  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  auf. Von diesen wiederum besaßen 103 zusätzlich einen  $fold\ change \geq |1,5|$ , wobei 49 Transkripte signifikant erhöhte und 54 signifikant verringerte Mengen zeigten (Abbildung 4.3). Die tabellarische Übersicht aller signifikant differenziell exprimierten Gene ist im Anhang in Tabelle A-II zu finden.

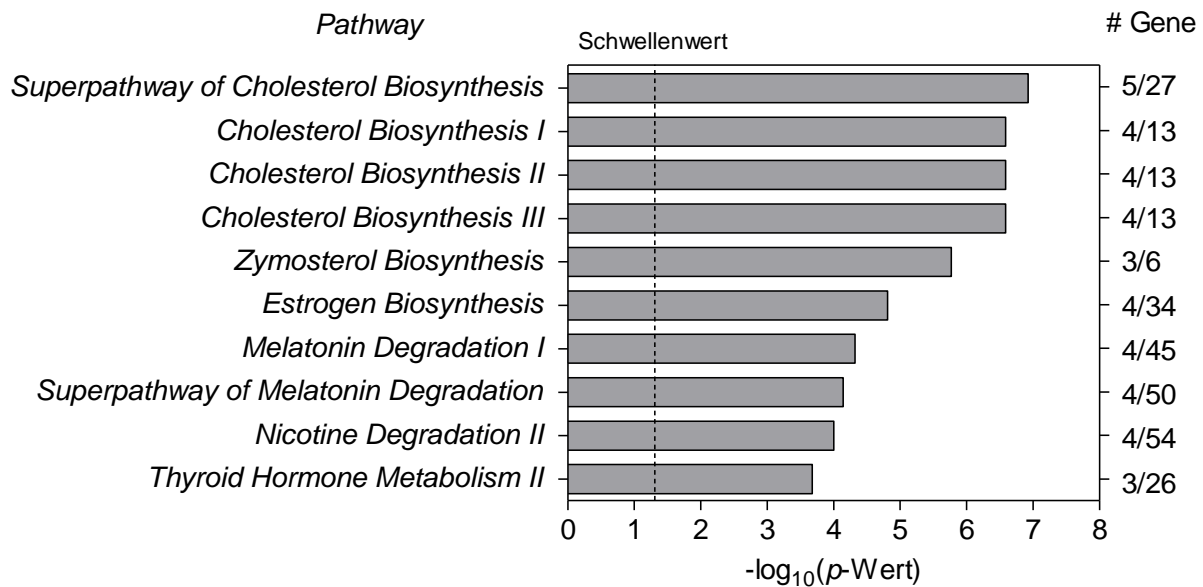
Außerdem wurden mit Hilfe der Software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *in silico*-Pathway-Analysen der detektierten signifikant differenziell exprimierten Gene bzw. derer Genprodukte durchgeführt. Dafür wurden die jeweiligen Namen der Transkripte bzw. kodierten Proteine, deren  $p$ -Werte und  $fold\ changes$  eingeladen und auf Basis aller in der IPA-Datenbank annotierten Gene signifikant angereicherte *Pathways* im Datensatz identifiziert. Die zehn am signifikantesten assoziierten kanonischen *Pathways* mit den dazugehörigen  $p$ -Werten und dem Ratio der im Datensatz als signifikant differenziell exprimiert identifizierten Gene zu den

insgesamt dem *Pathway* zugeordneten Gene sowie die Namen der jeweiligen Gen-Transkripte sind in Abbildung 4.4 und Tabelle 4.1 dargestellt.

Die genauere Betrachtung der einzelnen den IPA-*Pathways* zugeordneten Gen-spezifischen Transkripte ergab eine starke Überlappung zwischen den *Pathways*. So waren die fünf am stärksten assoziierten *Pathways* (*Superpathway of Cholesterol Biosynthesis*, *Cholesterol Biosynthesis I*, *II* und *III* sowie *Zymosterol Biosynthesis*) alle mit der Cholesterol-Biosynthese verbunden und ihnen wurden die Gene *Sqle*, *Nsdhl*, *Idi1*, *Hsd17b7* und *Cyp51* bzw. die von diesen Genen kodierten Proteine zugeordnet. Die anderen fünf *Pathways* *Estrogen Biosynthesis*, *Melatonin Degradation I*, *Superpathway of Melatonin Degradation*, *Nicotine Degradation II* und *Thyroid Hormone Metabolism II* umfassten die Gene *Akr1c18*, *Cyp2u1*, *Hsd17b7*, *Cyp51*, *Ugt2b37*, *Sult1b1*, *Inmt* und *Dio1*.



**Abbildung 4.3:** „Volcano-Plot“ der in der Transkriptomanalyse detektierten Gen-spezifischen Transkripte von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zur HFD-Kontrollgruppe. Transkripte mit signifikant verringerter Menge in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen sind blau und jene mit signifikant erhöhter Menge rot dargestellt, während nicht signifikant veränderte grau gefärbt sind. Die gestrichelten Linien markieren die Signifikanzschwellen von  $p \leq 0,05$  (aufgetragen als negativer dekadischer Logarithmus) und  $\text{fold change} \geq |1,5|$  (aufgetragen als binärer Logarithmus).



**Abbildung 4.4:** Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Gene mit signifikant veränderter mRNA-Menge ( $p \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ) in den 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten HFD-Mäusen im Vergleich zur HFD-Kontrollgruppe. Es sind die zehn *Pathways* mit den kleinsten  $p$ -Werten (linke y-Achse) und die dazugehörigen Anzahlen detektierter Gen-spezifischer Transkripte im Verhältnis zu den insgesamt im *Pathway* enthaltenen Genen (rechte y-Achse) aufgeführt. Auf der x-Achse ist der negative dekadische Logarithmus des  $p$ -Wertes dargestellt, wobei die gestrichelte Linie den Schwellenwert der Signifikanz kennzeichnet.

**Tabelle 4.1:** Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Gene mit signifikant veränderten mRNA-Mengen ( $p \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ) in den 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten HFD-Mäusen im Vergleich zur HFD-Kontrollgruppe. Es sind die zehn IPA-*Pathways* mit den kleinsten  $p$ -Werten, die dazugehörigen Ratios aus detektierten Gen-spezifischen Transkripten zu den insgesamt im jeweiligen *Pathway* enthaltenen, sowie die jeweils zugeordneten Gene aufgeführt. Gene mit erhöhter mRNA-Menge sind rot gefärbt, während solche mit verringerter Transkriptmenge blau gefärbt sind.

IPA-Pathway	$p$ -Wert	Ratio (identifiziert/ gesamt)	Zugeordnete Gen- spezifische Transkripte
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	1,17E-07	5/27	<i>Sqle</i> , <i>Nsdhl</i> , <i>Idi1</i> , <i>Hsd17b7</i> , <i>Cyp51</i>
Cholesterol Biosynthesis I	2,57E-07	4/13	<i>Sqle</i> , <i>Nsdhl</i> , <i>Hsd17b7</i> , <i>Cyp51</i>
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	2,57E-07	4/13	<i>Sqle</i> , <i>Nsdhl</i> , <i>Hsd17b7</i> , <i>Cyp51</i>
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	2,57E-07	4/13	<i>Sqle</i> , <i>Nsdhl</i> , <i>Hsd17b7</i> , <i>Cyp51</i>
Zymosterol Biosynthesis	1,7E-06	3/6	<i>Nsdhl</i> , <i>Hsd17b7</i> , <i>Cyp51</i>

---

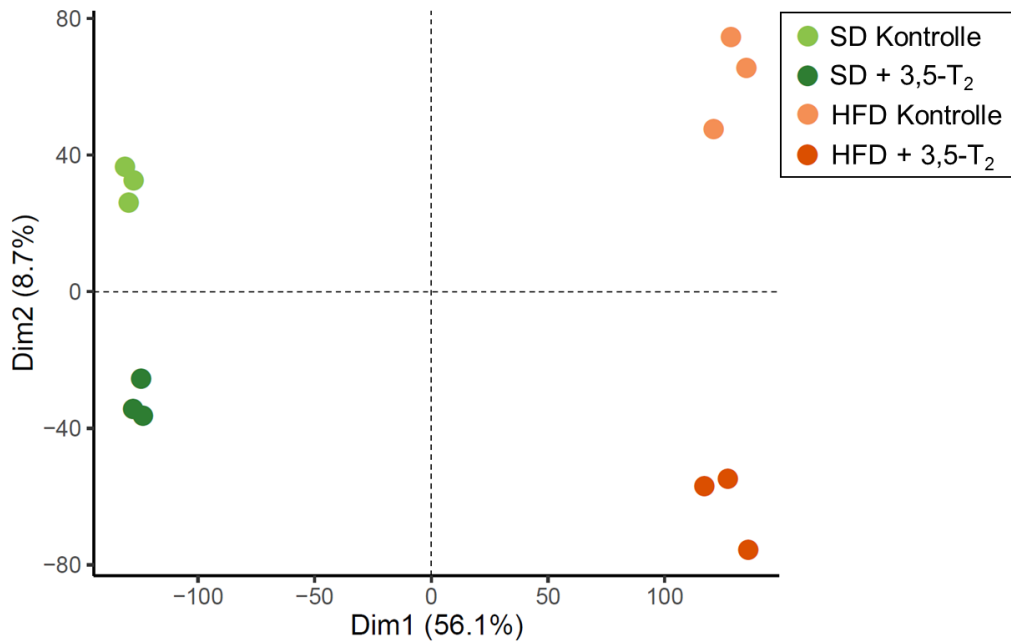
<i>Estrogen Biosynthesis</i>	1,55E-05	4/34	<i>Akr1c18, Cyp2u1, Hsd17b7, Cyp51</i>
<i>Melatonin Degradation I</i>	4,79E-05	4/45	<i>Ugt2b37, Cyp2u1, Cyp51, Sult1b1</i>
<i>Superpathway of Melatonin Degradation</i>	7,24E-05	4/50	<i>Ugt2b37, Cyp2u1, Cyp51, Sult1b1</i>
<i>Nicotine Degradation II</i>	1,00E-04	4/54	<i>Ugt2b37, Cyp2u1, Inmt, Cyp51</i>
<i>Thyroid Hormone Metabolism II (via Conjugation and/or Degradation)</i>	2,09E-04	3/26	<i>Ugt2b37, Dio1, Sult1b1</i>

---

#### 4.2.1 Vergleich der Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom von Mäusen unter Hochfett- und Standarddiät

Da die Transkriptomanalysen der Lebergewebe von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten HFD-Mäusen an die Analysen des hepatischen Transkriptoms von SD-Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung anknüpften (Masterarbeit Janine Golchert, 2014), sollen die Ergebnisse der beiden einzelnen Untersuchungen im Folgenden miteinander verglichen werden. Die Durchführung der Analyse und die Auswertung der Transkriptomdaten der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten SD-Mäuse erfolgte in gleicher Weise wie die Auswertung der HFD-Mäuse unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung (siehe Kapitel 3.2.5 und 3.2.6).

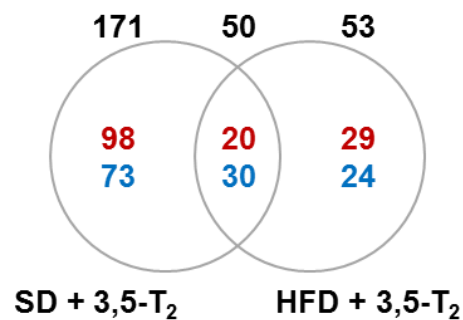
In der Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Signalintensitäten aller Gen-spezifischer Transkripte der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäuse unter SD und HFD zeigte sich eine klare Auftrennung der vier einzelnen Gruppen SD Kontrolle (hellgrün), SD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung (dunkelgrün), HFD Kontrolle (hellorange) und HFD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung (dunkelorange) (Abbildung 4.5). In der ersten Dimension ließen sich die Gruppen SD und HFD voneinander unterscheiden und in der zweiten Dimension konnten die Kontrollen von der 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung getrennt werden. Innerhalb der einzelnen Gruppen ist kaum eine biologische Variabilität zu erkennen, wobei die Tiere der HFD-Gruppen im Vergleich zu den SD-Gruppen eine minimal größere Streuung zeigen.



**Abbildung 4.5: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-basierten hepatischen Genexpressionsmuster von SD- und HFD-gefütterten Mäusen mit und ohne 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung.** Dargestellt sind jeweils drei Bio-Replikate der Gruppen „SD Kontrolle“ (hellgrün), „SD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung“ (dunkelgrün), „HFD Kontrolle“ (hellorange) und „HFD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung“ (dunkelorange). Aufgetragen ist die zweite gegen die erste Dimension.

In der Transkriptomanalyse 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter SD-Mäuse konnten 221 Gene mit signifikant differenziellen mRNA-Mengen im Vergleich zur SD-Kontrollgruppe identifiziert werden ( $p \leq 0,05$ ,  $fold\ change \geq |1,5|$ ). Davon wiesen 118 Gene erhöhte und 103 verringerte Transkriptmengen auf. Eine tabellarische Übersicht aller signifikant differenziell exprimierten Gene ist im Anhang in Tabelle A-II zu finden.

Der Vergleich der signifikant differenziell abundanten hepatischen Gen-spezifischen Transkripte in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen ergab insgesamt 50 Transkripte, die unter beiden Diäten verändert waren (Abbildung 4.6). Diese wiesen in beiden Diätgruppen die gleiche Richtung der Veränderung auf, wobei 20 erhöhte und 30 verringerte Mengen zeigten. Folglich demonstrierten 171 Gene ausschließlich unter SD-Bedingungen und 53 ausschließlich unter HFD-Bedingungen eine differenzielle Expression auf mRNA-Ebene. Dies bedeutet, dass für etwa die Hälfte der Gene, die unter HFD-Bedingungen signifikant differenzielle Expression zeigten, dies auch unter SD-Bedingungen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung zutraf. Eine Übersicht der Gen-spezifischen Transkripte, die sowohl unter SD- als auch unter HFD-Bedingungen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung in signifikant unterschiedlichen Mengen vorlagen, ist im Anhang in Tabelle A-II aufgelistet.



**Abbildung 4.6:** Vergleich der Anzahl der auf mRNA-Ebene signifikant differenziell exprimierten hepatischen Gene in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD bzw. HFD im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen ( $p \leq 0,05$ ,  $fold\ change \geq |1,5|$ ). Die insgesamt als differenziell abundant identifizierten Transkripte sind in schwarzer, jene mit erhöhter Menge in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen in roter und jene mit verringerter Menge in blauer Schrift dargestellt.

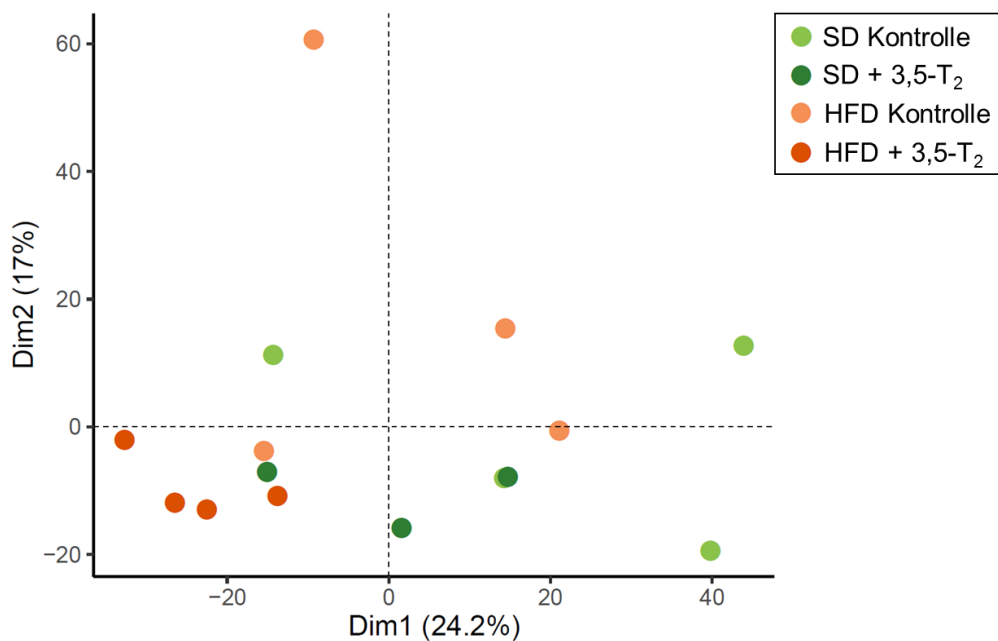
#### 4.3 Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät

Der Hauptteil dieser Arbeit bestand in der Analyse der Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Leber-Proteomprofile von Mäusen unter Standard- (SD) und Hochfettdiät (HFD). Für diese Analysen wurden dieselben Proben wie für die Transkriptomanalysen im Rahmen der bereits erwähnten Masterarbeit (Masterarbeit Janine Golchert, 2014) sowie dieser Doktorarbeit verwendet, um einen komplementären Datensatz zu erhalten. Für die Proteomanalysen wurde jedoch jeweils ein zusätzliches biologisches Replikat eingesetzt, sodass jeweils vier Proben pro experimenteller Bedingung analysiert wurden.

Dafür wurden nach der Tötung der Tiere und der Leberentnahme Proteine mittels der Trizol<sup>®</sup>-Methode präpariert, wobei nach der Phasentrennung die wässrige Phase zur Isolation der RNA für die Transkriptomanalysen und die organische Phase zur Präparation der Proteine genutzt wurde. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 4 µg Protein pro Probe proteolytisch mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide mittels C18-Material entsalzt und gereinigt. Die anschließende massenspektrometrische Analyse der Peptidlösungen erfolgte an einem Q Exactive<sup>™</sup> Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer. Mit Hilfe der Software *GeneData Refiner MS 10.0.3* und einer integrierten Mascot-Suche gegen eine murine UniProt/Swiss-Prot Datenbank wurden Peptide und Proteine identifiziert. Die relative Quantifizierung der Proteinintensitäten erfolgte mittels der Software *GeneData Analyst 10.0.3*, welche auch für die statistische Auswertung genutzt wurde.

Nach der visuellen Inspektion der Chromatogramme unter Nutzung der Xcalibur<sup>™</sup> Software stellte sich eine Probe der Gruppe 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter SD-Mäuse als Ausreißer dar und wurde daher von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. In der Proteomanalyse der restlichen 15 Proben der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten und Kontroll-Mäuse unter SD bzw. HFD konnten insgesamt

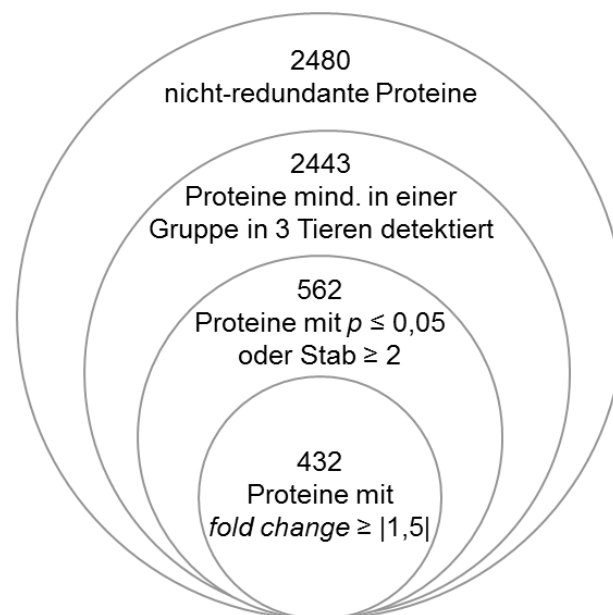
2480 nicht-redundante Proteine identifiziert werden. Davon wurden 2148 Proteine in sämtlichen untersuchten Proben detektiert. Diese Intensitätswerte wurden für die Erstellung einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) genutzt um die biologische aber auch die technische Varianz der Daten von Tieren derselben experimentellen Bedingung sowie die Unterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen infolge des Diätstatus und der 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung darzustellen (Abbildung 4.7). In der PCA, in welcher die erste gegen die zweite Hauptkomponente aufgetragen wurde, ist keine eindeutige Auftrennung der einzelnen Proben nach ihren jeweiligen Behandlungsgruppen ersichtlich. Jedoch lässt sich ein Trend in der Auftrennung zwischen Kontroll- und 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Gruppen in der ersten und zweiten Dimension erkennen. Die Proben der Gruppen 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter SD (dunkelgrün) und HFD (dunkelorange) liegen jeweils relativ gut zusammen, während die Proben der Kontroll-Mäuse unter SD (hellgrün) und HFD (hellorange) stark streuen. Dies deutet auf eine starke biologische Variabilität innerhalb der Kontrollgruppen hin.



**Abbildung 4.7: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der hepatischen Proteomprofile von SD- und HFD-gefütterten Mäusen mit und ohne 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung.** Dargestellt sind jeweils vier bzw. drei Bio-Replikate der Gruppen „SD Kontrolle“ (hellgrün), „SD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung“ (dunkelgrün), „HFD Kontrolle“ (hellorange) und „HFD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung“ (dunkelorange). Aufgetragen ist die zweite gegen die erste Dimension.

Von den insgesamt 2480 identifizierten nicht-redundanten Proteinen konnten 2443 Proteine in mindestens drei Tieren in wenigstens einer experimentellen Gruppe detektiert werden. Für den Welch-Test wurden nur Proteine berücksichtigt, die in mindestens 66 % der Proben einer Gruppe und in beiden zu vergleichenden experimentellen Gruppen detektiert wurden, was drei von vier Tieren bzw. in der Bedingung 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter SD-Mäuse zwei von drei Tieren

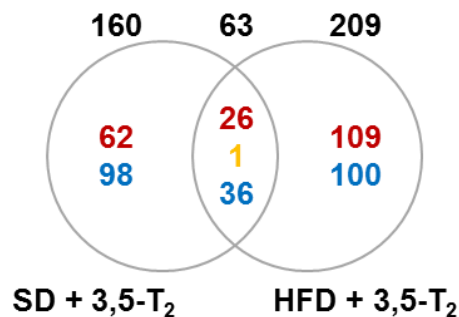
entspricht. Daher wurde für insgesamt 2342 Proteine ein Welch-Test durchgeführt. In den hier aufgeführten Ergebnissen des Welch-Tests wurden Proteine mit einem signifikanten nominalen  $p$ -Wert betrachtet, da nach der multiplen Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen zu vergleichenden Bedingungen identifiziert werden konnten. Im Welch-Test konnten 527 Proteine mit einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  identifiziert werden. Da Proteine, welche lediglich in einer der beiden zu vergleichenden Gruppen in mindestens drei Tieren detektiert wurden, keine Berücksichtigung im Welch-Test fanden, wurden diese im Anschluss separat ausgewertet. Dafür wurde von diesen insgesamt 115 Proteinen die 2-fache Standardabweichung der Intensitätswerte berechnet. War letztere größer oder kleiner als der Intensitäts-Mittelwert der zu vergleichenden Gruppe, so wurde das jeweilige Protein als signifikant verändert klassifiziert. Bei Proteinen, die in einer der beiden Gruppen überhaupt nicht detektiert werden konnten, wurde der *fold change* auf ein Maximum von  $|100|$  gesetzt. Folglich konnten 35 zusätzliche Proteine als signifikant verändert klassifiziert werden, sodass insgesamt 562 Proteine mit  $p \leq 0,05$  und Standardabweichung  $\geq 2$  identifiziert wurden. Von diesen wiederum wiesen 432 Proteine einen *fold change*  $\geq |1,5|$  auf und wurden im Folgenden für die weitere funktionelle Auswertung betrachtet (Abbildung 4.8).



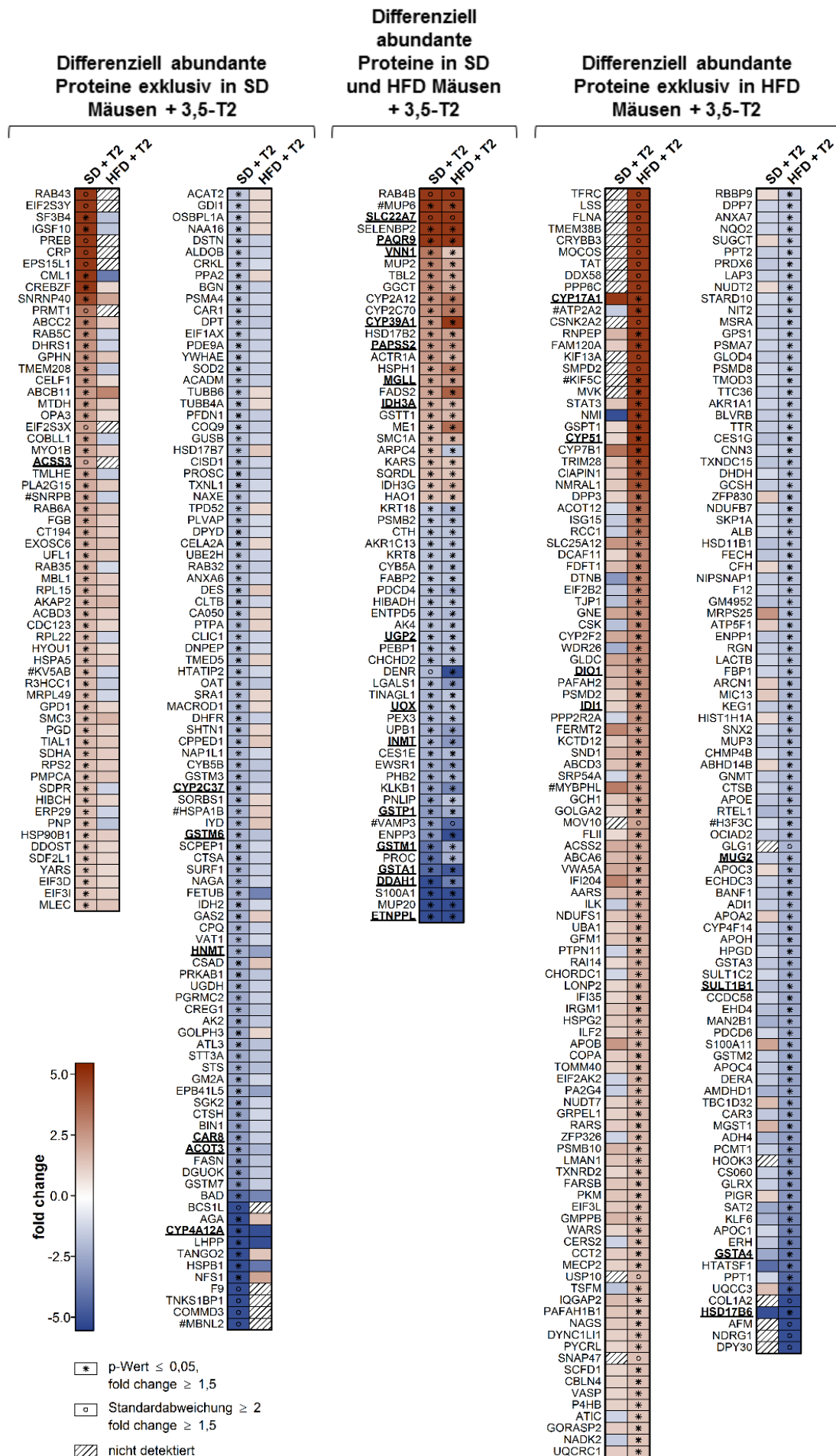
**Abbildung 4.8: Anzahl identifizierter hepatischer Proteine in der Proteomanalyse von Kontroll- und 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD.** Dargestellt sind die Anzahl identifizierter nicht-redundanter Proteine, solcher die in mindestens einer Gruppe in mindestens 3 Tieren detektiert wurden sowie die Zahlen signifikant differenziell abundanter Proteine (Welch-Test:  $p \leq 0,05$  oder Standardabweichung (Stab)  $\geq 2$ ; *fold change*  $\geq |1,5|$ ).

Der Vergleich 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter SD mit den Kontroll-Mäusen unter SD ergab 269 Proteine mit einem  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ , von denen 107 erhöhte und 162 verringerte Abundanzen aufwiesen. Wenn nur Proteine mit einem zusätzlichen *fold change*  $\geq |1,5|$

betrachtet wurden, reduzierte sich die Zahl signifikanter Proteine mit veränderter Abundanz auf 223, wobei 89 Proteine erhöhte und 134 verringerte Abundanzen zeigten. Für den Vergleich 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter HFD mit den Kontroll-Mäusen unter HFD wurden 376 Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) identifiziert, wovon 183 erhöhte und 193 verringerte Abundanzen aufwiesen. Von diesen wurden 272 Proteine identifiziert, die einen *fold change*  $\geq |1,5|$  besaßen, wobei 135 Proteine erhöhte und 137 verringerte Abundanzen zeigten. Ein Vergleich dieser Proteine mit 1,5-facher Veränderung in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ergab, dass 62 Proteine sowohl in SD- als auch in HFD-gefütterten Tieren in die gleiche Richtung verändert vorlagen und entsprechend 160 bzw. 209 Proteine gruppenspezifische Effekte in SD- bzw. HFD-gefütterten Tieren zeigten. Lediglich ein Protein namens *Actin-related protein 2/3 complex subunit 4* (ARPC4) wies eine entgegengesetzte Mengenveränderung in SD- und HFD-gefütterten Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung auf (Abbildung 4.9). Eine Übersicht über die jeweiligen signifikant differenziell abundanten Proteine in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten SD- und HFD-gefütterten Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ist in der Heatmap in Abbildung 4.10 dargestellt. Die komplette tabellarische Übersicht aller signifikant differenziell abundanten Proteine nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung in SD- und HFD-gefütterten Mäusen ist im Anhang in Tabelle A-III zu finden.



**Abbildung 4.9: Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanter hepatischer Proteine in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD bzw. HFD im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen.** Die insgesamt als verändert identifizierten Proteine sind in schwarzer, jene mit erhöhter Abundanz in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen in roter und jene mit verringerter Abundanz in blauer Schrift dargestellt. Die gelbe Schrift kennzeichnet ein Protein mit entgegengesetzt veränderter Abundanz zwischen Tieren unter SD und HFD.  $p \leq 0,05$ , Standardabweichung  $\geq 2$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ .

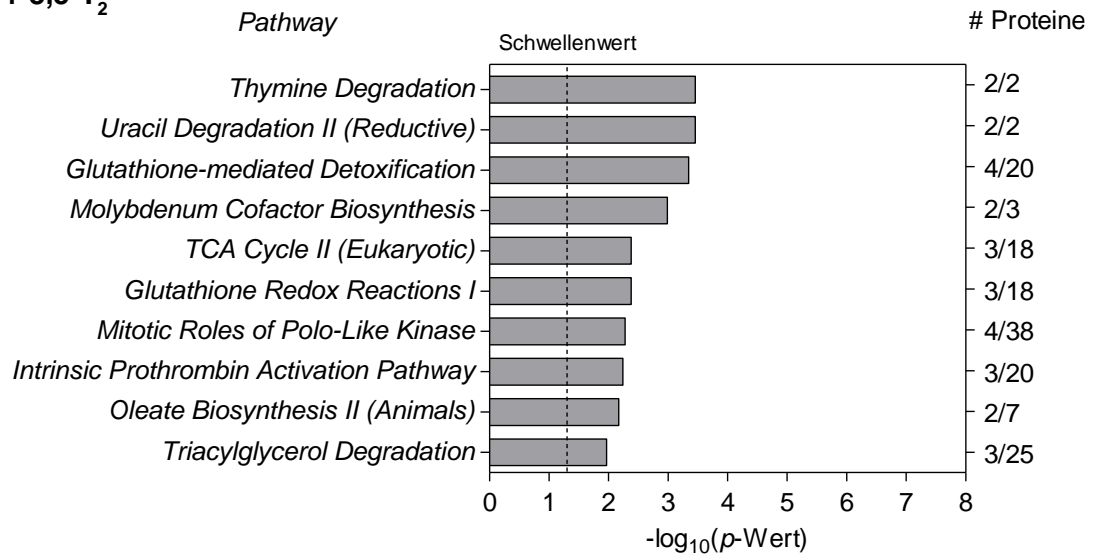
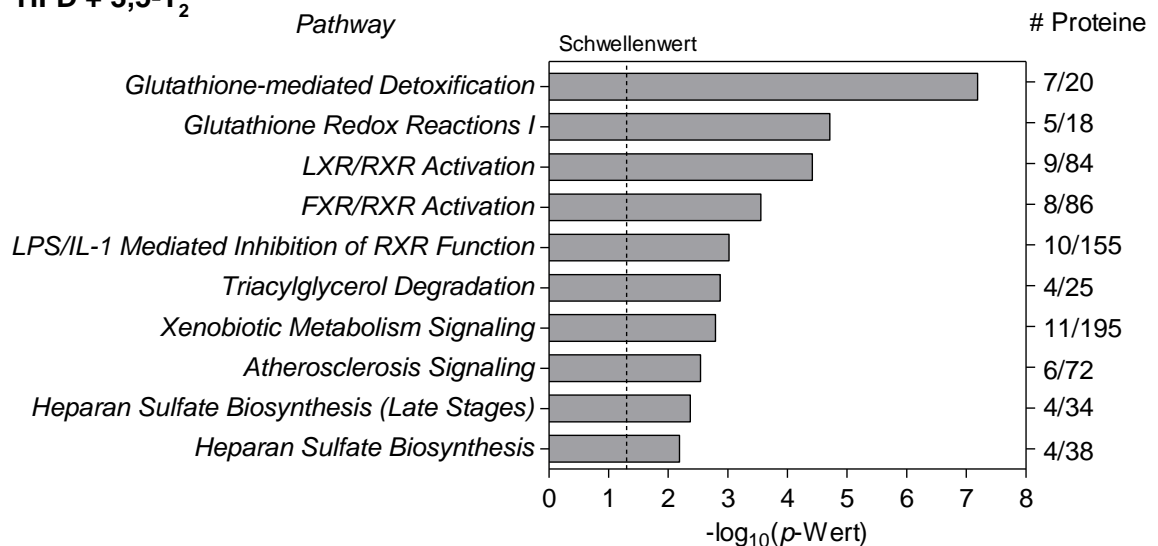


**Abbildung 4.10: Heatmap der differenziell abundanten hepatischen Proteine von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD im Vergleich zur Kontrollgruppe.** Dargestellt sind alle Proteine, die in mindestens einer der beiden Bedingungen in SD- oder HFD-gefütterten 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen ( $p \leq 0,05$  (\*), Standardabweichung  $\geq 2$  (○), *fold change*  $\geq |1,5|$ ). Proteine, welche nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung mit erhöhter Abundanz im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe identifiziert wurden, sind rot und solche mit verringerter Abundanz blau dargestellt. Proteine die einen *fold change*  $> |5,0|$  aufwiesen sind mit der dunkelsten Rot- bzw. Blaufärbung dargestellt. Proteine, die in einer der beiden Bedingungen nicht detektiert werden konnten, sind diagonal gestreift dargestellt. Proteinennamen, die nicht eindeutig einem Protein zugeordnet wurden, sondern zu nah verwandten Proteingruppen gehören beginnen mit einem #. Unterstrichene Proteinennamen kennzeichnen jene Proteine, deren mRNAs in der korrespondierenden Transkriptomanalyse ebenfalls als signifikant differenziell abundant identifiziert wurden ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ).

#### 4.3.1 **Pathway-Analysen von 3,5-T<sub>2</sub> induzierten Veränderungen des Leberproteoms von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät**

Mit Hilfe der Software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) wurden *in silico* Pathway-Analysen der signifikant differenziell abundanten Proteine für die Bedingungen SD und HFD nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung durchgeführt ( $p \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ). Hierbei wurden zuerst die jeweiligen Proteinennamen, ihre  $p$ -Werte und *fold changes* in die Software eingeladen und anschließend signifikant angereicherte *Pathways* im Datensatz basierend auf allen in der IPA-Datenbank annotierten Proteinen identifiziert. In Abbildung 4.11 sind die ersten zehn signifikanten kanonischen *Pathways* der Analyse für SD (A) und HFD (B) Tiere dargestellt. Angegeben ist zusätzlich der jeweilige  $p$ -Wert sowie das Verhältnis der im Datensatz als signifikant differenziell abundant identifizierten Proteine zu den insgesamt dem *Pathway* zugeordneten Proteine.

Bei der genauen Betrachtung der einzelnen *Pathways* ist zu erkennen, dass sowohl in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD als auch unter HFD viele Proteine mehreren *Pathways* zugeordnet werden. Bei SD-gefütterten Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung sind die *Pathways* *Thymine Degradation* und *Uracil Degradation II (Reductive)* sowie die *Pathways* *Glutathione-mediated Detoxification* und *Glutathione Redox Reactions I* redundant (Tabelle 4.2). Bei HFD-gefütterten Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung gibt es starke Überlappungen der *Pathways* *Glutathione-mediated Detoxification* und *Glutathione Redox Reactions I* sowie der *Pathways* *LXR/RXR Activation*, *FXR/RXR Activation* und *Atherosclerosis Signaling*. Weiterhin überlappen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten HFD Tieren die Proteine der *Pathways* *LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function* und *Xenobiotic Metabolism Signaling* stark und auch in den *Pathways* *Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)* und *Heparan Sulfate Biosynthesis* sind exakt dieselben Proteine enthalten (Tabelle 4.3)

**A SD + 3,5-T<sub>2</sub>****B HFD + 3,5-T<sub>2</sub>**

**Abbildung 4.11: Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p \leq 0,05$ ,  $fold\ change \geq |1,5|$ ) in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD (A) und HFD (B) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Es sind die zehn Pathways mit den kleinsten  $p$ -Werten (linke y-Achse) und die dazugehörigen Anzahlen identifizierter Proteine im Verhältnis zu den insgesamt im Pathway enthaltenen Proteinen (rechte y-Achse) aufgeführt. Auf der x-Achse ist der negative dekadische Logarithmus des  $p$ -Wertes dargestellt, wobei die gestrichelte Linie den Schwellenwert der Signifikanz kennzeichnet.**

**Tabelle 4.2: Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ) in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten SD-gefütterten Mäusen im Vergleich zur SD-Kontrollgruppe.** Es sind die zehn *Pathways* mit den kleinsten *p*-Werten und die dazugehörigen Ratios aus identifizierten Proteinen zu den insgesamt im *Pathway* enthaltenen Proteinen sowie die jeweils zugeordneten Proteine aufgeführt. Proteine mit erhöhter Abundanz sind rot gefärbt, während solche mit verringerter blau gefärbt sind.

<b>IPA-Pathway</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Ratio (identifiziert/ gesamt)</b>	<b>Zugeordnete Proteine</b>
<i>Thymine Degradation</i>	3,47E-04	2/2	UPB1, DPYD
<i>Uracil Degradation II (Reductive)</i>	3,47E-04	2/2	UPB1, DPYD
<i>Glutathione-mediated Detoxification</i>	4,47E-04	4/20	GSTM1, GSTM7, GSTP1, GSTT1
<i>Molybdenum Cofactor Biosynthesis</i>	1,02E-03	2/3	NFS1, GPHN
<i>TCA Cycle II (Eukaryotic)</i>	4,17E-03	3/18	IDH3A, SDHA, IDH3G
<i>Glutathione Redox Reactions I</i>	4,17E-03	3/18	GSTM7, GSTP1, GSTT1
<i>Mitotic Roles of Polo-Like Kinase</i>	5,25E-03	4/38	PPP2R4, HSP90B1, SMC1A, SMC3
<i>Intrinsic Prothrombin Activation Pathway</i>	5,75E-03	3/20	FGB, KLKB1, PROC
<i>Oleate Biosynthesis II (Animals)</i>	6,76E-03	2/7	CYB5A, FADS2
<i>Triacylglycerol Degradation</i>	1,07E-02	3/25	CES1E, PNLIP, MGLL

**Tabelle 4.3: Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ) in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten HFD-gefütterten Mäusen im Vergleich zur HFD-Kontrollgruppe.** Es sind die zehn *Pathways* mit den kleinsten *p*-Werten und die dazugehörigen Ratios aus identifizierten Proteinen zu den insgesamt im *Pathway* enthaltenen Proteinen sowie die jeweils zugeordneten Proteine aufgeführt. Proteine mit erhöhter Abundanz sind rot gefärbt, während solche mit verringerter blau gefärbt sind.

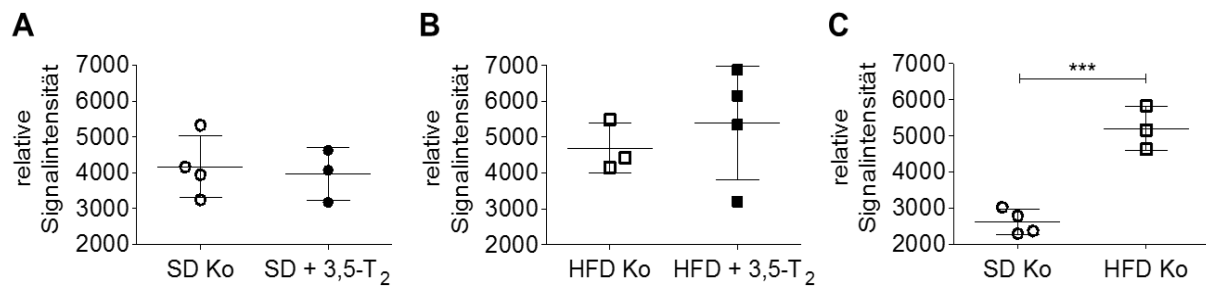
<b>IPA-Pathway</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Ratio (identifiziert/ gesamt)</b>	<b>Zugeordnete Protein</b>
<i>Glutathione-mediated Detoxification</i>	6,46E-08	7/20	GSTA3, GSTM1, GSTM2, GSTP1, MGST1, <b>GSTT1</b> , GSTA4
<i>Glutathione Redox Reactions I</i>	1,95E-05	5/18	PRDX6, GSTM2, GSTP1, MGST1, <b>GSTT1</b>
<i>LXR/RXR Activation</i>	3,80E-05	9/84	<b>APOB</b> , APOA2, APOH, <b>CYP51</b> , APOE, <b>FDFT1</b> , APOC4, TTR, ALB
<i>FXR/RXR Activation</i>	2,82E-04	8/86	<b>APOB</b> , APOA2, APOH, FBP1, APOE, APOC4, TTR, ALB
<i>LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function</i>	9,55E-04	10/155	GSTA3, GSTM1, GSTM2, <b>PAPSS2</b> , APOE, APOC4, GSTP1, MGST1, SULT1B1, SULT1C2
<i>Triacylglycerol Degradation</i>	1,35E-03	4/25	PRDX6, CES1E, PNLIP, <b>MGLL</b>
<i>Xenobiotic Metabolism Signaling</i>	1,62E-03	11/195	GSTA3, GSTM2, CES1E, <b>PTPN11</b> , GSTM1, CES1, GSTP1, SULT1B1, MGST1, <b>PPP2R2A</b> , SULT1C2
<i>Atherosclerosis Signaling</i>	2,88E-03	6/72	<b>APOB</b> , <b>PAFAH1B1</b> , APOA2, APOE, APOC4, ALB
<i>Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)</i>	4,27E-03	4/34	PRDX6, CES1E, SULT1B1, SULT1C2
<i>Heparan Sulfate Biosynthesis</i>	6,46E-03	4/38	PRDX6, CES1E, SULT1B1, SULT1C2

### 4.3.2 Ergebnisse der Western Blot-Analysen

Im Rahmen der Gallensäuren-Synthese, welche in dieser Arbeit von besonderem Interesse war, spielt CYP7A1 eine wichtige Rolle, da es den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt im Abbau von Cholesterol und der Synthese von Gallensäuren katalysiert. Da CYP7A1 in der Proteomanalyse der Lebergewebe aller experimentellen Bedingungen nicht detektiert werden konnte, sollte daher die relative Menge des Proteins mittels Western Blot-Analyse ermittelt werden.

Dazu wurden zunächst 30 µg Protein, welches mittels der TRIzol<sup>®</sup>-Methode aus den Lebergeweben präpariert wurde, durch eine 1D-SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Elektroblothing auf eine PVDF-Membran übertragen und die Zielproteine CYP7A1 und ACTB (β-Aktin) durch spezifische primäre Antikörper und nachfolgend durch einen fluoreszierenden sekundären Antikörper detektiert. Das Scannen der Membran und die Quantifizierung der Zielproteine erfolgte mit Hilfe des *Odyssey<sup>®</sup> CLx Imaging Systems* und der *Image Studio<sup>™</sup> 5.2 Software*. Die Fluoreszenzaufnahmen der Membranen sind im Anhang in Abbildung A-I dargestellt. Die erhaltenen Signalintensitäten für CYP7A1 wurden mit Hilfe des internen Standards ACTB normalisiert und die relativen Signalintensitäten anschließend mittels der Software *GraphPad Prism 5* statistisch unter Nutzung eines ungepaarten t-Tests ausgewertet (Abbildung 4.12). Die Berechnung der *fold changes* erfolgte unter Nutzung der Mittelwerte der jeweiligen zu vergleichenden Bedingungen. Für die einzelnen Gruppenvergleiche wurden jeweils separate Western Blot-Analysen durchgeführt ( $n = 3 - 4$ ).

Die statistische Auswertung der relativen CYP7A1-Signalintensitäten der Mäuse unter SD bzw. HFD ergab keinen signifikanten Unterschied der Mittelwerte der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 4.12 A + B). Dies spiegelt sich auch in den *fold changes* der einzelnen Vergleiche wider. Für den Vergleich SD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung vs. SD Kontrolle beträgt der *fold change* -1,05 und 3,5-T<sub>2</sub>-behandelte HFD Tiere weisen im Vergleich zu den Kontrolltieren einen *fold change* von 1,15 auf. Der Vergleich der gemittelten relativen Signalintensitäten der HFD Kontrollen mit den SD Kontrollen ergab jedoch einen signifikanten Unterschied ( $p \leq 0,001$ ). In HFD Kontrolltieren war die relative Gesamtmenge an CYP7A1 um 1,99-fach gegenüber den SD Kontrolltieren erhöht (Abbildung 4.12 C).



**Abbildung 4.12: Western Blot-Analyse von CYP7A1 in Lebergewebe von Kontroll- sowie 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD.** Dargestellt sind die normalisierten relativen Signalintensitäten von CYP7A1 im Verhältnis zu ACTB für die experimentellen Bedingungen „SD Kontrolle“ und „SD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung“ (A), „HFD Kontrolle“ und „HFD mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung“ (B) sowie „SD Kontrolle“ und „HFD Kontrolle“ (C). Für jede Gruppe ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung abgebildet. (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

#### 4.4 Vergleich der Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom und Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät

In diesem Teil der Arbeit sollten die Ergebnisse der Transkriptom- und Proteomanalysen zur Untersuchung der Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Leber von Mäusen unter Standard- (SD) und Hochfettdiät (HFD) verglichen werden. Dabei ist hervorzuheben, dass für beide OMICs-Analysen dieselben Tiere verwendet wurden, wobei für die Transkriptomanalysen drei biologische Replikate und für die Proteomanalysen ein zusätzliches viertes Replikat untersucht wurden.

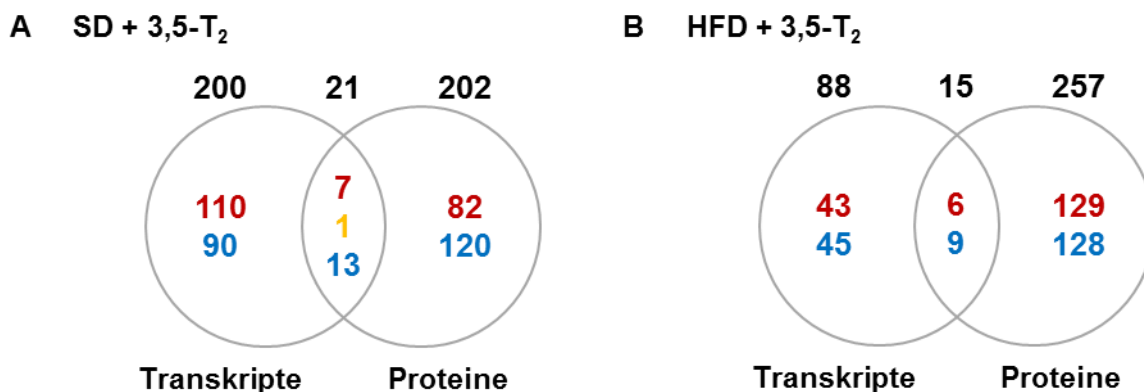
In der Transkriptomanalyse 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter SD konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt 221 signifikant differenziell exprimierte Gene detektiert werden ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Von diesen wiesen 118 Gene erhöhte und 103 verringerte mRNA-Mengen auf. In der korrespondierenden Proteomanalyse konnten 223 Proteine mit signifikant veränderter Abundanz in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden ( $p \leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Dabei traten 89 Proteine mit erhöhter und 134 Proteine mit verringerter Abundanz auf. Folglich konnten auf Transkript- und Protein-Ebene fast gleich viele Veränderungen beobachtet werden, wobei jedoch mehr Transkripte als Proteine mit erhöhter Menge nachgewiesen wurden. Umgekehrt wurden mehr Proteine als Transkripte mit verringerter Abundanz detektiert.

Im hepatischen Transkriptom von Mäusen unter HFD wurden durch die 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung insgesamt 103 Gene mit signifikant differenziellen mRNA-Mengen im Vergleich zu den HFD Tieren der Kontrollgruppe nachgewiesen ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Hierbei zeigten 49 Gene erhöhte und 54 verringerte Transkriptmengen. Die komplementäre Proteomanalyse der HFD-Mäuse führte zur Detektion von insgesamt 272 Proteinen mit signifikant veränderter

Abundanz nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung im Vergleich zur Kontroll-Bedingung ( $p \leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ). Davon wiesen 135 Proteine erhöhte und 137 verringerte Abundanzen auf. Demnach konnten in HFD Tieren deutlich mehr Veränderungen auf Protein- als auf mRNA-Ebene identifiziert werden, wobei jedoch der Anteil an Transkripten bzw. Proteinen mit erhöhten und verringerten Mengen jeweils hälftig war.

Zusammengefasst waren demnach in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD die Mengen von 221 Transkripten und 223 Proteinen signifikant verändert, während in HFD-Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung 103 Transkripte und 272 Proteine signifikant veränderte Mengen aufwiesen. Dies entspricht in SD-Mäusen einem Protein-zu-Transkript-Verhältnis von 1,01 und in HFD-Mäusen von 2,64. Damit war das Protein-zu-Transkript-Verhältnis in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD deutlich höher als in SD-Mäusen.

In SD-Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung wiesen insgesamt 423 Gene auf mindestens einer der beiden Ebenen der Expression (Transkript oder Protein) signifikante Veränderungen auf. Davon zeigten 21 Gene (4,96 %) sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikante Mengenveränderungen, während dies für jeweils 200 Gene (47,28 %) nur auf mRNA-Ebene und für 202 (47,75 %) nur auf Protein-Ebene der Fall war (Abbildung 4.13 A). Von den 21 auf beiden Ebenen signifikant differenziell exprimierten Genen wiesen 7 erhöhte und 13 verringerte Abundanzen auf, während genau ein Gen, namentlich die *Acyl-coenzyme A thioesterase 3 (Acot3/ACOT3)*, einander entgegengesetzte mRNA- und Proteinmengen zeigte (Tabelle 4.4).



**Abbildung 4.13: Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanter hepatischer Transkripte und Proteine in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD (A) und HFD (B) im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen.** Die insgesamt als differenziell abundant detektierten Transkripte bzw. Proteine sind in schwarzer, jene mit erhöhter Abundanz in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen in roter und jene mit verringerter in blauer Schrift dargestellt. Die gelbe Schrift kennzeichnet ein Transkript bzw. Protein mit entgegengesetzt veränderter Abundanz. Für Proteine:  $p \leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ; für Transkripte:  $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ .

**Tabelle 4.4: Transkripte und Proteine, die in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD sowohl im Transkriptom als auch im Proteom signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen.** Transkripte bzw. Proteine mit erhöhten Mengen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen sind rot gefärbt, während solche mit verringerten blau gefärbt sind. Grau hinterlegt sind jene Proteine, die durch die separate Auswertung solcher Proteine, die nicht in den Welch-Test einbezogen wurden, hinzugekommen sind. Bei diesen konnte kein *p*-Wert berechnet werden (N/D). Für Proteine: *p* ≤ 0,05 bzw. Standardabweichung ≥ 2, *fold change* ≥ |1,5|; für Transkripte: *p*(FDR) ≤ 0,05, *fold change* ≥ |1,5|.

NCBI Gen-Symbol	Affymetrix sequence code	UniProt Protein ID	Genprodukt	Transkript- menge <i>fold change</i>	t-Test <i>p</i> (FDR)- Wert	Protein- menge <i>fold change</i>	Welch- Test <i>p</i> -Wert
<i>Slc22a7</i>	10451291	Q91WU2	Solute carrier family 22 member 7	<b>6,20</b>	3,95E-13	<b>26,62</b>	N/D
<i>Vnn1</i>	10362138	Q9Z0K8	Pantetheinase	<b>2,67</b>	1,48E-03	<b>3,44</b>	9,53E-04
<i>Acot3</i>	10397158	Q9QYR7	Acyl-coenzyme A thioesterase 3	<b>2,34</b>	7,86E-03	<b>-2,73</b>	4,36E-02
<i>Acss3</i>	10372208	Q14DH7	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial	<b>2,22</b>	3,50E-03	<b>2,15</b>	N/D
<i>Paqr9</i>	10587871	Q6TCG2	Progesterin and adiponectin receptor family member 9	<b>2,16</b>	4,87E-07	<b>8,25</b>	2,74E-02
<i>Papss2</i>	10462507	O88428	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	<b>1,77</b>	1,35E-02	<b>2,49</b>	5,72E-03
<i>Mgl1</i>	10539894	O35678	Monoglyceride lipase	<b>1,76</b>	2,72E-02	<b>2,31</b>	2,44E-02
<i>Idh3a</i>	10585417	Q9D6R2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	<b>1,69</b>	1,00E-05	<b>2,02</b>	8,44E-04
<i>Gstm1</i>	10501229	P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	<b>-1,62</b>	5,50E-04	<b>-3,93</b>	4,56E-04
<i>Uox</i>	10496825	P25688	Uricase	<b>-1,62</b>	6,03E-03	<b>-2,00</b>	3,14E-02
<i>Gstm6</i>	10501208	O35660	Glutathione S-transferase Mu 6	<b>-1,66</b>	6,60E-04	<b>-1,98</b>	2,58E-02
<i>Hnmt</i>	10480459	Q91VF2	Histamine N-methyltransferase	<b>-1,72</b>	5,44E-08	<b>-2,16</b>	7,94E-03
<i>Gstp1</i>	10464583	P19157	Glutathione S-transferase P 1	<b>-1,73</b>	4,09E-02	<b>-2,79</b>	6,19E-03
<i>Ugp2</i>	10384579	Q91ZJ5	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<b>-1,76</b>	5,60E-04	<b>-1,79</b>	2,65E-02

## Ergebnisse

<i>Car8</i>	10511429	P28651	Carbonic anhydrase-related protein	<b>-1,90</b>	1,00E-05	<b>-2,69</b>	4,82E-03
<i>Cyp2c37</i>	10463043	P56654	Cytochrome P450 2C37	<b>-1,96</b>	1,29E-02	<b>-1,96</b>	4,86E-02
<i>Inmt</i>	10544932	P40936	Indolethylamine N-methyltransferase	<b>-2,23</b>	2,50E-04	<b>-2,06</b>	4,52E-03
<i>Ddah1</i>	10496727	Q9CWS0	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	<b>-2,81</b>	2,80E-02	<b>-4,98</b>	3,64E-02
<i>Gsta1</i>	10587323	P13745	Glutathione S-transferase A1	<b>-5,13</b>	1,20E-04	<b>-4,17</b>	3,86E-02
<i>Cyp4a12a</i>	10507143	Q91WL5	Cytochrome P450 4A12A	<b>-5,33</b>	1,12E-03	<b>-14,74</b>	3,81E-03
<i>Etnppl</i>	10496077	Q8BWU8	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase	<b>-5,69</b>	3,95E-13	<b>-24,57</b>	2,30E-03

In 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD zeigten insgesamt 360 Gene auf mindestens einer Ebene der Expression signifikante Veränderungen. Davon waren 15 (4,17 %) sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikant verändert, während jeweils 88 (24,44 %) nur auf mRNA-Ebene und 257 (71,39 %) nur auf Protein-Ebene signifikante Veränderungen der Expression aufwiesen (Abbildung 4.13 B). Von den 15 Genen, die sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikant differenzielle Expression zeigten, wiesen 6 erhöhte und 9 verringerte Mengen auf (Tabelle 4.5).

Die komplette tabellarische Übersicht der Transkripte bzw. Proteine, die in SD und HFD unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung signifikant unterschiedliche Mengen aufwiesen ist im Anhang in Tabelle A-III zu finden. Dabei sind Gene die auf beiden Ebenen signifikante differenzielle Expression zeigen besonders hervorgehoben.

**Tabelle 4.5: Transkripte und Proteine, die in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD sowohl im Transkriptom als auch im Proteom signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen.** Transkripte bzw. Proteine mit erhöhten Mengen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten im Vergleich zu Kontroll-Mäusen sind rot gefärbt, während solche mit verringerten blau gefärbt sind. Grau hinterlegt sind jene Proteine, die durch die separate Auswertung solcher Proteine, die nicht in den Welch-Test einbezogen wurden, hinzugekommen sind. Bei diesen konnte kein *p*-Wert berechnet werden (N/D). Für Proteine:  $p \leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ; für Transkripte:  $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ .

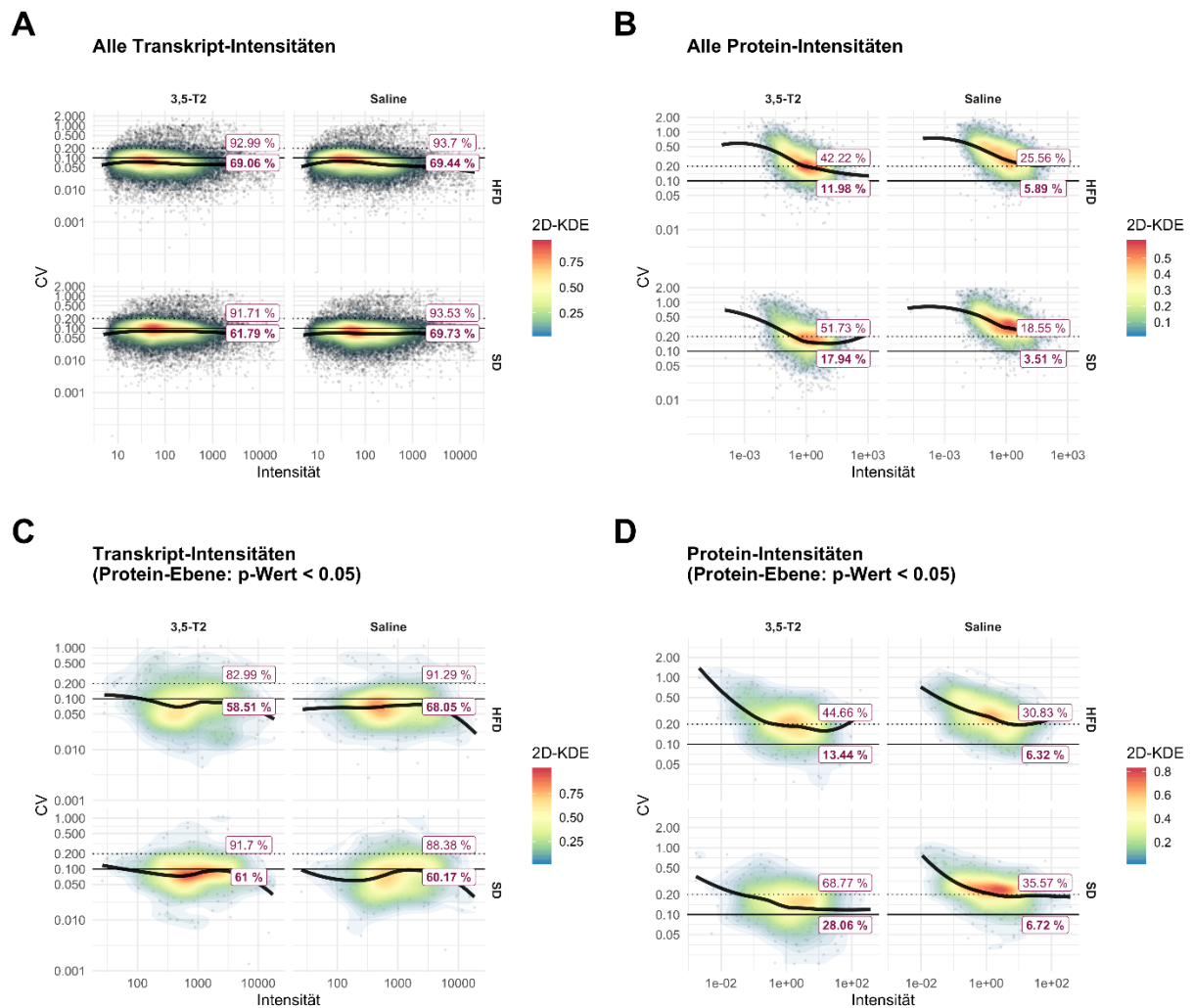
NCBI Gen-Symbol	Affymetrix sequence code	UniProt Protein ID	Genprodukt	Transkriptmenge <i>fold change</i>	t-Test <i>p</i> (FDR)-Wert	Proteinmenge <i>fold change</i>	Welch-Test <i>p</i> -Wert
<i>Slc22a7</i>	10451291	Q91WU2	Solute carrier family 22 member 7	<b>5,34</b>	9,87E-13	<b>100,00</b>	N/D

<i>Cyp17a1</i>	10468239	P27786	Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase	<b>3,50</b>	5,10E-04	<b>20,87</b>	4,69E-04
<i>Idi1</i>	10403413	P58044	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	<b>3,21</b>	8,51E-07	<b>2,67</b>	1,32E-02
<i>Cyp39a1</i>	10445308	Q9JKJ9	24-hydroxy-cholesterol 7-alpha-hydroxylase	<b>2,85</b>	1,60E-06	<b>13,83</b>	4,25E-02
<i>Cyp51</i>	10527920	Q8K0C4	Lanosterol 14-alpha demethylase	<b>2,78</b>	4,64E-06	<b>5,36</b>	2,46E-02
<i>Dio1</i>	10514912	Q61153	Type I iodothyronine deiodinase	<b>2,74</b>	1,58E-09	<b>2,76</b>	2,25E-02
<i>Uox</i>	10496825	P25688	Uricase	<b>-1,53</b>	1,04E-02	<b>-1,72</b>	1,86E-02
<i>Sult1b1</i>	10531087	Q9QWG7	Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	<b>-1,74</b>	3,05E-03	<b>-2,23</b>	3,80E-04
<i>Mug2</i>	10541426	P28666	Murinoglobulin -2	<b>-1,79</b>	8,91E-03	<b>-2,02</b>	1,16E-02
<i>Gsta4</i>	10587315	P24472	Glutathione S-transferase A4	<b>-1,95</b>	7,00E-05	<b>-3,81</b>	3,54E-03
<i>Inmt</i>	10544932	P40936	Indolethylamine N-methyltransferase	<b>-2,76</b>	1,48E-03	<b>-2,90</b>	2,87E-04
<i>Ddah1</i>	10496727	Q9CWS0	Dimethyl-arginine dimethyl-amino-hydrolase 1	<b>-2,77</b>	2,53E-02	<b>-3,59</b>	1,40E-03
<i>Etnppl</i>	10496077	Q8BWU8	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase	<b>-3,42</b>	3,03E-03	<b>-16,36</b>	2,37E-04
<i>Hsd17b6</i>	10373334	Q9R092	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6	<b>-3,48</b>	1,07E-03	<b>-34,42</b>	8,72E-03
<i>Gsta1</i>	10587323	P13745	Glutathione S-transferase A1	<b>-4,14</b>	2,59E-07	<b>-4,75</b>	1,33E-02

In den Transkriptom- und Proteomanalysen der SD- und HFD-Mäuse unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung gab es jeweils nur einen geringen Anteil an Genen, die auf beiden Analyse-Ebenen signifikante Veränderungen aufwiesen (4,96 % in SD- und 4,17 % in HFD-Mäusen). Daher sind diese Ergebnisse nicht sehr kongruent. Dies könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass Gene, welche auf mRNA-Ebene signifikant veränderte Expression zeigten, auf Protein-Ebene durch eine zu geringe Abundanz oder technische Gründe in der

massenspektrometrischen Analyse gar nicht bzw. nicht in drei Replikaten pro Gruppe detektiert werden konnten. Die Überprüfung jener Gene ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ) ergab, dass in SD-Mäusen von den 200 exklusiv auf mRNA-Ebene als differenziell exprimiert detektierten Genen tatsächlich 170 (85,00 %) nicht auf Protein-Ebene detektiert werden konnten. In HFD-Mäusen konnten entsprechend von 88 exklusiv auf mRNA-Ebene als differenziell exprimiert detektierten Genen 75 (85,23 %) nicht auf Protein-Ebene detektiert werden. Daher kann hier die geringe Kongruenz der Proteom- mit den Transkriptom-Ergebnissen tatsächlich weitestgehend durch die fehlende Detektion der Proteine erklärt werden.

Andererseits konnte diese Erklärung jedoch nicht umgekehrt für in der Menge signifikant veränderte Proteine ohne korrespondierende Veränderungen auf Transkript-Ebene angewendet werden, da die Sonden der verwendeten Microarrays nahezu alle Gene des murinen Transkriptoms abdeckten. Um technische Gründe als Ursache für die fehlende Übereinstimmung der Daten auszuschließen, wurden die Variationskoeffizienten (englisch: *coefficient of variation* (CV), Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert) der Intensitätswerte aus den Transkriptom- und Proteomanalysen für alle Bio-Replikate der vier experimentellen Gruppen bestimmt (Abbildung 4.14). Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass die Varianz zwischen den einzelnen Proben innerhalb einer experimentellen Gruppe im gesamten Proteom-Datensatz deutlich größer ist als im gesamten Transkriptom-Datensatz (Abbildung 4.14 A + B). Dies deutet darauf hin, dass zwischen den einzelnen Messungen der Proteomanalysen größere biologische und technische Differenzen vorliegen als zwischen den Messungen der Transkriptomanalysen. Die gleichen Ergebnisse konnten beobachtet werden, als die Analyse auf jene Transkripte bzw. Proteine begrenzt wurde, die nur auf Protein-Ebene nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung signifikante Veränderungen aufwiesen (Abbildung 4.14 C + D). Daher konnte die relativ hohe Zahl an Genen, die ausschließlich auf Protein-Ebene veränderte Abundanzen aufwiesen, nicht auf inhomogene interindividuelle Transkriptmengen innerhalb der experimentellen Behandlungsgruppen zurückgeführt werden.



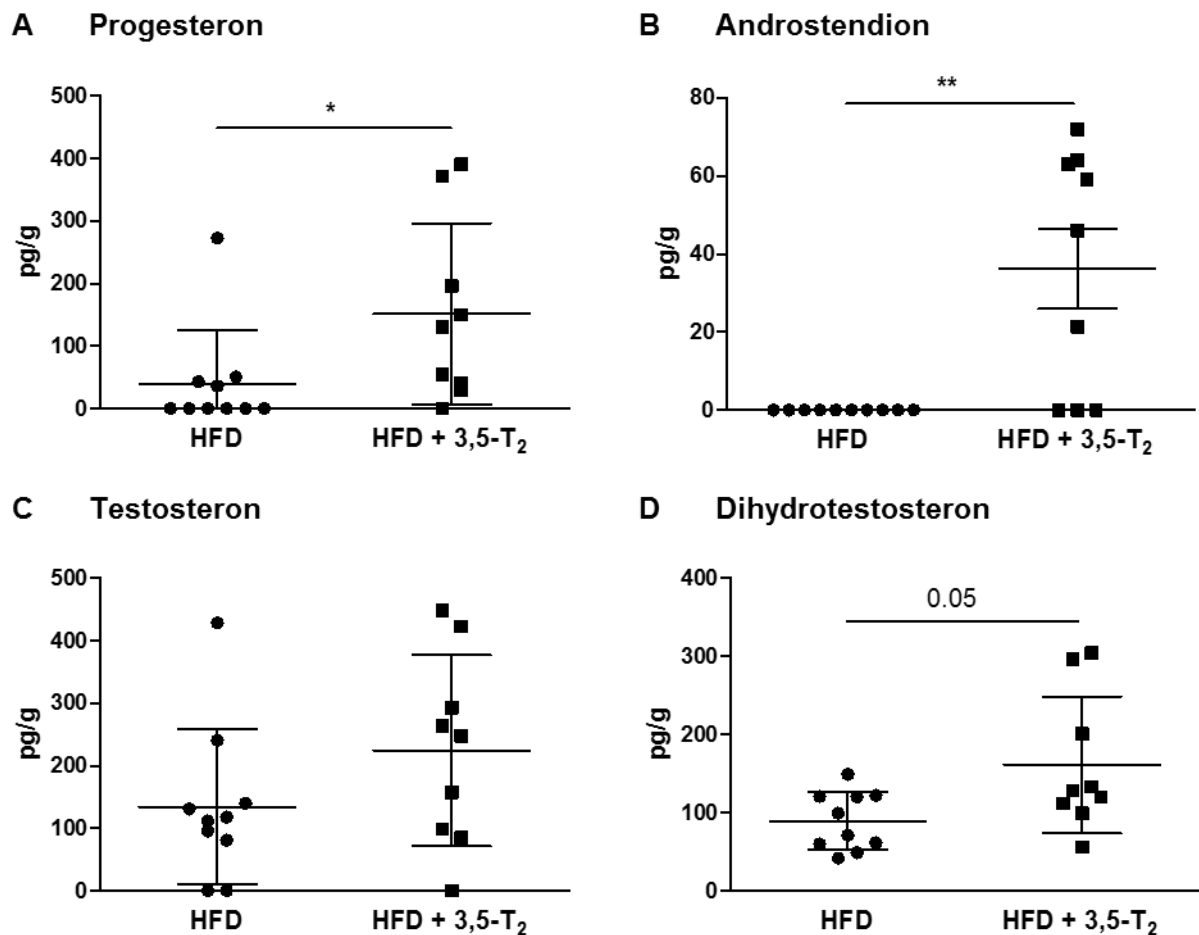
**Abbildung 4.14:** Graphen, welche den Zusammenhang zwischen Transkript- und Protein-Intensitäten (x-Achse) und den jeweiligen Variationskoeffizienten (CV, y-Achse) für alle Bio-Replikate der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten und Kontroll (Saline)-Mäuse unter SD und HFD darstellen. Die zweidimensionale Kerndichteschätzung (2D-KDE) ist mit einem mehrfarbigen Gradienten angegeben. Dabei entspricht eine rote Fläche einer hohen Dichte an Datenpunkten, während eine blaue Fläche eine geringe Dichte anzeigt. Die dicke schwarze Linie, welche über die 2D-KDE-Punktwolke gezeichnet ist, repräsentiert die Loess-Regression (Spanne = 0,75) über die Punktwolke. Die gepunktete und die dünne, durchgezogene horizontale schwarze Linie stellt einen CV von 0,2 bzw. 0,1 dar. Der prozentuale Anteil an Datenpunkten, die einen CV < 0,2 (normale lila Schrift) und < 0,1 (fette lila Schrift) im Verhältnis zu allen Datenpunkten des jeweiligen Graphen aufweisen, ist in lila umrandeten Boxen angegeben. Dargestellt sind die jeweiligen CVs für alle Transkript- bzw. Protein-Intensitäten (A bzw. B) sowie für die Transkript- und Proteinintensitäten jener Gene, deren Expression auf Protein-Ebene nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung signifikant verändert war (C bzw. D).

#### **4.5 Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf Sexualhormon-Spiegel in verschiedenen Geweben**

Da in der Proteomanalyse ein Einfluss von 3,5-T<sub>2</sub> auf Enzyme der Sexualhormon-Biosynthese beobachtet werden konnte, sollte in diesem Teilprojekt überprüft werden, ob auch auf metabolischer Ebene Effekte auf die Sexualhormon-Spiegel auftreten. Dazu wurden die Sexualhormon-Konzentrationen von Progesteron, Androstendion, Testosteron und Dihydrotestosteron in Lebergewebe, Serum sowie inguinalem und gonadalem weißem Fettgewebe (WAT) von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD sowie den entsprechenden Kontrolltieren untersucht. Diese Analysen wurden von Andreas Landin und Prof. Claes Ohlsson in der Abteilung Innere Medizin der Sahlgrenska Akademie an der Universität Göteborg in Schweden durchgeführt.

Infolge der 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung waren in der Leber 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter HFD ( $n = 9 - 10$ ) im Durchschnitt die Konzentrationen aller vier Sexualhormone erhöht, wobei allerdings nur jene von Progesteron und Androstendion statistische Signifikanz zeigten (Abbildung 4.15 A + B). Während die Konzentrationen von Testosteron keine statistisch signifikanten Änderungen zeigten, wiesen jene von Dihydrotestosteron einen  $p$ -Wert von exakt 0,05 auf und verfehlten somit knapp die statistische Signifikanz (Abbildung 4.15 C + D). Diese Effekte konnten nicht in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD beobachtet werden. Die Sexualhormone Estradiol und Estron konnten in den Lebern der männlichen Mäuse nicht detektiert werden.

Im Serum von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD konnten keine signifikanten Veränderungen der Sexualhormon-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrolltieren detektiert werden (Tabelle 4.6). Im inguinalen WAT waren nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung in Mäusen unter HFD die Konzentrationen von Progesteron signifikant erhöht, während sich im gonadalen WAT ein ähnlicher Trend andeutete. Die Konzentrationen von Androstendion, Testosteron und Dihydrotestosteron wiesen sowohl im inguinalen als auch im WAT keine signifikanten Veränderungen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung auf (Tabelle 4.6).



**Abbildung 4.15:** Konzentrationen der Sexualhormone Progesteron (A), Androstendion (B), Testosteron (C) und Dihydrotestosteron (D) in Lebergewebe von Kontroll- und 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD. Die Daten sind als Einzelwerte und jeweiliger Mittelwert  $\pm$  Standardfehler ( $n = 9 - 10$ ) dargestellt. (\*)  $p \leq 0,05$ , (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

**Tabelle 4.6:** Sexualhormon-Konzentrationen im Serum sowie inguinalem und gonadalem weißen Fettgewebe (WAT) von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $n = 4 - 5$ ) dargestellt. (\*)  $p \leq 0,05$ .

Serum / Gewebe	Sexualhormon	Kontrolle	3,5-T <sub>2</sub>
Serum	Progesteron (pg / ml)	535 $\pm$ 263	566 $\pm$ 179
	Androstendion (pg / ml)	12,9 $\pm$ 1,9	36,3 $\pm$ 23,7
	Testosteron (pg / ml)	205 $\pm$ 36	926 $\pm$ 770
	Dihydrotestosteron (pg / ml)	18,7 $\pm$ 1,8	48 $\pm$ 30,4
Inguinales WAT	Progesteron (pg / g)	2955 $\pm$ 427	6482 $\pm$ 541 *
	Androstendion (pg / g)	661 $\pm$ 161	802 $\pm$ 152
	Testosteron (pg / g)	5487 $\pm$ 2687	5957 $\pm$ 870
	Dihydrotestosteron (pg / g)	552 $\pm$ 152	845 $\pm$ 121
Gonadales WAT	Progesteron (pg / g)	5982 $\pm$ 1026	8327 $\pm$ 1310

---

Androstendion (pg / g)	1129 ± 262	1220 ± 207
Testosteron (pg / g)	6387 ± 2712	7070 ± 1087
Dihydrotestosteron (pg / g)	934 ± 328	1476 ± 322

---

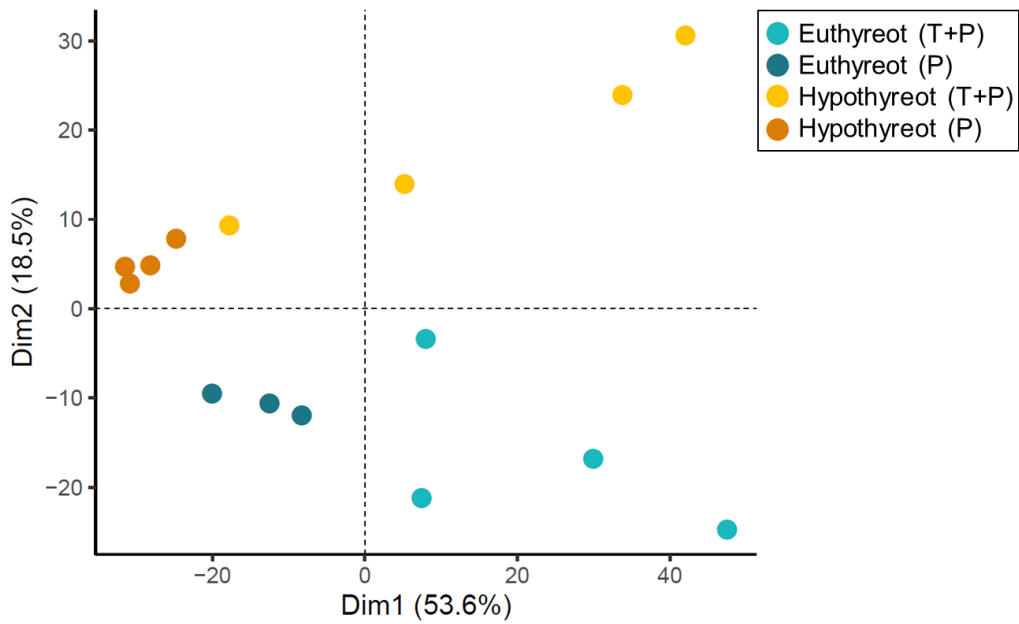
#### 4.6 Wirkungen von Hypo- und Hyperthyreose auf das hepatische Proteom von Mäusen

Neben den Analysen zu Wirkungen der TH-Metabolite 3-T<sub>1</sub>AM und 3,5-T<sub>2</sub> sollten in dieser Arbeit auch Untersuchungen zu dem klassischen TH T<sub>4</sub> durchgeführt werden. Genauer gesagt wurde das Leber-Proteom von Mäusen mit Hypo- und Hyperthyreose im Vergleich zu euthyreoten Mäusen analysiert. Für diese Proteomanalysen wurden zum Teil Proben genutzt, die bereits für die Analyse der hepatischen Transkriptome unter diesen experimentellen Bedingungen im Rahmen der bereits erwähnten Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) verwendet wurden. Für die Proteomanalysen wurden jeweils sieben Bio-Replikate für die euthyreote Gruppe, acht Bio-Replikate für die hypothyreote Gruppe und neun Bio-Replikate für die hyperthyreote Gruppe eingesetzt, während in der korrespondierenden Transkriptomanalyse pro Gruppe jeweils nur vier derselben Bio-Replikate untersucht wurden.

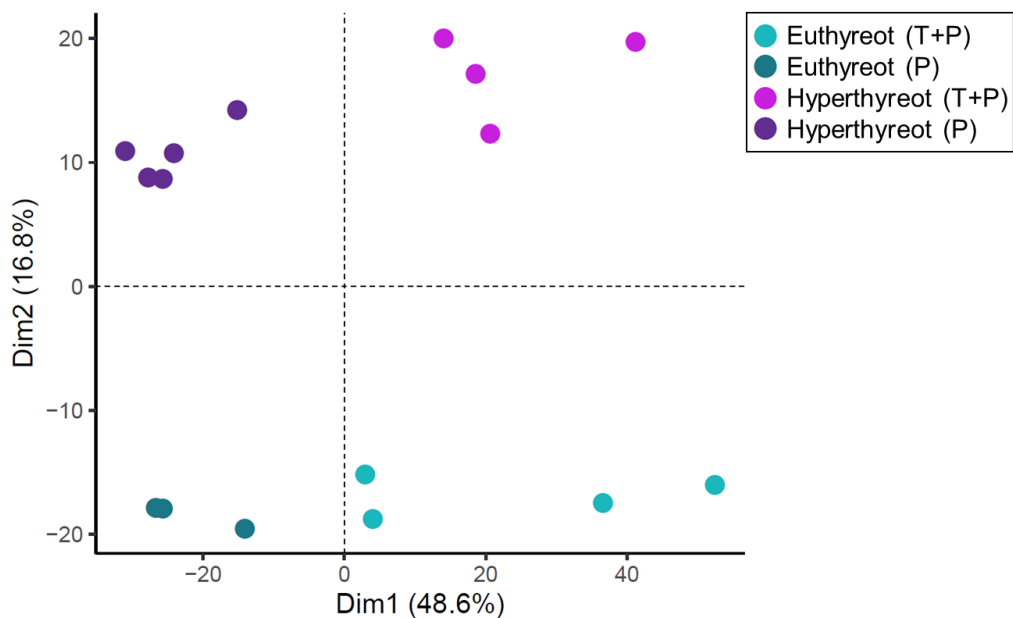
Da für die Proteomanalysen teilweise dieselben Leberproben wie für die Transkriptomanalysen im Rahmen der Masterarbeit untersucht wurden, lagen für diese bereits mittels der Trizol<sup>®</sup>-Methode präparierte Proteine vor. Für die in den Proteomanalysen zusätzlich untersuchten Proben wurden den Tieren zunächst nach deren Tötung die Lebern entnommen und die Proteine anschließend ebenfalls mittels der Trizol<sup>®</sup>-Methode präpariert. Dabei wurde nach der Phasentrennung die erhaltene organische Phase zur Protein-Präparation genutzt. Nachfolgend wurden die Proteinkonzentration bestimmt und 4 µg Protein pro Probe proteolytisch mit Trypsin verdaut. Nach Entsalzung und Aufreinigung der erhaltenen Peptide mittels C18-Material wurden diese massenspektrometrisch an einem Q Exactive<sup>™</sup> Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer analysiert. Die Peptid- und Protein-Identifizierung erfolgte mit Hilfe der Software *MaxQuant 1.6.0.16* und einer integrierten Andromeda-Suche gegen eine murine UniProt/Swiss-Prot Datenbank. Die Software *GeneData Analyst 10.0.3* wurde zur relativen Quantifizierung der LFQ-Proteinintensitäten und zur anschließenden statistischen Auswertung genutzt.

Da die Aufarbeitung der Proben für die beiden Vergleiche der experimentellen Bedingungen hypothyreot vs. euthyreot und hyperthyreot vs. euthyreot zeitlich voneinander getrennt stattfand, erfolgte die Auswertung der beiden Gruppenvergleiche separat voneinander. In der visuellen Inspektion der Chromatogramme unter Nutzung der Xcalibur<sup>™</sup> Software wurden alle Proben als qualitativ gut eingestuft, sodass keine der Proben als Ausreißer ausgeschlossen werden musste.

In der Proteomanalyse der 15 Proben des Vergleichs hypothyreoter vs. euthyreoter Mäuse konnten insgesamt 2910 nicht-redundante Proteine identifiziert werden. Davon konnten 1305 Proteine in allen 15 untersuchten Proben detektiert werden. Für den Vergleich hyperthyreoter vs. euthyreoter Mäuse konnten in der Proteomanalyse der 16 Proben insgesamt 3134 nicht-redundante Proteine identifiziert werden. Von diesen wiederum wurden 1486 Proteine in allen 16 analysierten Proben detektiert. Die Intensitätswerte jener Proteine, die in allen Proben detektiert werden konnten, wurden anschließend für die Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) genutzt. Damit sollten einerseits potenzielle biologische oder technische Varianzen der Daten von Tieren derselben experimentellen Bedingung und andererseits Unterschiede zwischen den beiden zu vergleichenden Bedingungen infolge des Schilddrüsenstatus aufgezeigt werden. In Abbildung 4.16 ist die PCA des Vergleichs hypothyreoter vs. euthyreoter Mäuse und in Abbildung 4.17 die PCA des Vergleichs hyperthyreoter vs. euthyreoter Mäuse dargestellt. In beiden PCAs wurde die erste gegen die zweite Hauptkomponente aufgetragen, wobei in der zweiten Hauptkomponente eine klare Aufteilung der Proben nach ihrer Gruppenzugehörigkeit in euthyreote (türkis), hypothyreote (gelb) und hyperthyreote (lila) Tiere zu erkennen ist. Jedoch fällt auch auf, dass die Proben aller Gruppen in der ersten Hauptkomponente stark streuen. Hier ist eine Auftrennung der Proben zu erkennen, welche der Verwendung der Proben für die Transkriptomanalysen (helle Färbung) und den zusätzlich für die Proteomanalysen aufgearbeiteten Proben (dunklere Färbung) entspricht. Dies kann neben dem Aufarbeitungszeitpunkt auch darauf zurückzuführen sein, dass die Proben aller Gruppen je aus 2 separat durchgeführten Tierversuchen stammen, welche aber unter exakt denselben experimentellen Bedingungen stattfanden. Die Auftrennung der Proben innerhalb der Gruppen kann auch ein Grund für die relativ geringe Zahl der in allen Proben identifizierten Proteine in den Vergleichen hypothyreoter bzw. hyperthyreoter vs. euthyreoter Mäuse sein.



**Abbildung 4.16: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der hepatischen Proteomprofile euthyreoter und hypothyreoter Mäuse.** Dargestellt sind jeweils sieben Bio-Replikate euthyreoter (türkis) und acht hypothyreoter Mäuse (gelb), wobei die dunklere Färbung Proben kennzeichnet, die nur für die Proteomanalysen präpariert wurden (P), während die hellere Färbung Proben entspricht, die ebenfalls für Transkriptomanalysen (T+P) verwendet wurden. Aufgetragen ist die zweite gegen die erste Dimension.



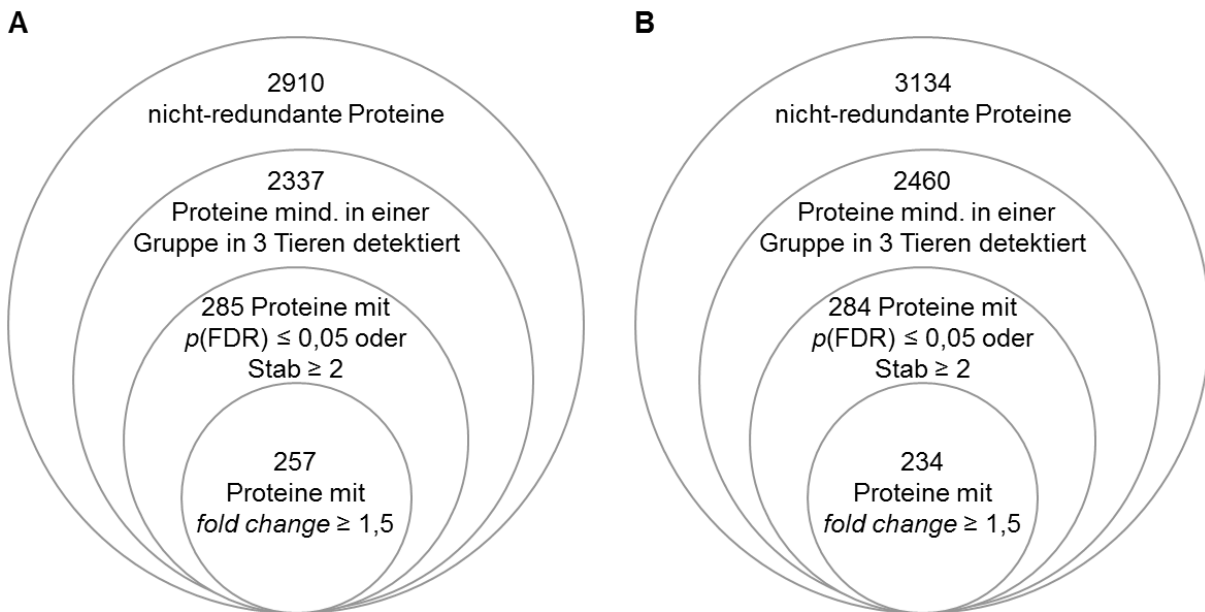
**Abbildung 4.17: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der hepatischen Proteomprofile euthyreoter und hyperthyreoter Mäuse.** Dargestellt sind jeweils sieben Bio-Replikate euthyreoter (türkis) und neun hyperthyreoter Mäuse (lila), wobei die dunklere Färbung Proben kennzeichnet, die nur für die Proteomanalysen präpariert wurden (P), während die hellere Färbung Proben entspricht, die ebenfalls für Transkriptomanalysen (T+P) verwendet wurden. Aufgetragen ist die zweite gegen die erste Dimension.

Für die statistische Auswertung mittels Welch-Test und anschließender multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg wurden nur Proteine berücksichtigt, die in mindestens drei der sieben, acht bzw. neun Tiere in beiden zu vergleichenden Gruppen detektiert wurden. Daher wurden im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse insgesamt 2093 Proteine und im Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse insgesamt 2177 Proteine mittels Welch-Test analysiert. Von diesen wiesen im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse 183 Proteine und im Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse 180 Proteine einen signifikanten  $p(\text{FDR})$ -Wert  $\leq 0,05$  auf. Davon wiederum wiesen 167 Proteine im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse und 145 Proteine im Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse einen  $\text{fold change} \geq |1,5|$  auf. Da Proteine, die nur in einer der beiden zu vergleichenden experimentellen Bedingungen in mindestens drei Tieren detektiert wurden, nicht im Welch-Test berücksichtigt wurden, fand anschließend eine separate Auswertung dieser Proteine statt. Daher wurde für den Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse von 244 Proteinen und für den Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse von 283 Proteinen die 2-fache Standardabweichung der LFQ-Intensitätswerte berechnet. Wenn diese größer oder kleiner als der LFQ-Intensitäts-Mittelwert der zu vergleichenden Gruppe, in welcher das Protein nicht in mindestens drei Tieren detektiert wurde, war, wurde das Protein als signifikant verändert klassifiziert. Für Proteine, welche in einer der beiden Gruppen überhaupt nicht detektiert werden konnten, wurde der  $\text{fold change}$  auf ein Maximum von  $|100|$  gesetzt. Durch die separate Auswertung wurden für den Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse 90 zusätzliche Proteine und für den Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse 89 zusätzliche Proteine mit einer Standardabweichung  $\geq 2$  und einem  $\text{fold change} \geq |1,5|$  identifiziert. Folglich konnten für den Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse insgesamt 257 Proteine und für den Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse insgesamt 234 Proteine mit  $p(\text{FDR})$ -Wert  $\leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$  und  $\text{fold change} \geq |1,5|$  als signifikant verändert identifiziert werden (Abbildung 4.18). Diese Proteine wurden dann in der sich anschließenden funktionellen Analyse genauer untersucht.

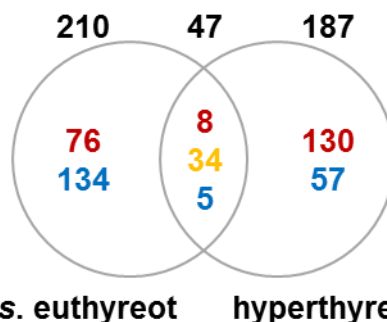
Von den 257 Proteinen, die im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse signifikant differenziell abundant waren, wiesen 103 Proteine erhöhte und 154 Proteine verringerte Abundanzen auf. Der Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse ergab 234 Proteine mit signifikant veränderter Abundanz, von denen 153 erhöhte und 81 verringerte Mengen aufwiesen. Ein Vergleich der signifikant differenziell abundanten Proteine der hypo- und hyperthyreoten Mäuse jeweils im Vergleich zu den euthyreoten Kontroll-Mäusen ergab, dass 47 Proteine in beiden Bedingungen unterschiedliche Abundanzen zeigten ( $p(\text{FDR})$ -Wert  $\leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Von diesen 47 Proteinen wiesen 13 Mengenveränderungen in die gleiche Richtung auf, während die Mengen von 34 Proteinen entgegengesetzte Effektrichtungen unter hypo- und hyperthyreoten Bedingungen im

Vergleich zur euthyreoten Kontrollgruppe aufwiesen. Entsprechend zeigten 210 bzw. 187 Proteine Schilddrüsenstatus-spezifische Effekte, da sie nur unter hypothyreoten bzw. hyperthyreoten Bedingungen signifikante Mengenveränderungen zeigten (Abbildung 4.19).

Eine komplette tabellarische Übersicht aller signifikant differenziell abundanten Proteine in den Vergleichen hypothyreote vs. euthyreote und hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse ist im Anhang in Tabelle A-IV zu finden.



**Abbildung 4.18: Anzahl detektierter Proteine in den Proteomanalysen hypo-, eu- und hyperthyreoter Mäuse.** Für die Vergleiche hypothyreote vs. euthyreote (A) und hyperthyreote vs. euthyreote (B) Mäuse sind die Anzahl detektierter nicht-redundanter Proteine, solcher die in mindestens einer Gruppe in mindestens 3 Tieren detektiert wurden sowie die Zahlen signifikant differenziell abundanten Proteine (Welch-Test:  $p(\text{FDR}) \leq 0,05$  oder Standardabweichung (Stab)  $\geq 2$ ;  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ) dargestellt.



**hypothyreot vs. euthyreot      hyperthyreot vs. euthyreot**

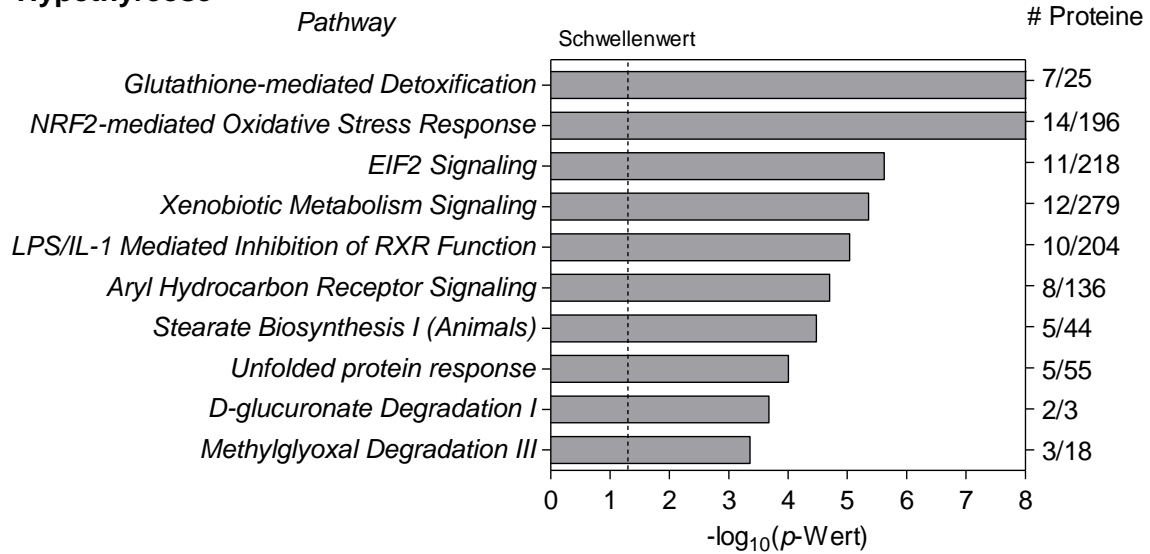
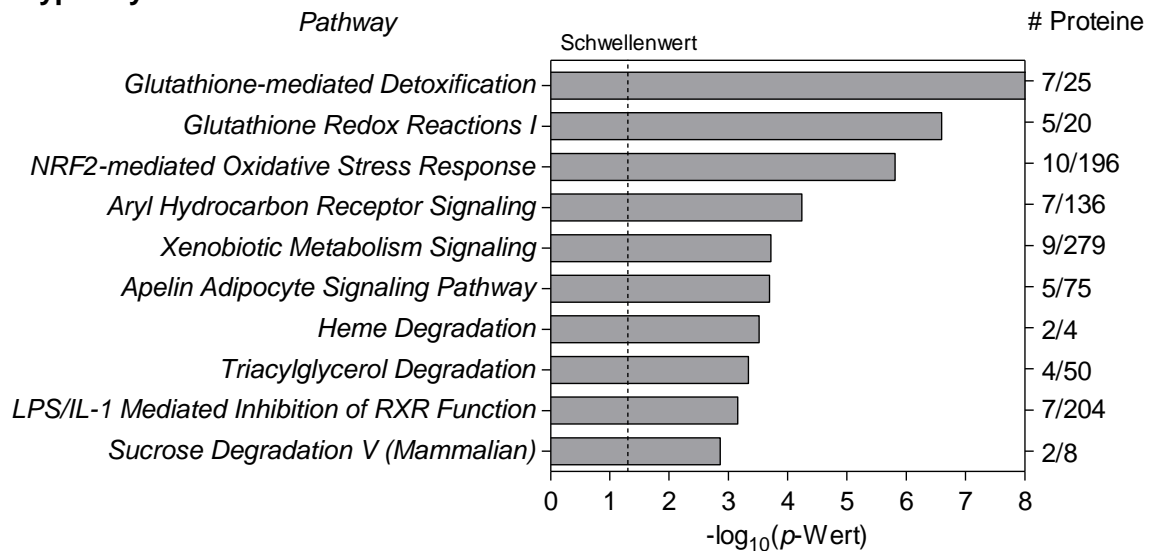
**Abbildung 4.19: Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanten hepatischer Proteine in hypo- und hyperthyreoten Mäusen im Vergleich zur jeweiligen euthyreoten Kontrollgruppe.** Die insgesamt als differenziell abundant detektierten Proteine sind in schwarzer, jene mit erhöhter Abundanz in hypo- oder hyperthyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen in roter und jene mit verringerter in blauer Schrift dargestellt. Die gelbe Schrift kennzeichnet Proteine mit entgegengesetzt

veränderter Abundanz zwischen hypo- und hyperthyreoten Mäusen.  $p(\text{FDR}) \leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ .

#### 4.6.1 **Pathway-Analysen von Hypo- und Hyperthyreose-induzierten Veränderungen des Leberproteoms von Mäusen**

Für jene Proteine, die in den Vergleichen hypo- bzw. hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse signifikant differenzielle ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ) Abundanzen aufwiesen wurden im Anschluss mit Hilfe der Software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) *in silico*-Pathway-Analysen durchgeführt. Dazu wurden zunächst die jeweiligen Proteinnamen sowie die dazugehörigen *p*-Werte und *fold changes* in die Software eingeladen. Anschließend wurden signifikant angereicherte *Pathways* im Datensatz auf Grundlage aller in der IPA-Datenbank annotierten murinen Proteine identifiziert. In Abbildung 4.20 sowie Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8 sind die ersten zehn *Pathways* dieser Analyse für die Vergleiche hypothyreote vs. euthyreote und hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse dargestellt. Außerdem aufgeführt sind der jeweilige *p*-Wert sowie das Verhältnis der als signifikant verändert identifizierten Proteine im Datensatz zu den insgesamt im *Pathway* beinhalteten Proteinen.

Bei der genaueren Betrachtung der einzelnen *Pathways* fällt auf, dass in den Vergleichen hypo- bzw. hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse jeweils viele Proteine in mehreren *Pathways* vertreten sind. Im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse sind dies vor allem die Proteine GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM6, GSTA1 und MGST3, welche neben weiteren Proteinen den *Pathways* *Glutathione-mediated Detoxification*, *NRF2-mediated Oxidative Stress Response*, *Xenobiotic Metabolism Signaling*, *LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function* und *Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling* zugeordnet sind. Auffällig ist auch der *Pathway* *EIF2 Signaling*, da hier zahlreiche ribosomale Proteine sowie ein eukaryotischer Initiationsfaktor beinhaltet sind, die alle eine verringerte Abundanz in hypothyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen zeigen. Im Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse beinhalten die *Pathways* *Glutathione-mediated Detoxification*, *Glutathione Redox Reactions I*, *NRF2-mediated Oxidative Stress Response*, *Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling*, *Xenobiotic Metabolism Signaling*, *Apelin Adipocyte Signaling Pathway* und *LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function* hauptsächlich die Proteine GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM6, GSTM7, GSTP1, GSTT1 und PRDX6. Zudem fällt auf, dass die Proteine GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM6 und GSTA4, welche sowohl in hypo- als auch in hyperthyreoten Mäusen im Vergleich zur euthyreoten Kontrollgruppe identifiziert wurden, entgegengesetzte Mengen unter den beiden Bedingungen zeigen. Während diese Proteine in hypothyreoten Tieren erhöhte Abundanzen aufweisen, sind in hyperthyreoten Tieren die Abundanzen verringert.

**A Hypothyreose****B Hyperthyreose**

**Abbildung 4.20:** Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ) in hypothyreoten (A) und hyperthyreoten (B) Mäusen im Vergleich zur euthyreoten Kontrollgruppe. Es sind die zehn Pathways mit den kleinsten  $p$ -Werten (linke y-Achse) und die dazugehörigen Anzahlen identifizierter Proteine im Verhältnis zu den insgesamt im Pathway enthaltenen Proteinen (rechte y-Achse) aufgeführt. Auf der x-Achse ist der negative dekadische Logarithmus des  $p$ -Wertes dargestellt, wobei die gestrichelte Linie den Schwellenwert der Signifikanz kennzeichnet.

**Tabelle 4.7: Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ) im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse.** Es sind die zehn *Pathways* mit den kleinsten  $p$ -Werten und die dazugehörigen Ratios aus identifizierten Proteinen zu den insgesamt im *Pathway* enthaltenen Proteinen sowie die jeweils zugeordneten Proteine aufgeführt. Proteine mit erhöhter Abundanz in hypothyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen sind rot gefärbt, während solche mit verringerter blau gefärbt sind.

<b>IPA-Pathway</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Ratio (identifiziert/ gesamt)</b>	<b>Zugeordnete Proteine</b>
<i>Glutathione-mediated Detoxification</i>	1,10E-09	7/25	GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTA1, GSTA4, GSTT1, MGST3
<i>NRF2-mediated Oxidative Stress Response</i>	1,15E-09	14/196	GSTM1, GSTM2, GSTA1, NQO1, DNAJC3, DNAJA1, AKR1A1, GSTM6, SCARB1, GSTM3, DNAJB11, DNAJA2, CBR1, MGST3
<i>EIF2 Signaling</i>	2,40E-06	11/218	RPS6, RPL4, RPL3, RPS9, RPS8, RPL19, RPL5, RPL22L1, RPL26, RPL18, EIF2S2
<i>Xenobiotic Metabolism Signaling</i>	4,37E-06	12/279	GSTM1, GSTM2, GSTM6, GSTM3, CES3B, GSTA1, NQO1, SNW1, UGT1A9, PTGES3, MGST3, ESD
<i>LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function</i>	9,12E-06	10/204	GSTM1, SLC10A1, GSTM2, SCARB1, GSTM6, GSTM3, ACOX2, GSTA1, CYP4A10, MGST3
<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling</i>	2,00E-05	8/136	GSTM1, GSTM2, GSTM6, GSTM3, NQO1, GSTA1, PTGES3, MGST3
<i>Stearate Biosynthesis I (Animals)</i>	3,31E-05	5/44	BDH2, DHRS11, ELOVL2, ACOT4, CYP4A10
<i>Unfolded protein response</i>	9,77E-05	5/55	SEL1L, P4HB, PDIA6, DNAJC3, DNAJA2
<i>D-glucuronate Degradation I</i>	2,09E-04	2/3	AKR1A1, CRYL1

---

*Methylglyoxal Degradation III*      4,37E-04      3/18      **AKR1A1, DHRS11, CYP4A10**

---

**Tabelle 4.8: Ergebnisse der *in silico*-Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ) im Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse.** Es sind die zehn *Pathways* mit den kleinsten *p*-Werten und die dazugehörigen Ratios aus identifizierten Proteinen zu den insgesamt im *Pathway* enthaltenen Proteinen sowie die jeweils zugeordneten Proteine aufgeführt. Proteine mit erhöhter Abundanz in hyperthyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen sind rot gefärbt, während solche mit verringerter blau gefärbt sind.

<b>IPA-Pathway</b>	<b><i>p</i>-Wert</b>	<b>Ratio (identifiziert/ gesamt)</b>	<b>Zugeordnete Proteine</b>
<i>Glutathione-mediated Detoxification</i>	3,63E-10	7/25	GSTM1, GSTM2, GSTM7, GSTM3, GSTA4, <b>GSTT1</b> , GSTP1
<i>Glutathione Redox Reactions I</i>	2,51E-07	5/20	GSTM1, GSTM2, <b>GSTT1</b> , PRDX6, GSTP1
<i>NRF2-mediated Oxidative Stress Response</i>	1,55E-06	10/196	GSTM1, GSTM2, GSTM7, GSTM6, GSTM3, DNAJB4, NQO2, <b>DNAJC3, CBR1</b> , GSTP1
<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling</i>	5,75E-05	7/136	GSTM1, GSTM2, GSTM7, GSTM6, GSTM3, NQO2, GSTP1
<i>Xenobiotic Metabolism Signaling</i>	1,91E-04	9/279	GSTM1, CES1, GSTM2, GSTM7, GSTM6, GSTM3, NQO2, GSTP1, SULT1B1
<i>Apelin Adipocyte Signaling Pathway</i>	2,04E-04	5/75	GSTM1, GSTM2, <b>GSTT1</b> , PRDX6, GSTP1
<i>Heme Degradation</i>	3,02E-04	2/4	BLVRB, <b>HMOX2</b>
<i>Triacylglycerol Degradation</i>	4,57E-04	4/50	CES2A, <b>ABHD6, MGLL</b> , PRDX6
<i>LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function</i>	6,92E-04	7/204	GSTM1, GSTM2, GSTM7, GSTM6, GSTM3, SULT1B1, GSTP1
<i>Sucrose Degradation V (Mammalian)</i>	1,38E-03	2/8	ALDOB, ALDOC

---

#### 4.6.2 Vergleich der Wirkungen von Hypo- und Hyperthyreose auf das hepatische Proteom und Transkriptom von Mäusen

Da die Proteomanalysen auf den vorangegangenen Analysen der hepatischen Transkriptome (Masterarbeit Janine Golchert, 2014) der hypo.- und hyperthyreoten Mäuse im Vergleich zu euthyreoten Kontrolltieren basierten, sollen in diesem Abschnitt der Arbeit die jeweiligen Ergebnisse miteinander verglichen werden. Für die Transkriptomanalysen wurden jeweils vier biologische Replikate untersucht, während für die Proteomanalysen dieselben Tiere und zusätzlich drei, vier bzw. fünf weitere Replikate eingesetzt wurden.

In der Transkriptomanalyse hypothyreoter Mäuse konnten im Vergleich zur euthyreoten Kontrollgruppe insgesamt 465 signifikant differenziell exprimierte Gene identifiziert werden ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Von diesen zeigten 196 erhöhte und 269 verringerte mRNA-Mengen. Die komplementäre Proteomanalyse führte zur Detektion von insgesamt 257 Proteinen, die im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse signifikant veränderte Abundanzen aufwiesen ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$  bzw. Standardabweichung  $\geq 2$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Hierbei wiesen 103 Proteine erhöhte und 154 verringerte Mengen auf. Folglich konnten auf mRNA-Ebene deutlich mehr Veränderungen erfasst werden als auf Protein-Ebene und auf beiden Ebenen war die Anzahl jener Transkripte bzw. Proteine mit verringerten Abundanzen deutlich höher als die Anzahl jener mit erhöhten.

In der Analyse der hepatischen Transkriptome des Vergleichs hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse wurden insgesamt 1013 signifikant differenziell exprimierte Gene detektiert ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ ,  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Davon wiesen 573 Transkripte erhöhte und 440 verringerte mRNA-Mengen auf. In der korrespondierenden Proteomanalyse konnten insgesamt 234 signifikant differenziell abundante Proteine identifiziert werden. Von diesen zeigten 153 erhöhte und 81 verringerte Abundanzen. Demnach konnten auf mRNA-Ebene mehr als viermal so viele Veränderungen detektiert werden als auf Protein-Ebene. Im Gegensatz zum Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse wurden im Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene deutlich mehr Transkripte bzw. Proteine mit erhöhten Mengen als mit verringerten detektiert.

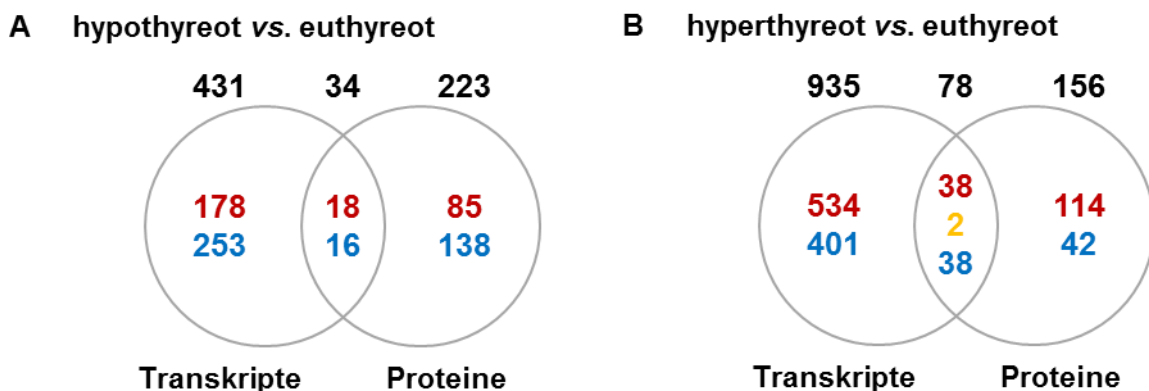
Zusammengefasst waren demzufolge in hypothyreoten Mäusen die Mengen von 465 Transkripten und 257 Proteinen signifikant verändert, während in hyperthyreoten Mäusen 1013 Transkripte und 234 Proteine jeweils im Vergleich zur euthyreoten Kontrollgruppe signifikant differenzielle Abundanzen zeigten. In hypothyreoten Mäusen entspricht dies einem Protein-zu-Gen-Transkript-Verhältnis von 0,55 und in hyperthyreoten Mäusen einem Verhältnis von 0,23. Das Verhältnis war folglich unter hypothyreoten Bedingungen deutlich höher als unter hyperthyreoten Bedingungen.

Im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse zeigten insgesamt 688 Gene auf mindestens einer der beiden Ebenen signifikante Veränderungen der Expression. Davon wiesen 34 Gene

(4,94 %) sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikante Veränderungen auf, während jeweils 431 Gene (62,65 %) nur auf mRNA-Ebene und 223 (32,41 %) nur auf Protein-Ebene signifikant veränderte Mengen zeigten (Abbildung 4.21 A). Von den 34 Genen, die auf beiden Ebenen signifikant differenziell exprimiert waren, zeigten 18 erhöhte und 16 verringerte Mengen an mRNA bzw. Protein.

In hyperthyreoten Mäusen wiesen im Vergleich zu euthyreoten Kontrollen insgesamt 1169 Gene auf mindestens einer Ebene der Expression signifikante Veränderungen auf. Von diesen zeigten 78 Gene (6,67 %) sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikante Veränderungen, während jeweils 935 Gene (79,98 %) ausschließlich auf mRNA-Ebene und 156 (13,34 %) ausschließlich auf Protein-Ebene signifikante Änderungen der Abundanz aufwiesen. Von den 78 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikant differenziell exprimierten Genen, zeigten 38 erhöhte und 38 verringerte Mengen an mRNA bzw. Protein, während 2 Gene entgegengesetzte mRNA- und Protein-Abundanzen aufwiesen (Abbildung 4.21 B).

Die vollständige tabellarische Übersicht der Transkripte bzw. Proteine, die in hypo- und hyperthyreoten Mäusen im Vergleich zur euthyreoten Kontrollgruppe signifikant veränderte Mengen aufwiesen, ist im Anhang in Tabelle A-IV zu finden. Gene, die sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene entsprechende Veränderungen zeigten, sind dabei besonders hervorgehoben.



**Abbildung 4.21: Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanter hepatischer Transkripte und Proteine in hypothyreoten (A) und hyperthyreoten (B) Mäusen im Vergleich zu ihren jeweiligen euthyreoten Kontrollgruppen.** Die insgesamt als differenziell abundant detektierten Transkripte bzw. Proteine sind in schwarzer, jene mit erhöhter Abundanz in hypo- oder hyperthyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen in roter und jene mit verringerter in blauer Schrift dargestellt. Die gelbe Schrift kennzeichnet Transkripte bzw. Proteine mit entgegengesetzt veränderter Abundanz.  $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , Standardabweichung  $\geq 2$  (für Proteine),  $\text{fold change} \geq |1,5|$ .

## 5 Diskussion

Die Schilddrüsenhormone (TH) Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) sind für die Regulation einer Vielzahl physiologischer und metabolischer Prozesse von Bedeutung. Dabei stimulieren sie anabole und katabole Reaktionen des Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsels und regulieren den Grundumsatz. Die Leber zählt dabei zu einem der wichtigsten Zielorgane, in denen TH den Energiestoffwechsel regulieren (Mullur *et al.*, 2014). Durch Deiodierung und Decarboxylierung können aus den klassischen TH  $T_3$  und  $T_4$  unter anderem die TH-Metabolite 3,5-Diiodthyronin ( $3,5-T_2$ ) und 3-Iodthyronamin ( $3-T_1AM$ ) entstehen (Moreno *et al.*, 2008). In den letzten Jahren sind diese TH-Metabolite zunehmend in den Fokus der Schilddrüsenforschung gerückt und konnten als endogene und metabolisch aktive Substanzen charakterisiert werden (Mullur *et al.*, 2014).

Für den TH-Metabolit  $3-T_1AM$  wurden in Studien mit Nagern metabolische Effekte gezeigt, die denen der klassischen TH teilweise entgegengesetzt sind (Scanlan *et al.*, 2004). Zudem wurden Interferenzen von  $3-T_1AM$  auf die HPT-Achse in Nagern beschrieben (Klieverik *et al.*, 2009). Dies deutet auf einen Einfluss von  $3-T_1AM$  auf die Aufrechterhaltung der TH-Homöostase hin. Dabei könnte eine direkte Wirkung von  $3-T_1AM$  auf die Schilddrüse eine Rolle spielen (Schanze *et al.*, 2017). Um die Wirkungsweise von  $3-T_1AM$  auf die Schilddrüse besser charakterisieren zu können sollten im Rahmen dieser Arbeit Transkriptomanalysen von Thyreozyten im *in vitro*-Modell durchgeführt werden.

In zahlreichen Interventions-Studien in Nagern wurde  $3,5-T_2$  als ein Thyreomimetikum mit Effekten auf den Energie- und Lipidmetabolismus beschrieben. Dabei wurden keine der für TH typischen kardialen Nebenwirkungen aufgezählt. Daher wird  $3,5-T_2$  als ein potenzielles therapeutisches Agens gegen Adipositas und die damit assoziierten Begleiterkrankungen wie z. B. die *Steatosis hepatis* (Fettleber) diskutiert, die in der westlichen Gesellschaft eine steigende Inzidenz zeigen (Coppola *et al.*, 2014). Die beschriebenen Effekte von  $3,5-T_2$  auf den Lebermetabolismus motivierten bereits in einer vorangegangenen Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) die Durchführung von Transkriptomanalysen. Dabei wurden normalgewichtige und adipöse Mäuse mit  $3,5-T_2$  behandelt und ihre hepatischen Genexpressionsmuster analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die hepatischen Transkriptomanalysen vertieft und um komplementäre Proteomanalysen ergänzt werden, um zusätzliche Informationen über physiologische Effekte und daran beteiligte *Pathways*, auch auf Proteinebene, zu gewinnen bzw. zu validieren.

Die TH-Homöostase wird im gesunden Organismus normalerweise durch den negativen Rückkopplungsmechanismus der HPT-Achse reguliert. Dabei wird die Konzentration von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> im Blut durch eine Feedback-Regulation der TH selbst gesteuert. Gerät dieses komplexe Zusammenspiel aus dem Gleichgewicht, kommt es zu Fehlfunktionen. Dazu zählen Hypo- und Hyperthyreose, bei denen ein Mangel bzw. Überschuss an TH vorliegt (siehe Kapitel 1.3) (Zoeller *et al.*, 2007). Da diese Erkrankungen im klinischen Alltag von Bedeutung sind, wurden ihre Auswirkungen auf das hepatische Transkriptom bereits in einer vorangegangenen Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) untersucht. Um diese Daten zu komplementieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Proteomanalysen derselben Proben durchgeführt.

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der einzelnen Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit zur Aufklärung der physiologischen Effekte von 3-T<sub>1</sub>AM und 3,5-T<sub>2</sub> sowie einer Hypo- und Hyperthyreose durchgeführt wurden, im Detail diskutiert. Dazu wurden Microarray-basierte Transkriptomanalysen unter Nutzung von *GeneChip Rat / Mouse Gene 1.0 ST Arrays* (Affymetrix) sowie Proteomanalysen mittels LC-MS/MS durchgeführt.

### 5.1 Wirkungen von 3-T<sub>1</sub>AM auf das Transkriptom von PCCL3-Zellen

Das endogene und biologisch aktive TH-Derivat 3-Iodthyronamin (3-T<sub>1</sub>AM) führt in Nagern bei Gabe pharmakologischer Dosen zu Effekten, die gegensätzlich zu denen der klassischen TH T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> sind. Dazu zählen vor allem die Verringerung der Herzfrequenz, der Körpertemperatur und des Grundumsatzes (Scanlan *et al.*, 2004; Braulke *et al.*, 2008). Jedoch sind für 3-T<sub>1</sub>AM auch metabolische Effekte auf den Lipid- und Glucosestoffwechsel beschrieben, die mit denen der klassischen TH einhergehen (Braulke *et al.*, 2008). Außerdem wurde nach der 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung in Nagern eine Feedback-Regulation auf die HPT-Achse nachgewiesen, da es zu verminderten T<sub>3</sub>-, T<sub>4</sub>- und TSH-Spiegeln im Plasma kam (Klieverik *et al.*, 2009; Manni *et al.*, 2012).

Daher vermuteten Schanze *et al.* (2017), dass 3-T<sub>1</sub>AM eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der TH-Homöostase spielt und direkt auf die Schilddrüse einwirken kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einem ersten Versuch Mäusen täglich i. p. 5 mg/kg 3-T<sub>1</sub>AM über sieben Tage verabreicht, was eher einer physiologischen als pharmakologischen Dosis entspricht. Die RT-qPCR-Analyse der Expression von Genen, deren kodierte Proteine an der TH-Synthese beteiligt sind ergab, dass *Nis* (*Slc5a5*, Natrium-Iodid-Symporter), *Tg* (Thyreoglobulin) und *Pds* (Pendrin) signifikant verringerte mRNA-Mengen im Schilddrüsengewebe 3-T<sub>1</sub>AM-behandelter Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren zeigten. Hingegen zeigten andere relevante Gene wie *Tshr* (Thyreoida-stimulierendes-Hormon (TSH)-Rezeptor), *Tpo* (Thyreoperoxidase), *Duox2* (Duale Oxidase 2) und *Dio1* (Deiodase vom Typ I) keine signifikanten Expressionsänderungen. Weiterhin wurde in diesem Versuch der

Einfluss von 3-T<sub>1</sub>AM auf die HPT-Achse untersucht. Dabei konnte weder eine Änderung der T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Serum-Konzentrationen noch eine Änderung der Genexpression von *Tshb* (TSH (Thyreotropin), beta Untereinheit), *Trhr* (Thyreotropin-*Releasing*-Hormon (TRH)-Rezeptor), *Trhde* (TRH-degradierendes Enzym), *Thrb* (TH-Rezeptor beta) und *Dio2* (Deiodase Typ II) im Hypophysengewebe 3-T<sub>1</sub>AM-behandelter Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass die HPT-Achse in diesem Tiermodell nicht durch 3-T<sub>1</sub>AM beeinflusst wurde, wobei eine kompensatorische Adaption der HPT-Achse nach der 7-tägigen Behandlung jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte.

Daher mutmaßten Schanze *et al.* (2017) einen direkten 3-T<sub>1</sub>AM-Effekt auf die Schilddrüse, welcher in einem sich anschließenden Versuch untersucht werden sollte. Hierzu wurde die ausdifferenzierte Thyreozyten-Zelllinie PCCL3 aus Ratten als isoliertes *in vitro*-Modell für Analysen auf molekularer Ebene eingesetzt. Da 3-T<sub>1</sub>AM in Serum nachgewiesen wurde und an das Transportprotein Apolipoprotein B-100 gebunden im Blut transportiert wird (Hoefig *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2012), wurde den PCCL3-Zellen vor der eigentlichen 3-T<sub>1</sub>AM-Stimulation FKS im Zellkulturmedium entzogen um eine genau definierte 3-T<sub>1</sub>AM-Konzentration im experimentellen Design zu gewährleisten und Effekte durch andere TH und TH-Metabolite auszuschließen. Zudem wurde auch das TSH im Zellkulturmedium unmittelbar vor dem Versuchsbeginn depletiert, um die Reaktionsfähigkeit der Stimulation, welche mit einer Kombination aus TSH und 3-T<sub>1</sub>AM erfolgte, zu verbessern. So konnte nach einer 3-stündigen Stimulation mit 0,01 - 1 µM 3-T<sub>1</sub>AM eine dosisabhängige Verringerung der mRNA-Menge von *Nis* mittels RT-qPCR beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 1 µM 3-T<sub>1</sub>AM war die *Nis* Expression mehr als 2-fach verringert. Andere Gene, wie *Tg*, *Tpo*, *Dio1*, *Pds* und *Tshr*, die für die TH-Synthese wichtige Proteine kodieren, wiesen jedoch keine signifikant veränderten mRNA-Mengen auf. Um zu überprüfen, ob die Expressionsänderungen von *Nis* auch auf Proteinebene übertragen werden, wurden die PCCL3-Zellen für 48 h mit 1 µM 3-T<sub>1</sub>AM stimuliert. Anschließend konnte mittels Western Blot-Analysen die Verringerung der NIS-Menge um etwa 40 % in 3-T<sub>1</sub>AM-stimulierten Zellen bestätigt werden.

Schanze *et al.* (2017) konnten somit durch ihre *in vivo* und *in vitro* erhobenen Daten nachweisen, dass 3-T<sub>1</sub>AM direkt auf Thyreozyten der Schilddrüse einwirken kann, indem es die Expression einzelner für die Iod-Aufnahme und TH-Synthese relevanter Gene inhibiert. Dabei konnte in ihren Ergebnissen keine Beteiligung einer Feedback-Regulation auf die HPT-Achse gezeigt werden.

Um weitere potenzielle und bisher unbekannte Zielgene von 3-T<sub>1</sub>AM in Thyreozyten zu identifizieren sollte außerdem die 3-T<sub>1</sub>AM-Wirkung auf die zellulären Transkriptome von den in Schanze *et al.* (2017) beschriebenen PCCL3-Zellen nach 3-stündiger Stimulation mit 1 µM 3-T<sub>1</sub>AM analysiert werden. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. In der Auswertung der Transkriptomdaten konnte jedoch kein einziges Gen mit

signifikant veränderten mRNA-Mengen detektiert werden. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten *p*-Werte und auch die *fold changes* waren bis auf eine Ausnahme alle  $\leq |1,5|$ . Dies bedeutet, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen im Transkriptomprofil keine 3-T<sub>1</sub>AM-vermittelte Wirkung auf Thyreozyten zu beobachten ist. Da einzelne Gene, welche für die TH-Synthese relevante Proteine kodieren bereits in der Arbeit von Schanze *et al.* (2017) von besonderem Interesse waren, sind diese in Tabelle 5.1 zu Vergleichszwecken angeführt. Dabei fällt auf, dass *Nis*, welches als einziges untersuchtes Gen in der RT-qPCR von Schanze *et al.* (2017) signifikant verringert exprimiert war, in der Transkriptomanalyse immerhin einen der größten *fold changes* von -1,25 besitzt.

**Tabelle 5.1: Ergebnisse der Transkriptomanalyse 3-T<sub>1</sub>AM-behandelter PCCL3-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen für ausgewählte Gene.** Keines der aufgeführten für die TH-Synthese relevanten Gene zeigt eine signifikant differenzielle Expression.

NCBI Gen-Symbol	Affymetrix sequence code	Genproduktname	Transkript-menge <i>fold change</i>	t-Test <i>p</i> (FDR)-Wert
<i>Slc5a5</i> ( <i>Nis</i> )	10787401	<i>solute carrier family 5 (sodium/iodide cotransporter), member 5</i>	-1,25	1,00E+00
<i>Tg</i>	10896885	<i>thyroglobulin</i>	-1,01	1,00E+00
<i>Slc26a4</i> ( <i>Pds</i> )	10889541	<i>solute carrier family 26 (anion exchanger), member 4</i>	-1,00	1,00E+00
<i>Tshr</i>	10886252	<i>thyroid stimulating hormone receptor</i>	-1,05	1,00E+00
<i>Tpo</i>	10889477	<i>thyroid peroxidase</i>	-1,06	1,00E+00
<i>Duox2</i>	10849230	<i>dual oxidase 2</i>	1,09	1,00E+00
<i>Dio1</i>	10878548	<i>deiodinase, iodothyronine, type I</i>	-1,06	1,00E+00

Die ausbleibende Detektion von signifikanten Genexpressionsänderungen auf mRNA-Ebene nach der 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung muss jedoch nicht bedeuten, dass es keine 3-T<sub>1</sub>AM-vermittelten Wirkungen auf Thyreozyten gibt, da im selben Experiment mittels RT-qPCR von Schanze *et al.* (2017) signifikante Veränderungen von Transkriptmengen nachgewiesen werden konnten. Ein Grund könnte die bei Microarray-basierten Analysen beobachtete geringere Sensitivität im Vergleich zu RT-qPCR-Analysen sein. Dies würde insbesondere ein Problem darstellen, sollten die 3-T<sub>1</sub>AM-vermittelten Effekte nur gering ausgeprägt sein. Zudem deutete bereits die PCA (Abbildung 4.1) der Transkriptomdaten eine starke biologische Varianz der Proben innerhalb einer experimentellen Gruppe an, da zwischen den Kontroll-Zellen und den 3-T<sub>1</sub>AM-behandelten Zellen keine klare Auftrennung der Proben zu

erkennen war. Außerdem zeigte sich eher eine Gruppierung entsprechend des Kultivierungstages als nach der 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung. Dadurch wird das Erreichen statistischer Signifikanz einer potenziellen Genexpressionsänderung zusätzlich erschwert. Daher könnte durch die Optimierung des Experimentdesigns eine bessere biologische Vergleichbarkeit innerhalb einer experimentellen Gruppe erzielt werden. Weiterhin könnte auch die Dauer und Dosis der 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung angepasst werden, um mögliche Zielgene und Mechanismen der 3-T<sub>1</sub>AM-Wirkung in Thyreozyten zu identifizieren. Letztlich ist die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Schanze *et al.* (2017) und den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten auf der Basis der verfügbaren Informationen gegenwärtig nicht abschließend zu erklären.

## 5.2 Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom und Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät

Die Adipositas stellt vor allem in der westlichen Bevölkerung eine immer häufiger auftretende Erkrankung dar. Mit ihr einher gehen Folgeerkrankungen, wie beispielsweise Typ-2-Diabetes, Bluthochdruck und die Entstehung einer Fettleber, der sogenannten *Steatosis hepatis*. Bei der *Steatosis hepatis* kommt es in den Hepatozyten der Leber zu einer übermäßigen ektopischen Akkumulation von Triglyceriden. Aus einer *Steatosis hepatis* können sich weiterhin eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) und schließlich sogar eine Leberfibrose und Leberzirrhose entwickeln. Derzeit kann die *Steatosis hepatis* in erster Linie nur durch eine Gewichtsabnahme behandelt werden, da es bisher keine zugelassenen Medikamente gibt (Coppola *et al.*, 2014).

Der endogene TH-Metabolit 3,5-T<sub>2</sub> konnte in zahlreichen Interventions-Studien in Ratten als biologisch aktives Thyreomimetikum mit Wirkungen auf den Energie- und Lipidstoffwechsel nachgewiesen werden. Dabei übt er hypolipidämische und anti-steatotische sowie gewichtsreduzierende Effekte aus, ohne thyreomimetische Nebenwirkungen, wie sie typisch für die T<sub>3</sub>-Behandlung sind, zu zeigen. Daher wird 3,5-T<sub>2</sub> als potenzielles Therapeutikum für Adipositas und die *Steatosis hepatis* diskutiert (Coppola *et al.*, 2014).

Die mögliche therapeutische Wirkung von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Diät-induzierte Adipositas wurde auch in einer Interventions-Studie von Jonas *et al.* (2015) in einem Mausmodell untersucht. Dazu wurden Mäusen unter Hochfettdiät (HFD) für zwei oder vier Wochen i. p. 0,25 oder 2,5 µg/g Körpergewicht 3,5-T<sub>2</sub> oder 0,03 µg/g Körpergewicht T<sub>3</sub> appliziert. Dabei konnten Jonas *et al.* (2015) dosisabhängige thyreomimetische 3,5-T<sub>2</sub>-Effekte ähnlich zu denen von T<sub>3</sub> beobachten. Die 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung führte zu verringerten T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Konzentrationen im Serum und der Leber sowie zur verringerten Expression von TH-responsiven Genen in der Hypophyse. Dies deutete auf eine negative Feedback-Regulation von 3,5-T<sub>2</sub> auf die HPT-Achse hin. Weiterhin

wurden TH-Zielgene in der Leber, deren Genprodukte in den Lipidmetabolismus involviert sind, wie nach  $T_3$ -Behandlung exprimiert. Zudem waren die hepatische Triglycerid-Konzentration und die Cholesterol-Serum-Konzentration in 3,5- $T_2$ -behandelten Mäusen verringert. Das Körpergewicht der 3,5- $T_2$ -behandelten Mäuse war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant reduziert, da die 3,5- $T_2$ -Behandlung eine erhöhte Nahrungsaufnahme zur Folge hatte. Jedoch konnte in 3,5- $T_2$ -behandelten Mäusen eine Änderung der relativen Körperzusammensetzung beobachtet werden, wobei die Fettmasse zugunsten der Mager- bzw. Muskelmasse abnahm. Hinsichtlich der kardialen Nebeneffekte konnten Jonas *et al.* (2015) zeigen, dass 3,5- $T_2$  das Herzgewicht erhöht, was auf eine thyreotoxische Wirkung hindeutet. Daher stellten diese Autoren den therapeutischen Einsatz von 3,5- $T_2$  in Frage.

Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) wurden, basierend auf den Experimenten von Jonas *et al.* (2015), Microarray-basierte Transkriptomanalysen durchgeführt, um weitere 3,5- $T_2$ -vermittelte Effekte auf die hepatische Genexpression zu erfassen. Dazu wurde Lebergewebe von adipösen Mäusen unter HFD analysiert, die i. p. für zwei Wochen entweder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle,  $T_3$  (0,03  $\mu\text{g/g}$  Körpergewicht), eine geringe Dosis 3,5- $T_2$  (0,25  $\mu\text{g/g}$  Körpergewicht) oder eine hohe Dosis 3,5- $T_2$  (2,5  $\mu\text{g/g}$  Körpergewicht) appliziert bekamen. Außerdem wurden normalgewichtige Mäuse unter Standard-Diät (SD), denen i. p. für vier Wochen entweder physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle oder eine hohe Dosis 3,5- $T_2$  (2,5  $\mu\text{g/g}$  Körpergewicht) injiziert wurde, analysiert. Die höhere Dosis von 2,5  $\mu\text{g/g}$  Körpergewicht 3,5- $T_2$  wurde ausgewählt, da sowohl von Jonas *et al.* (2015) als auch in den Transkriptomanalysen HFD-gefütterter Mäuse hier die beobachteten Effekte stärker manifestiert waren. Die korrespondierende Gruppe von HFD-gefütterten Mäusen mit vierwöchiger 3,5- $T_2$ -Behandlung konnte zum Zeitpunkt der Masterarbeit leider noch nicht untersucht werden. Daher sollte diese Doktorarbeit inhaltlich an die Experimente der Masterarbeit anknüpfen und die noch ausstehenden Transkriptomanalysen vervollständigen. Weiterhin sollten diese um komplementäre hepatische Proteomanalysen ergänzt werden, um die 3,5- $T_2$ -vermittelten Effekte auch auf Proteinebene verifizieren bzw. zusätzliche Effekte detektieren zu können. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Proteomanalysen wurden dementsprechend Mäuse unter SD und HFD untersucht, die vier Wochen lang mit 2,5  $\mu\text{g/g}$  Körpergewicht 3,5- $T_2$  oder einer physiologischen Kochsalzlösung als Kontrolle behandelt wurden.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der hepatischen Transkriptom- und Proteomanalysen 3,5- $T_2$ -behandelter Mäuse, auch vergleichend zueinander, diskutiert.

### 5.2.1 Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom von Mäusen unter Hochfettdiät

Die Analyse des hepatischen Transkriptoms 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter HFD im Vergleich zu HFD-Kontrolltieren führte zur Detektion von 103 Genen mit signifikant veränderten mRNA-Mengen ( $p \leq 0,05$ ,  $fold\ change \geq |1,5|$ ) (Abbildung 4.3). In der Transkriptomanalyse der SD-gefütterten Mäuse wurden im Rahmen der vorangegangenen Masterarbeit 221 signifikant differenziell exprimierte Gene in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten im Vergleich zu SD-Kontrolltieren detektiert ( $p \leq 0,05$ ,  $fold\ change \geq |1,5|$ ). Damit wurden in Mäusen unter SD mehr als doppelt so viele Transkripte wie unter HFD beeinflusst. Der Vergleich der signifikant differenziell exprimierten Gene in beiden Diät-Gruppen ergab, dass die Abundanzen von 50 Transkripten sowohl unter SD als auch unter HFD in die gleiche Richtung signifikant verändert waren (Abbildung 4.6). Daraus ergaben sich unter SD-Bedingungen 171 und unter HFD-Bedingungen 53 signifikant veränderte Transkriptmengen. Die unter beiden Diäten betroffenen Transkripte könnten daher von Genen kodiert sein, die universell durch 3,5-T<sub>2</sub> beeinflusst werden. Hingegen könnten die spezifisch unter HFD differenziell exprimierten Gene durch die Fettleber bedingte Effekte reflektieren.

Zu den unter beiden Diäten durch 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung betroffenen Genen zählte unter anderem *Dio1* (kodierend für die Deiodase Typ I), welches mit erhöhten mRNA-Mengen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Tieren detektiert wurde (SD: 4,55-fach, HFD: 2,74-fach). Auch im korrespondierenden Proteom zeigte DIO1 in Mäusen unter HFD nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung signifikant erhöhte Abundanz (2,76-fach). In 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD konnten auf Protein-Ebene zwar erhöhte Abundanzen (1,93-fach) beobachtet werden, jedoch wurde kein signifikanter  $p$ -Wert erreicht. Die Deiodase Typ I ist zum einen für die Deiodierung von T<sub>4</sub> zu T<sub>3</sub> und zum anderen für die weitere Metabolisierung der TH verantwortlich (Mondal *et al.*, 2016). Bereits in mehreren Experimenten konnten die thyreomimetischen Effekte von 3,5-T<sub>2</sub> auf die DIO1-Aktivität sowie die *Dio1*-Expression gezeigt werden (Baur *et al.*, 1997; Padron *et al.*, 2014; Jonas *et al.*, 2015; Ohba *et al.*, 2016), weshalb die hier erhobenen Daten jene Ergebnisse verifizieren. Weiterhin kann daher eine verstärkte Metabolisierung der aktiven TH, wie sie für kompensatorische Mechanismen bei einer induzierten Hyperthyreose typisch ist, vermutet werden. Auch *Serpina7* (kodierend für das Thyroxin-bindende Globulin, TBG) zählte zu den Genen, die sowohl in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD als auch HFD signifikant verringerte mRNA-Mengen zeigten (SD: 3,53-fach, HFD: 4,24-fach). Auf Protein-Ebene konnten hingegen keine Aussagen über die Mengenveränderungen getroffen werden, da SERPINA7 in der massenspektrometrischen Analyse nicht detektiert werden konnte, was nicht überraschte, da es sich um ein sekretiertes Protein handelt. TBG stellt ein wichtiges Transportprotein von TH im Blut dar (Refetoff, 2000), weshalb seine verringerte Genexpression auf eine negative Rückkopplung hindeutet. Da *Dio1* und *Serpina7* zu den

klassischen TH-responsiven Genen zählen bestätigen die hier durchgeführten Transkriptomanalysen durch 3,5-T<sub>2</sub> vermittelte thyreomimetische Effekte, welche für DIO1 in HFD-gefütterten Tieren unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden konnten. Diese thyreomimetischen Effekte könnten durch Bindung von 3,5-T<sub>2</sub> an den hepatischen TRβ1 vermittelt werden, welche in Knochenfischen bereits nachgewiesen werden konnte (Mendoza *et al.*, 2013; Navarrete-Ramírez *et al.*, 2014).

Mittels IPA wurden *in silico-Pathway-Analysen* der signifikant differenziell exprimierten Gene in HFD-gefütterten Mäusen mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung durchgeführt. Dabei wurden gehäuft *Pathways* identifiziert die dem Kontext der Cholesterol-Biosynthese zugeordnet waren, wobei die entsprechenden Gene durchweg erhöhte mRNA-Mengen aufwiesen (Abbildung 4.4 und Tabelle 4.1). Zu ihnen zählten *Sqle*, *Nsdhl*, *Idi1*, *Hsd17b7* und *Cyp51*, kodierend für Squalen-Monooxygenase, decarboxylierende Sterol-4α-carboxylat-3-Dehydrogenase, Isopentenyl-diphosphat-Isomerase, 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 7 und Lanosterin 14α-Demethylase (Abbildung 5.1). Des Weiteren konnte nach intensiverer Auswertung der Transkriptomdaten HFD-gefütterter Mäuse mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung ein weiteres Gen mit an der Cholesterol-Biosynthese beteiligtem Genprodukt detektiert werden, namentlich das für Methylsterol-Monooxygenase 1 kodierende *Msmo1*, dessen Transkriptmenge ebenfalls erhöht war (Abbildung 5.1). Es konnten weiterhin zwei Gene mit signifikant differenziellen mRNA-Mengen in HFD-gefütterten Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung detektiert werden, deren Genprodukte in die Gallensäure-Biosynthese involviert sind. Diese waren namentlich *Cyp39a1*, kodierend für 24-Hydroxycholesterol-7α-Hydroxylase, und *Cyp46a1*, kodierend für Cholesterol-24-Hydroxylase, welche erhöhte bzw. verringerte mRNA-Mengen aufwiesen (Abbildung 5.1). In SD-gefütterten Mäusen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung konnte für keines dieser Gene eine signifikante Transkriptmengen-Veränderung beobachtet werden. Im korrespondierenden Proteom wurden ebenfalls stimulierende 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Effekte auf Enzyme der Cholesterol- und Gallensäure-Biosynthese in Mäusen unter HFD detektiert (Abbildung 5.6), weshalb diese zusammen mit den Transkriptomergebnissen detailliert in Kapitel 5.2.2.6 und 5.2.2.7 diskutiert werden.

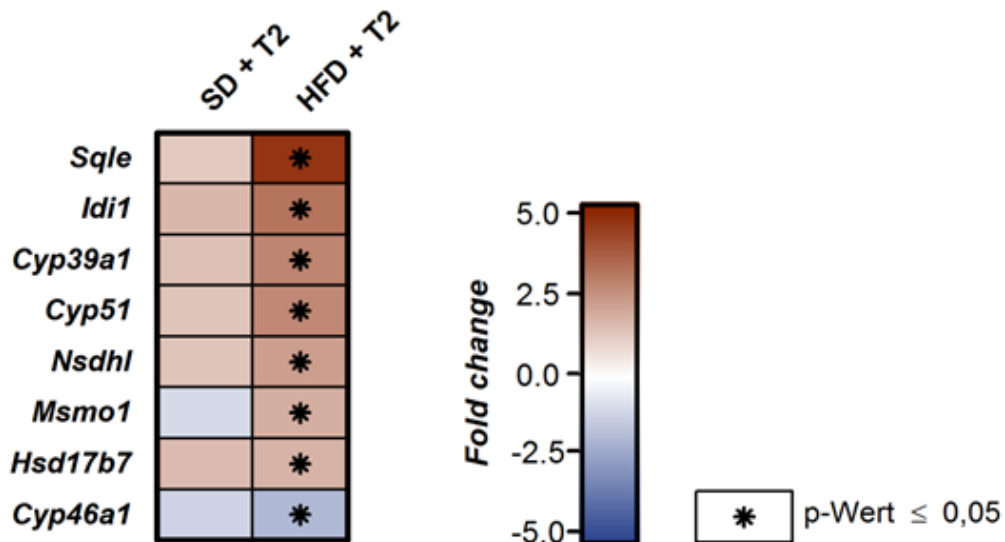


Abbildung 5.1: Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Expression hepatischer Gene, welche Proteine des Cholesterol- und Gallensäure-Metabolismus kodieren, in Mäusen unter SD und HFD. Dargestellt sind Gene, die unter mindestens einer der beiden Bedingungen in SD- oder HFD-gefütterten 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant differenziell exprimiert waren ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$  (\*),  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Transkripte, welche eine erhöhte mRNA-Menge in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe aufwiesen sind rot und solche mit verringerter blau dargestellt.

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan ist unter anderem für die Detoxifizierung und Eliminierung von Fremdstoffen (Xenobiotika) verantwortlich. Bei dieser Biotransformation spielen Xenobiotika-metabolisierende Proteine eine wichtige Rolle, die in drei Kategorien eingeteilt werden: Phase I, Phase II und Phase III. Zur Kategorie der Phase I-Enzyme gehören hauptsächlich Monooxygenasen, welche hydrophobe Xenobiotika in hydrophile Moleküle umwandeln. Zu ihnen zählen unter anderem Enzyme der Cytochrom P450 (CYP)-Familie, Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen sowie Monoaminoxidasen. Die Cyp-Enzyme katalysieren dabei die Oxidation von Xenobiotika zu reaktiven, aber auch potenziell toxischen Intermediaten, welche dann durch Phase II-Enzyme in wasserlösliche Konjugate umgewandelt werden. Die Phase II-Enzyme umfassen Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen und Sulfotransferasen. Abschließend werden die konjugierten Xenobiotika durch Phase III-Transporter, wie beispielsweise ABC-Transporter (*ATP binding cassette*-Transporter) oder SLC-Transporter (*solute carrier*-Transporter) aus der Leber exportiert (Lee *et al.*, 2011).

In den *Pathway*-Analysen der signifikant differenziell exprimierten Gene in HFD-gefütterten Mäusen mit 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung konnten einige Abbauege als signifikant assoziiert detektiert werden (Abbildung 4.4 und Tabelle 4.1), die Gene beinhalten, welche für Xenobiotika-metabolisierende Proteine kodieren. Bei vertiefter Analyse des gesamten Transkriptomdatensatzes konnten viele weitere derartige Gene als signifikant differenziell

exprimiert detektiert werden. Auch in den Transkriptomdaten der in der vorangegangenen Masterarbeit untersuchten Mäuse unter HFD, die für zwei Wochen mit 3,5-T<sub>2</sub> behandelt wurden, sowie der Mäuse unter SD, die für vier Wochen mit 3,5-T<sub>2</sub> behandelt wurden, konnten diese Effekte beobachtet werden. In der Abbildung 5.2 sind die entsprechenden Transkripte für Mäuse unter SD und HFD mit vierwöchiger 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe dargestellt. Dabei fällt auf, dass in Mäusen unter SD mehr Gene, die für Xenobiotika-metabolisierende Proteine kodieren, betroffen waren als in Mäusen unter HFD. Für die meisten unter HFD signifikant differenziell exprimierten Gene war dies auch unter SD der Fall, jedoch zeigten neun Gene (*Cyp39a1*, *Cyp51*, *Cyp46a1*, *Ces2a*, *Cyp2d9*, *Sult1b1*, *Gpx6*, *Slc13a3* und *Slc39a4*) spezifische Transkriptmengen-Veränderungen exklusiv unter HFD-Bedingungen.

Unter den Phase I-Enzymen fanden sich viele für Cytochrom P450-Enzyme kodierende Gene mit erhöhten und verringerten mRNA-Mengen, die zu den Cyp-Familien 2, 4, 17, 39, 46 und 51 gehören. Bei CYPs handelt es sich um Monooxygenasen, die neben dem Metabolismus von Xenobiotika auch am Metabolismus von Fettsäuren, Cholesterol und Steroiden beteiligt sind (Guengerich, 2017). In vorherigen Studien konnten bereits Effekte der klassischen TH auf die Expression CYP-kodierender Gene gezeigt werden (Ram und Waxman, 1991, 1992; O'Leary *et al.*, 1997), jedoch wurden für 3,5-T<sub>2</sub> bisher keine solchen beobachtet. Auf Protein-Ebene konnten ebenfalls signifikante Mengenveränderungen in gleicher Richtung für CYP39A1, CYP2C37 und CYP4A12A in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und für CYP17A1, CYP39A1 und CYP51 in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD detektiert werden. Weiterhin waren auch drei Carboxylesterase-kodierende Gene differenziell exprimiert, die ebenfalls zu den Phase I-Enzymen zählen (Hosokawa, 2008). Im korrespondierenden Proteom konnten für diese Enzyme hingegen keine Änderungen der Abundanz detektiert werden. Jedoch zeigten zusätzlich die beiden Proteine CES1E und CES1G verringerte Abundanzen (siehe Kapitel 5.2.2.4).

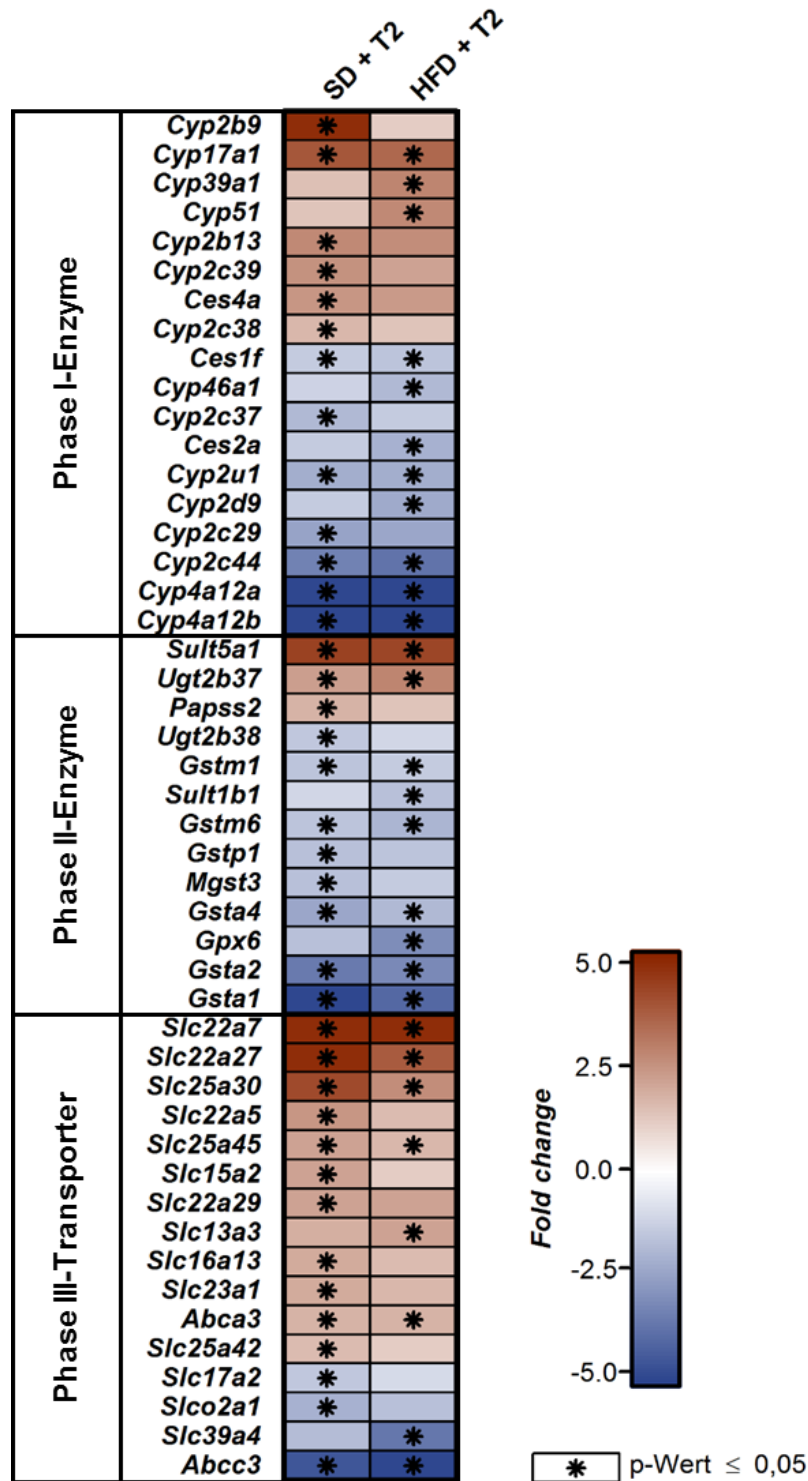


Abbildung 5.2: Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Expression hepatischer Gene, welche Xenobiotika-metabolisierende Enzyme kodieren, in Mäusen unter SD und HFD. Dargestellt sind Gene, die für Phase I- und Phase II-Enzyme sowie Phase III-Transporter kodieren und unter mindestens einer der beiden Bedingungen in SD- oder HFD-gefütterten 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant differenziell exprimiert waren ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$  (\*),  $\text{fold change} \geq |1,5|$ ). Gene, welche nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung eine erhöhte mRNA-Menge im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe aufwiesen, sind rot und solche mit verringerter blau dargestellt. Transkripte mit einem  $\text{fold change} > |5,0|$  sind mit der dunkelsten Rot- bzw. Blaufärbung gekennzeichnet.

Zu den schwächer exprimierten für Phase II-Enzyme kodierenden Genen zählten solche für Glutathion-S-Transferasen (GST) der Klassen alpha, mu, pi, mikrosomale GSTs und Glutathion-Peroxidase 6. Die GSTs und die Glutathion-Peroxidase 6 katalysieren die Bindung von Glutathion an Xenobiotika bzw. die Reduktion von Wasserstoffperoxid, wodurch sie vor oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (englisch: *reactive oxygen species*, ROS) schützen (McCarver und Hines, 2002; Winterbourn, 2013). In der korrespondierenden Proteomanalyse konnten für GSTA1, GSTA4, GSTM1, GSTM6 und GSTP1 in Mäusen unter SD und/oder HFD nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung ebenfalls verringerte Abundanzen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden im Proteom weitere GSTs mit verringerten Mengen detektiert, weshalb diese in Kapitel 5.2.2.4 im Detail besonders im Hinblick auf eine potenzielle Regulation durch NRF2 diskutiert werden.

Weiterhin war die Expression von Phase II-Genen, die für UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) der Familie 2 und Sulfotransferasen (SULT) der Familien 1 und 5 kodieren, in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen signifikant verändert. Im Proteom konnten in Übereinstimmung mit den Transkriptomdaten für SULT1B1 verringerte Mengen in HFD-gefütterten Mäusen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.2.2.4). Neben der Beteiligung an Biotransformationsreaktionen konnten für verschiedene Isoformen der UGT und SULT auch physiologische Funktionen bei der Glucuronidierung und Sulfonierung von Iodthyroninen nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2005). Für Sulfonierungsreaktionen wird Sulfat benötigt, wobei 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat (PAPS) als Sulfat-Quelle dient, welches wiederum durch die PAPS Synthase 2 (PAPSS2) synthetisiert wird (Hemmerich *et al.*, 2004). Das für die PAPSS2 kodierende Gen zeigte erhöhte mRNA-Mengen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung in Mäusen unter SD. Auf Protein-Ebene konnten für PAPSS2 sowohl in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD als auch HFD erhöhte Abundanzen detektiert werden (siehe Kapitel 5.2.2.4).

Phase III-Transporter-kodierende Gene waren ebenfalls signifikant differenziell exprimiert. Hier konnten SLC-Transporter der Familien 13, 15, 16, 22, 23 und 25 mit erhöhten und jene der Familien 17, 39 und o2 mit verringerten mRNA-Mengen detektiert werden. *Slc25a30* und *Slc25a45*, welche mitochondriale Carrier-Proteine kodieren, waren in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen sowohl unter SD als auch unter HFD verstärkt exprimiert (Haitina *et al.*, 2006). 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Effekte auf die Mitochondrien konnten bereits in anderen Studien demonstriert werden (Arnold *et al.*, 1998; Lombardi *et al.*, 1998). Die stärkste Induktion in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Tieren unter SD- sowie HFD-Bedingungen konnte für *Slc22a7* beobachtet werden. Dieses Gen kodiert den Organischen Anionen-Transporter 2 (OAT2), welcher organische Anionen aus den Hepatozyten exportiert (Kobayashi *et al.*, 2005). Von den im Transkriptom signifikant differenziell exprimierten Genen die für Phase III-Transporter kodieren, konnte nur SLC22A7 auch in der Proteomanalyse in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen

unter SD sowie HFD mit erhöhten Abundanzen detektiert werden (siehe Kapitel 5.2.2.4). Weiterhin wurden für zwei ABC-Transporter der Familien a und c erhöhte bzw. verringerte mRNA-Mengen nachgewiesen. Sowohl unter SD als auch unter HFD zeigte *Abcc3*, welches das *Multidrug resistance-associated protein 3* (MRP3) kodiert, die am stärksten reprimierten mRNA-Mengen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung. MRP3 ist in der basolateralen Membran der Hepatozyten für den Export von organischen Anionen wie Glucuronid-, Sulfat- und Glutathion-Konjugaten und von Gallensalz-Konjugaten ins Blut verantwortlich (Slitt *et al.*, 2003; Trauner und Boyer, 2003). Studien konnten einen Einfluss der Diät in Leber- und Nierengewebe auf die Expression von *Slc22a7* und *Abcc3* feststellen (Cheng *et al.*, 2008; Fu und Klaassen, 2014). Außerdem wurde in Lebern hypothyreoter Ratten ein zu dieser Arbeit umgekehrtes Genexpressionsmuster mit verringerten mRNA-Mengen für *Slc22a7* und erhöhten für *Abcc3* beobachtet (Dong *et al.*, 2007).

Die hier diskutierten Transkriptomanalysen wurden chronologisch betrachtet im ersten Teil dieser Doktorarbeit durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen deuteten bereits auf eine 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Stimulation der Cholesterol- und Gallensäure-Biosynthese sowie eine Beeinflussung von für Xenobiotika-metabolisierende Enzyme kodierenden Genen hin. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden komplementäre Proteomanalysen der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäuse unter SD und HFD durchgeführt, welche diese 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelten Effekte auch auf Protein-Ebene widerspiegeln. Daher werden diese Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub>, wie bereits zuvor erwähnt, im folgenden Kapitel zusammen mit den Proteomergebnissen nochmals ausführlicher diskutiert.

### **5.2.2 Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät**

In der Proteomanalyse der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäuse unter SD und HFD im Vergleich zu Kontrolltieren konnten insgesamt 432 Proteine mit signifikant differenzieller Abundanz ( $p \leq 0,05$  oder Standardabweichung  $\geq 2$ ) und einem *fold change*  $\geq |1,5|$  identifiziert werden (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.10). Von diesen waren die Mengen von 223 Proteinen in Mäusen unter SD und von 272 Proteinen in Mäusen unter HFD signifikant verändert (Abbildung 4.9). Damit wurden in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD etwa 22 % mehr Proteine mit signifikant veränderter Abundanz als in Mäusen unter SD detektiert. Beim Vergleich signifikant differenzieller Proteinabundanzen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe konnten 63 Proteine (14,58 %) mit entsprechenden Veränderungen in beiden Gruppen identifiziert werden. Hierbei wiesen sämtliche Proteine mit einer Ausnahme die gleiche Richtung der Abundanz-Veränderung auf. Entsprechend zeigten 160 und 209 Proteine gruppenspezifische Effekte unter SD- und HFD-

Bedingungen. Die unter beiden Diät-Bedingungen betroffenen Proteine werden offensichtlich generell durch 3,5-T<sub>2</sub> beeinflusst, während jene, die nur unter HFD betroffen waren, Diät-spezifische und Fettleber-abhängige Effekte widerspiegeln.

Ein Hauptziel dieser Arbeit bestand in der physiologischen Interpretation der durch 3,5-T<sub>2</sub> vermittelten Effekte auf das hepatische Proteom der Mäuse unter SD und HFD. Dazu wurden zunächst *in silico-Pathway-Analysen* mit Hilfe der Software IPA durchgeführt, wobei ausschließlich signifikant differenziell abundante Proteine ( $p \leq 0,05$ ,  $fold\ change \geq |1,5|$ ) in die Analysen einbezogen wurden. Die zehn IPA-Pathways mit der größten Signifikanz wurden daraufhin tiefergehend weiteruntersucht (Abbildung 4.11, Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3). Dabei wurde deutlich, dass die den einzelnen Pathways zugeordneten Proteingruppen teilweise große Überlappungen zeigten. Deshalb wurden mehrere Pathways zu Gruppen mit gleichem physiologischen Bezug zusammengefasst, welche nachfolgend ausführlicher beschrieben und diskutiert sowie zu den Ergebnissen der komplementären Transkriptomanalyse in Beziehung gesetzt werden sollen.

### 5.2.2.1 Proteine der Mitose

Dem IPA-Pathway *Mitotic Roles of Polo-Like Kinase* werden insgesamt 38 Proteine zugeordnet. Vier davon wiesen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD signifikant veränderte Mengen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dazu zählte zum einen der Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A-Aktivator (PTPA), welcher 1,76-fach verringerte Abundanzen aufwies, und zum anderen das SMC3-Protein (*Structural maintenance of chromosomes protein 3*), welches 1,66-fach erhöhte Mengen zeigte. Die vertiefte Durchsicht der Proteomdaten der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäuse unter HFD zeigte, dass zwei der unter SD betroffenen Proteine ähnliche Mengenveränderungen auch unter HFD aufwiesen. Diese Proteine waren das SMC1A (*Structural maintenance of chromosomes protein 1A*), welches unter SD und HFD erhöhte Abundanzen zeigte (1,83- und 1,95-fach), sowie das Hitzeschockprotein 90B1 (HSP90B1), welches ebenfalls erhöhte Mengen unter SD und leicht erhöhte unter HFD aufwies (1,55- und 1,27-fach). Für keines der Proteine konnten auf mRNA-Ebene in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD oder HFD signifikante Expressionsänderungen beobachtet werden.

PTPA ist Teil der regulatorischen Untereinheit B des heterotrimeren Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A-Holoenzym, welches in die negative Kontrolle von Zellwachstum und Zellteilung involviert ist (Lillo *et al.*, 2014). Die Proteine SMC1A und SMC3 sind Komponenten des multimeren Cohesin-Proteinkomplexes, der die Schwesterchromatiden während der Mitose zunächst zusammenhält, um im späteren Verlauf der Zellteilung die korrekte Segregation der Chromosomen zu gewährleisten (Matityahu und Onn, 2018). HSP90B1, welches auch als Endoplasmin bezeichnet wird, ist ein Mitglied der 90 kDa-Familie der

Hitzeschockproteine, das als molekulares Chaperon im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und wichtige Funktionen in der Faltung zu sekretierender Proteine besitzt (Hoter *et al.*, 2018). Da PTPA als negativer Regulator der Zellproliferation mit verringerter Abundanz detektiert wurde sowie SMC1A und SMC3 als die Zellteilung fördernde Proteine mit erhöhten Mengen, könnte dies darauf hindeuten, dass 3,5-T<sub>2</sub> einen pro-proliferativen Effekt auf die Hepatozyten ausübt. Dieser Effekt konnte bereits für hohe Dosen der klassischen TH nachgewiesen werden (Severino *et al.*, 2011).

#### 5.2.2.2 Proteine der Blutgerinnung

Zu dem IPA-Pathway *Intrinsic Prothrombin Activation Pathway* zählen insgesamt 20 Proteine, von denen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD drei signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen. In 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD konnten von diesen drei Proteinen ebenfalls zwei mit signifikant veränderten Mengen detektiert werden. Während die  $\beta$ -Untereinheit von Fibrinogen (FGB) ausschließlich in Mäusen unter SD erhöhte Abundanzen zeigte (2,05-fach), wiesen das Plasma-Kallikrein (KLKB1) sowie das Protein C (PROC) sowohl unter SD als auch unter HFD verringerte Mengen auf (2,48- und 3,39-fach sowie 4,01 und 2,07-fach). Auf Transkript-Ebene konnte nur für *Klkb1* eine signifikante Verringerung der Expression in Mäusen unter SD detektiert werden (1,40-fach).

Beim Fibrinogen handelt es sich um einen von der Leber ins Blut sekretierten Proteinkomplex aus zwei Trimeren, die jeweils aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit bestehen, wobei FGB die  $\beta$ -Untereinheit repräsentiert. Bei der Blutgerinnung wird Fibrinogen durch Thrombin in Fibrin umgewandelt, welches zusammen mit den Thrombozyten einen Thrombus zum Wundverschluss bildet (Fish und Neerman-Arbez, 2012). KLKB1 ist in die Oberflächen-abhängige Aktivierung der Blutkoagulation involviert. Es wird als Präkallikrein von der Leber ins Blut sekretiert und mittels proteolytischer Spaltung durch Faktor XIIa aktiviert. Das aktive Plasma-Kallikrein kann wiederum Plasminogen zu Plasmin konvertieren und so die Fibrinolyse stimulieren (Irmischer *et al.*, 2018). Das Vitamin K-abhängige PROC ist ein Plasma-Glykoprotein, das ebenfalls von der Leber synthetisiert wird. PROC wird durch die Thrombin-vermittelte Proteolyse aktiviert und wirkt als Serinprotease antikoagulatorisch indem es Faktor Va und VIIIa proteolytisch inaktiviert (Danese *et al.*, 2010). Da in der Proteomanalyse erhöhte Mengen von FGB und verringerte von KLKB1 und PROC detektiert wurden, weist dies auf prothrombotische Bedingungen unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung hin. Für die klassischen TH ist der positive Zusammenhang zwischen Blutgerinnungsneigung und Serumkonzentration bereits mehrfach beschrieben (Squizzato *et al.*, 2007; van Zaane *et al.*, 2011; Stuijver *et al.*, 2012; Hooper *et al.*, 2012). Daher kann angenommen werden, dass die hier verwendete Dosis von 3,5-T<sub>2</sub> zu ähnlichen Effekten führt, indem die Mengen der

entsprechenden in der Leber synthetisierten und von ihr sekretierten Proteine beeinflusst werden.

### 5.2.2.3 Proteine des Citratzyklus

Der IPA-*Pathway Tricarboxylic Acid (TCA) Cycle II (Eukaryotic)* beschreibt den Citratzyklus, dem insgesamt 18 Proteine zugeordnet werden. In 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD konnten davon drei Proteine, namentlich die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\gamma$  der Isocitrat-Dehydrogenase 3 (IDH3A und IDH3G) sowie die Flavoprotein-Untereinheit A des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes (SDHA), mit erhöhter Abundanz identifiziert werden (2,02-, 1,62- und 1,66-fach). Die vertiefte Analyse der Proteomergebnisse ergab, dass IDH3A und IDH3G ebenso in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD in signifikant erhöhten Mengen vorlagen (1,79- und 1,93-fach). Die Transkriptomergebnisse zeigten nur für IDH3A in Mäusen unter SD korrespondierende positive Veränderungen der mRNA-Mengen (1,69-fach).

Die Proteine IDH3A und IDH3G repräsentieren die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten der heterotetrameren ( $\alpha\alpha\beta\gamma$ ) mitochondrialen NAD<sup>+</sup>-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase 3. Diese katalysiert den dritten Schritt des Citratzyklus, bei dem aus Isocitrat  $\alpha$ -Ketoglutarat entsteht und NAD<sup>+</sup> zu NADH umgewandelt wird (Soundar *et al.*, 2006). SDHA stellt eine katalytische Untereinheit der multimeren Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase dar, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Zudem besitzt SDHA die FAD-Bindestelle des Komplexes und katalysiert die Deprotonierung und Umwandlung von Succinat zu Fumarat, welche den sechsten Schritt des Citratzyklus darstellt (Rutter *et al.*, 2010). Demnach deuten die Proteomergebnisse auf eine 3,5-T<sub>2</sub>-induzierte Aktivierung des Citratzyklus in Mäusen unter SD sowie HFD hin. Von Jonas *et al.* (2015) konnte, in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen, eine erhöhte Aktivität der Citrat-Synthase unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung, vergleichbar mit den Effekten einer T<sub>3</sub>-Behandlung, in der Leber nachgewiesen werden. In mehreren Transkriptomanalysen mit verschiedenen Nager-Modellen konnte bereits gezeigt werden, dass die hepatische Expression von *Idh3a* durch klassische TH über den klassischen TR-vermittelten Signalweg induziert wird (Bungay *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2003; Ohba *et al.*, 2016). Daher könnte 3,5-T<sub>2</sub> zu einer ähnlichen Aktivierung des hepatischen TR (vermutlich TR $\beta$ ) führen, was in der Folge zu positiver transkriptioneller Regulation der entsprechenden Zielgene führen sollte.

### 5.2.2.4 Proteine des Glutathion- und Xenobiotika-assoziierten Stoffwechsels

Durch die *Pathway*-Analyse wurden mehrere *Pathways* identifiziert, die Glutathion- und Xenobiotika-assoziierten Stoffwechselwegen zugeordnet werden konnten. Dazu zählten die *Pathways Glutathione-mediated Detoxification, Glutathione Redox Reactions I, Xenobiotic*

*Metabolism Signaling, LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function, Heparan Sulfate Biosynthesis, Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages) und Triacylglycerol Degradation*, welche insgesamt 20, 18, 195, 155, 38, 34 und 25 Proteine beinhalten, von denen wiederum 7, 5, 11, 10, 4, 4 und 4 Proteine in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und/oder HFD signifikant veränderte Abundanzen aufwiesen. Nach Berücksichtigung der Überlappungen zwischen Proteinen der verschiedenen *Pathways* verblieben insgesamt 19 signifikant differenziell abundante Proteine. Von diesen stellten 14 für den Glutathion- und Xenobiotika-Metabolismus wesentliche detoxifizierende Phase I- und Phase II-Enzyme oder Proteine mit ähnlicher Funktion dar. Dies waren namentlich die Glutathion-S-Transferasen alpha 3 und 4 (GSTA3, GSTA4), mu 1, 2 und 7 (GSTM1, GSTM2, GSTM7), pi 1 (GSTP1) und theta 1 (GSTT1), die mikrosomale Glutathion-S-Transferase 1 (MGST1), die Carboxylesterasen 1e und 1g (CES1E, CES1G), die Sulfotransferasen 1 und 2 der Familien 1b und 1c (SULT1B1, SULT1C2), das Peroxiredoxin 6 (PRDX6) und die 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat (PAPS) Synthase 2 (PAPSS2) (Jancova *et al.*, 2010; Allocati *et al.*, 2018; Ross und Crow, 2007; Satoh und Hosokawa, 1998; Hatfield *et al.*, 2016; Perkins *et al.*, 2015; Poynton und Hampton, 2014; Hemmerich *et al.*, 2004). Von den 14 Proteinen wiesen 4 in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD (GSTM1, GSTM7, GSTP1, CES1E) und 11 in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD (GSTM1, GSTM2, GSTP1, GSTA3, GSTA4, MGST1, PRDX6, CES1E, CES1G, SULT1B1, SULT1C2) verringerte Abundanzen (zwischen 1,55- und 3,93-fach) auf. Nur GSTT1 und PAPSS2 zeigten erhöhte Mengen sowohl in Mäusen unter SD (2,01- und 2,49-fach) als auch unter HFD (1,79-fach und 2,49-fach).

Bei vertiefter visueller Inspektion der Proteomdaten konnten außerdem weitere Proteine des Glutathion- und Xenobiotika-assoziierten Stoffwechsels mit signifikanten Mengenveränderungen detektiert werden. Dazu zählten Enzyme der Cytochrom P450 (CYP)-Familie, wobei CYP51, CYP7B1 und CYP17A1 ausschließlich in Mäusen unter HFD und CYP2C70 sowie CYP39A1 in Mäusen unter SD und HFD mit erhöhten Abundanzen detektiert wurden (zwischen 2,61- und 20,87-fach). Da diese CYPs in die Biosynthese von Cholesterol, Gallensäuren und Sexualhormonen involviert sind werden sie in den folgenden Kapiteln (5.2.2.6, 5.2.2.7, 5.2.2.8) diskutiert. Zusätzlich zeigte CYP2A12 sowohl unter SD als auch HFD erhöhte Abundanzen (2,81- und 3,40-fach), während CYP2C37 und CYP4A12A nur in Mäusen unter SD verringerte Abundanzen aufwiesen (1,96- und 14,74-fach). CYP2F2 und CYP4F14 konnten nur in Mäusen unter HFD mit erhöhten bzw. verringerten Abundanzen (2,91- und 2,14-fach) nachgewiesen werden. Außerdem konnten drei weitere GSTs mit verringerten Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung detektiert werden. Zu ihnen zählten GSTM3 und GSTM6 in Mäusen unter SD und GSTA1 in Mäusen unter SD sowie HFD (zwischen 1,96- und 4,75-fach). Die Phase III-Transporter SLC22A7 und SLC25A12 wiesen

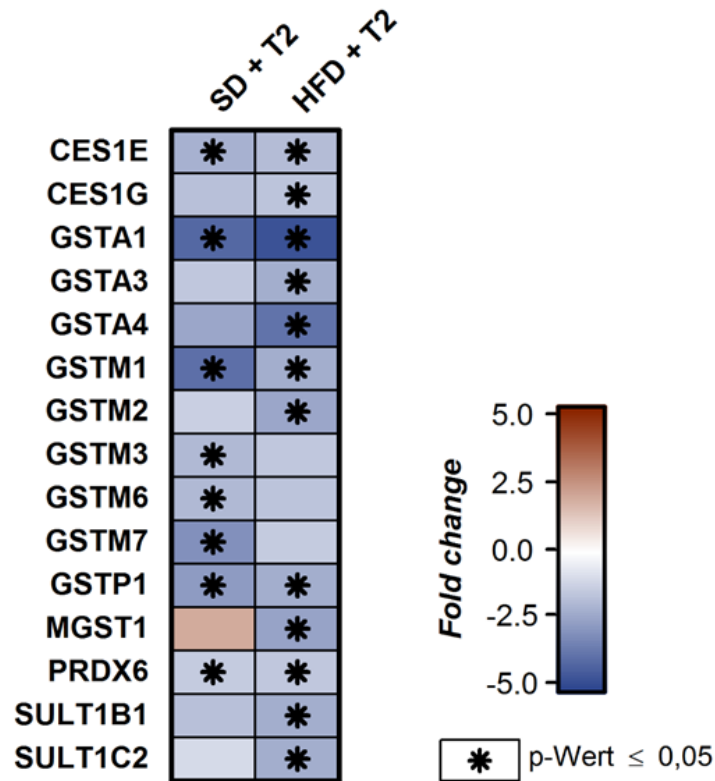
nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung unter SD sowie HFD bzw. nur unter HFD erhöhte Abundanzen auf (zwischen 3,14- und 100-fach).

Im korrespondierenden Transkriptom konnten für Mäuse unter SD nur für CYP2C37, CYP4A12A, GSTA1, GSTA4, GSTM1, GSTM6, GSTP1, GSTT1, PAPSS2 und SLC22A7 (zwischen 1,50- und 6,20-fach) und für Mäuse unter HFD nur für CYP4A12A, GSTA1, GSTA4, GSTM1, GSTM6, SULT1B1 und SLC22A7 (zwischen 1,49- und 9,82-fach) signifikant veränderte mRNA-Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 5.2). Folglich zeigen diese Ergebnisse, dass viele der identifizierten *Pathways* in den Glutathion- und Xenobiotika-Stoffwechsel involviert sind und diese Proteine überwiegend Phase I- und Phase II-Enzyme oder solche mit einer ähnlichen Funktion darstellen. Dabei wiesen die meisten Proteine verringerte Abundanzen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD auf, wobei dieser Effekt in Mäusen unter HFD deutlich ausgeprägter war.

Dabei fiel auf, dass zahlreiche dieser Proteine (GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM6, GSTM7, GSTP1, GSTA1, GSTA3, GSTA4, MGST1, PRDX6, CES1E, CES1G, SULT1B1, SULT1C2) durch Gene kodiert werden, die dem NRF2-Regulon zugeordnet sind (Abbildung 5.3) (Knight *et al.*, 2008; Chanas *et al.*, 2002; Yeager *et al.*, 2009; Chowdhury *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Alnouti und Klaassen, 2008). Der nukleäre Transkriptionsfaktor NRF2 (*nuclear factor, erythroid 2 like 2*) vermittelt Schutz vor oxidativem und zytotoxischem Stress, da er einen wesentlichen Regulator der zellulären Abwehr und Detoxifizierung darstellt (Martín-Montalvo *et al.*, 2011). Unter normalen Bedingungen mit niedrigen Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist NRF2 im Cytoplasma lokalisiert, wo es an KEAP1 (*kelch like ECH associated protein 1*) gebunden vorliegt. KEAP1 wiederum dient als Adapter für den Cullin 3/Ring Box 1 (CUL3/RBX1) E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, welcher NRF2 ubiquitiniert. Daraufhin wird NRF2 durch das 26S-Proteasom degradiert, weshalb NRF2 nur eine geschätzte Halbwertszeit von etwa 30 min besitzt. Unter oxidativem Stress mit erhöhten ROS-Konzentrationen werden vier konservierte Cystein-Reste in der BTB/Kelch-repeat-Region von KEAP1 oxidiert, wodurch NRF2 freigesetzt, stabilisiert und nachfolgend in den Zellkern transloziert wird. Im Zellkern bindet NRF2 an ARE (*antioxidant response element*)-Sequenzen in Promotorbereichen vieler Gene, die für Proteine der Glutathion-Synthese und antioxidative Enzyme kodieren (Vomhof-DeKrey und Picklo, 2012). Daraus folgt, dass erhöhte oder verringerte mRNA- und Proteinmengen von Genen des NRF2-Regulons entsprechende ROS-Konzentrationen reflektieren. Daher könnte die in dieser Arbeit beobachtete verringerte Abundanz von Proteinen, die dem NRF2-Regulon zugeordnet werden, eine 3,5-T<sub>2</sub>-induzierte Reduktion von ROS anzeigen. Hierfür spricht, dass es eine beschriebene positive Assoziation zwischen dem Leberfett-Gehalt und den hepatischen sowie systemischen ROS-Konzentrationen gibt (Koliaki *et al.*, 2015). Da die Mäuse unter HFD (50,2 ± 3,8 g) im Vergleich zu Tieren unter SD (29,9 ± 2,3 g) deutlich an Gewicht zugenommen haben (Lietzow *et al.*,

2016), ist davon auszugehen, dass sich auch der Leberfettgehalt unter HFD proportional erhöht hat. Für Bedingungen mit subklinisch und pathologisch erhöhtem Leberfett wurde gezeigt, dass die Leber zunächst in der Lage ist, sich durch gesteigerte mitochondriale Respiration daran anzupassen. Dies führt zu einer verstärkten Produktion von ROS, was wiederum zur Aktivierung der zellulären Abwehr, genauer gesagt des NRF2-Regulons, führt. Wenn die Lipidlast in der Leber jedoch weiter steigt und dieser lipotoxische Zustand chronisch wird, nimmt die mitochondriale Atmung immer mehr ab und es kommt zu ausgeprägten Protonen-Leckagen und mitochondrialer Entkopplung. Zudem steigen die ROS-Konzentrationen weiter an, wodurch die Kapazität des antioxidativen Schutzsystems schließlich überschritten wird und es so zu schädlichem zytotoxischem oxidativem Stress kommt (Koliaki *et al.*, 2015). Weiterhin sind für 3,5-T<sub>2</sub> anti-steatotische Effekte, wie die Stimulation von hepatischer Fettsäureoxidation und Fettverbrennung mehrfach beschrieben (Lanni *et al.*, 2005; Mollica *et al.*, 2009; de Lange *et al.*, 2011; Grasselli *et al.*, 2012). Für HFD-gefütterte Mäuse konnten mit dem gleichen experimentellen Design wie in dieser Studie nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung verringerte hepatische Triglycerid-Konzentrationen gezeigt werden (Jonas *et al.*, 2015). Daher könnten die in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen identifizierten verringerten Mengen von Proteinen, welche dem NRF2-Regulon angehören, eine Reduktion des Leberfettgehalts und damit assoziierte verringerte ROS-Konzentrationen bzw. oxidativen Stress anzeigen. Diese Signatur war in Mäusen unter HFD deutlich ausgeprägter als in Mäusen unter SD, was auf den deutlich höheren Lipid-Gehalt und folglich höhere ROS-Konzentrationen in Mäusen unter HFD zurückgeführt werden kann (Abbildung 5.3).

Allerdings sind auch andere Erklärungen für die beobachteten Effekte denkbar. So könnte 3,5-T<sub>2</sub> auch zur Aktivierung einer Proteinkinase führen, welche in der Folge die GSK3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ ) durch Phosphorylierung aktiviert, die dann wiederum NRF2 phosphoryliert, was zu dessen nukleärem Export und Degradation führt (Niture *et al.*, 2014). Dies würde ebenfalls zur reduzierten Expression von NRF2-Zielgenen führen. Jedoch scheint die Interpretation eines negativ regulierten NRF2-Regulons infolge reduzierten oxidativen Stresses durch die 3,5-T<sub>2</sub>-induzierte Reduktion des Leberfetts im Lichte der bekannten Zusammenhänge zwischen HFD, Leberfett, oxidativem Stress und der positiven Effekte von 3,5-T<sub>2</sub> eine plausiblere Erklärung für die beobachtete Proteom-Signatur darzustellen.



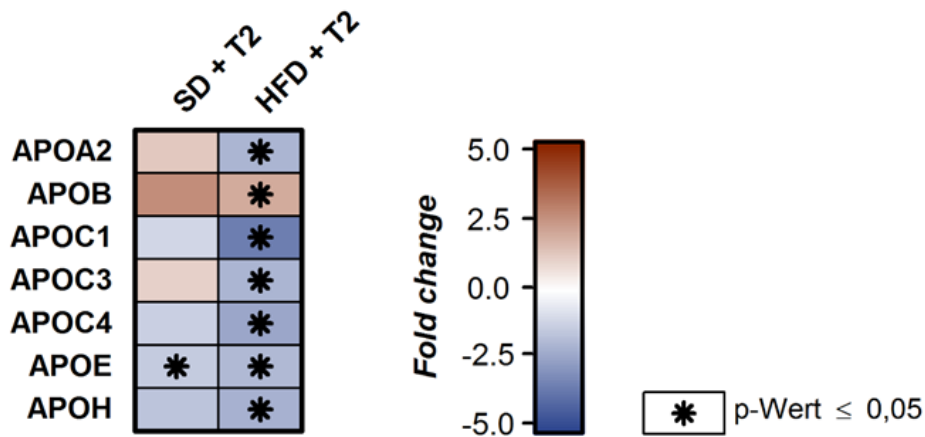
**Abbildung 5.3: Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Abundanz hepatischer NRF2-regulierter bzw. ROS-protektiver Proteine in Mäusen unter SD und HFD.** Dargestellt sind ausgewählte Proteine, die unter mindestens einer der beiden Bedingungen in SD- oder HFD-gefütterten 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen ( $p \leq 0,05$  (\*),  $fold\ change \geq |1,5|$ ). Proteine, welche nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung mit erhöhter Abundanz im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe detektiert wurden, sind rot und solche mit verringerter blau dargestellt. Proteine die einen  $fold\ change > |5,0|$  aufwiesen sind mit der dunkelsten Rot- bzw. Blaufärbung dargestellt.

#### 5.2.2.5 Proteine des Lipidstoffwechsels

Die *Pathway*-Analyse identifizierte mehrere *Pathways*, deren Proteine dem Lipidstoffwechsel zugeordnet werden konnten. Zu diesen zählten die *Pathways* *LXR/RXR Activation*, *FXR/RXR Activation*, *LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function*, *Atherosclerosis Signaling*, *Triacylglycerol Degradation* und *Oleate Biosynthesis II (Animals)*, welche insgesamt 84, 86, 155, 72, 25 und 7 Proteine beinhalten, von denen wiederum 9, 8, 10, 6, 4 und 2 Proteine signifikant veränderte Abundanzen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und/oder HFD zeigten. Von diesen verblieben insgesamt 25 signifikant differenziell abundante Proteine, nachdem die Überlappungen zwischen den einzelnen *Pathways* berücksichtigt wurden. Jedoch waren 8 dieser Proteine (GSTA3, GSTM1, GSTM2, GSTP1, MGST1, PAPSS2, SULT1B1, SULT1C2) ausschließlich im *Pathway* *LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function* enthalten, welcher nur zum Lipidstoffwechsel zugeordnet wurde, weil er ebenfalls die Proteine APOE und APOC4 beinhaltet. Da diese 8 Proteine sowie CES1E und PRDX6,

welche ausschließlich dem *Pathway Triacylglycerol Degradation* zugeordnet wurden, bereits in Kapitel *Proteine des Glutathion- und Xenobiotika-assoziierten Stoffwechsels* (5.2.2.4) diskutiert wurden, wird nachfolgend nicht weiter auf sie eingegangen.

Von den verbliebenen 15 Proteinen stellten 5 die Apolipoproteine APOA2, APOB, APOC4, APOE und APOH dar (Abbildung 5.4). APOA2 ist das Protein mit der zweithöchsten Abundanz in *high density* Lipoprotein (HDL)-Partikeln in der Zirkulation und ist außerdem in den von der Leber sekretierten *very low density* Lipoprotein (VLDL)-Partikeln enthalten. Das in der Leber synthetisierte APOB (APOB100) ist das primäre Apolipoprotein von VLDL sowie von *intermediate* und *low density* Lipoprotein (IDL und LDL)-Partikeln (Dominiczak und Caslake, 2011). APOC4, das ebenfalls in der Leber synthetisiert wird, ist im humanen Plasma bei normalen Triglycerid-Spiegeln an VLDL und HDL gebunden, wobei seine Konzentration mit den Triglycerid-Spiegeln korreliert (Kotite *et al.*, 2003). APOE ist in den Lipoprotein-Partikel-Klassen VLDL, LDL und HDL vorhanden (Dominiczak und Caslake, 2011). APOH, welches früher als Beta-2-Glycoprotein 1 bekannt war, ist ein Apolipoprotein mit diversen physiologischen Funktionen, wobei es unter anderem das Haupt-Autoantigen im Antiphospholipid-Syndrom darstellt und auch an der Koagulation beteiligt ist (Schwarzenbacher *et al.*, 1999; Giannakopoulos *et al.*, 2011). Bei vertiefter manueller Durchsicht der Proteomdaten konnten zudem zwei weitere Apolipoproteine der Klasse APOC, namentlich APOC1 und APOC3, als signifikant verändert nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung identifiziert werden (Abbildung 5.4). APOC1 und APOC3 werden in der Leber synthetisiert und sind Bestandteil von VLDL und HDL (Dominiczak und Caslake, 2011). Die Apolipoproteine APOA2, H, C1, C3 und C4 wiesen verringerte Mengen ausschließlich in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD auf (zwischen 2,09- und 3,53-fach), während APOE sowohl unter HFD als auch unter SD verringerte Abundanzen zeigte (1,96- und 1,46-fach). Eine Verringerung von hepatischem APOE um 40 % konnte ebenfalls in einer anderen Studie an HFD-gefütterten LDL-Rezeptor (LDLR)-Knockout (*Ldl*<sup>-/-</sup>)-Mäusen nach einwöchiger Behandlung mit 3,5-T<sub>2</sub> im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden. Dabei wurden Proteomanalysen basierend auf zweidimensionaler Gelelektrophorese mit anschließender Identifikation der Proteine mittels Massenspektrometrie genutzt (Moreno *et al.*, 2016). Erhöhte Protein-Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung konnten nur für APOB (1,93-fach) in Mäusen unter HFD beobachtet werden. Im korrespondierenden Transkriptom konnte für keines der Apolipoproteine eine signifikant veränderte Transkriptmenge detektiert werden.



**Abbildung 5.4:** Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Abundanz hepatischer Apolipoproteine in Mäusen unter SD und HFD. Dargestellt sind ausgewählte Proteine, die unter mindestens einer der beiden Bedingungen in SD- oder HFD-gefütterten 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen ( $p \leq 0,05$  (\*),  $fold\ change \geq |1,5|$ ). Proteine, welche nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung mit erhöhter Abundanz im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe detektiert wurden, sind rot und solche mit verringerter blau dargestellt. Proteine die einen  $fold\ change > |5,0|$  aufwiesen sind mit der dunkelsten Rot- bzw. Blaufärbung dargestellt.

Auffällig bei den nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung signifikant differenziell abundanten Apolipoproteinen ist, dass sie mehrheitlich Bestandteile von VLDL-Partikeln darstellen und daher für den sogenannten *Fuel Transport Pathway* wesentlich sind, welcher den Transport von Triglyceriden von der Leber in das periphere Gewebe bewerkstelligt (Dominiczak und Caslake, 2011). Die in dieser Proteomanalyse als differenziell abundant detektierten Apolipoproteine zeigten bis auf APOB, welches nur in HFD-gefütterten Mäusen erhöht war, alle verringerte Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung. Dies war zudem bis auf APOE, welches auch unter SD verringert war, nur in Mäusen unter HFD zu beobachten. Eine Erklärung hierfür könnte in der bereits zuvor erwähnten reduzierten hepatischen Triglycerid-Konzentration in Mäusen unter HFD nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung aufgrund der anti-steatotischen Effekte von 3,5-T<sub>2</sub> bestehen. Da unter HFD-Bedingungen die hepatische Produktion von VLDL-Partikel erhöht ist (Choi und Ginsberg, 2011), sollten diese Effekte durch die 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung zumindest teilweise wieder umgekehrt werden. Daher spiegeln die verringerten Mengen der Apolipoproteine wahrscheinlich die verminderte Synthese der VLDL-Partikel infolge der reduzierten Triglycerid-Konzentrationen in der Leber wider. In diesem Zusammenhang ist auch die erhöhte Abundanz von APOB (APOB100) in HFD-gefütterten Mäusen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung interessant, da es das primäre Apolipoprotein von VLDL darstellt: Im Rahmen des sogenannten *Overflow Pathways* werden VLDL-Remnants (Überreste von VLDL, die IDL entsprechen) in die Leber internalisiert. Parallel dazu werden die VLDL-Remnants durch Lipolyse abgebaut, welche durch die im Endothel der Leberkapillaren lokalisierte hepatische Triglycerid-Lipase (HTGL) katalysiert wird. Dabei verlieren die VLDL-Remnants APOC und

APOE und werden zu LDL-Partikeln, die folglich auch überwiegend aus APOB100 bestehen. APOB100 kontrolliert die hepatische Internalisierung von LDL durch Bindung an den APOB/E (LDL)-Rezeptor. Bei dieser LDL-Internalisierung wird entsprechend auch APOB100 wieder in die Leber aufgenommen (Dominiczak und Caslake, 2011). Einer der bekannten Effekte des klassischen TH T<sub>3</sub> besteht in der Stimulation der Expression von *Ldlr*, welches den APOB/E (LDL)-Rezeptor kodiert (Coppola *et al.*, 2014). Dieser Effekt könnte auch durch 3,5-T<sub>2</sub> vermittelt werden und somit zur erhöhten Aufnahme von APOB in die Leber führen, was wiederum in den hier analysierten 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD beobachtet werden konnte.

Zu den 10 weiteren Proteinen die dem Lipidstoffwechsel zugeordnet werden konnten, zählten die Farnesyldiphosphat-Farnesyltransferase 1 (FDFT1) und die Lanosterin 14- $\alpha$ -Demethylase (CYP51), die beide mit erhöhten Abundanzen (3,08- und 5,36-fach) ausschließlich in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD identifiziert wurden (Abbildung 5.5). Auf Transkript-Ebene konnte nur für CYP51 eine signifikant erhöhte Genexpression in HFD-gefütterten Mäusen nachgewiesen werden (2,78-fach). FDFT1, welches auch als Squalensynthase (SQS) bezeichnet wird, katalysiert die zweistufige Dimerisierungsreaktion von zwei Molekülen Farnesyldiphosphat zu Squalen. Dies stellt die erste Reaktion in der mehrstufigen Sterol-Biosynthese aus Squalen dar. CYP51 ist ein Cytochrom P450 Enzym, welches in einer dreistufigen Reaktion Lanosterin zu 4,4-Dimethyl-5 $\alpha$ -cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol und 24,25-Dihydrolanosterin zu 4,4-Dimethyl-5 $\alpha$ -cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol konvertiert. Diese Katalyse ist der erste Schritt in der Transformation von Lanosterin zu anderen Sterolen, zu denen auch Cholesterol zählt (Mazein *et al.*, 2013). Daher kontrollieren sowohl FDFT1 als auch CYP51 Schlüsselreaktionen der Cholesterol-Biosynthese.

Weiterhin waren die Mengen der beiden Proteine Monoglycerid-Lipase (MGLL) und Fettsäure-Desaturase 2 (FADS2) sowohl in Mäusen unter SD (2,31- und 2,30-fach) als auch unter HFD (2,52- und 3,98-fach) nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung erhöht. Im korrespondierenden Transkriptom konnten nur für MGLL in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD erhöhte mRNA-Mengen (1,76-fach) nachgewiesen werden. MGLL katalysiert die Hydrolyse von Monoacylglycerid zu Glycerin und freien Fettsäuren im Kontext der Lipolyse von Triglyceriden (Jaworski *et al.*, 2007). FADS2 hingegen verstärkt die hepatische Synthese von hoch ungesättigten Fettsäuren indem es Doppelbindungen zwischen bestimmten Kohlenstoffatomen der Fett-Acyl-Kette einführt (Hayashi *et al.*, 2018).

Das Cytochrom b5 Typ a (CYB5A) und die Pankreaslipase (PNLIP) zeigten sowohl in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD (1,62- und 2,58-fach) als auch unter HFD (1,83- und 1,72-fach) verringerte Abundanzen. Auf Transkript-Ebene konnten hier keine korrespondierenden Änderungen beobachtet werden. CYB5A ist ein Elektronenüberträger für verschiedene Membran-gebundene Oxygenasen und stellt in der Nebenniere einen wichtigen Regulator für

die Androstendion-Produktion dar. Dabei agiert er als ein allosterischer Effektor, der mit dem Steroid-17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20 Lyase (CYP17A1) / Oxidoreduktase-Komplex interagiert um die 17,20-Lyase-Aktivität zu stimulieren (Nakamura *et al.*, 2015). Die Pankreaslipase wird vom Pankreas in den Dünndarm sekretiert und hydrolysiert dort Triglyceride, was eine essentielle Reaktion für die effiziente Verdauung von Triglyceriden aus der Nahrung darstellt (Lowe, 1997).

Darüber hinaus gab es weitere Proteine die ausschließlich in Mäusen unter HFD signifikante Änderungen zeigten. Unter 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung wiesen das TH-Transportprotein Transthyretin (TTR), das Plasmaprotein Albumin (ALB) und das Gluconeogenese-Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1) verringerte Proteinmengen auf (1,63-, 1,68- und 1,81-fach). Nur die alpha Untereinheit der Plättchenaktivierenden-Faktor-Acetylhydrolase 1b (PAFAH1B1) zeigte erhöhte Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung (1,64-fach). Für keines dieser Proteine konnten korrespondierende Änderungen auf Transkript-Ebene beobachtet werden.

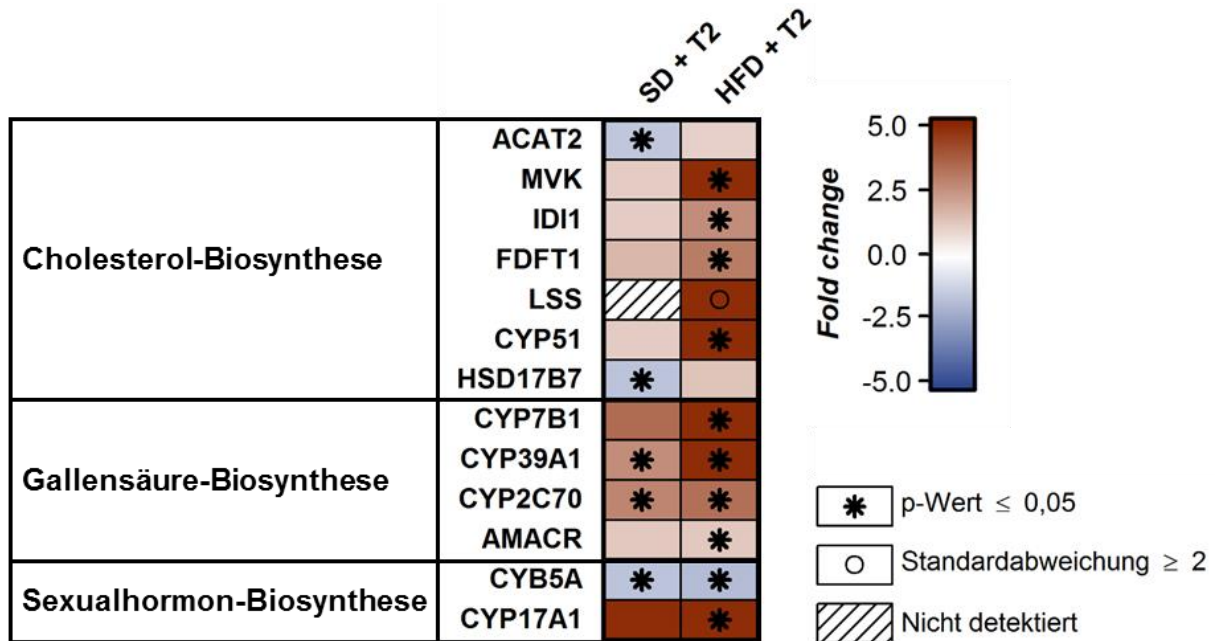
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mehrheit der differenziell abundanten Proteine, die in den Lipidstoffwechsel involviert sind und einem der sechs IPA-*Pathways* zugeordnet wurden, Apolipoproteine und Enzyme, die an der Sterol-Biosynthese und Lipid-Degradation beteiligt sind, darstellen. Dabei wurden deutlich mehr signifikante Änderungen der Proteinmengen in Mäusen unter HFD als unter SD beobachtet. Hervorzuheben ist zudem, dass zwei Enzyme des Sterol-Anabolismus, namentlich FDFT1 und CYP51, mit erhöhten Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung ausschließlich in Mäusen unter HFD detektiert wurden, was auf eine Stimulation der Sterol-Biosynthese durch 3,5-T<sub>2</sub> hindeutet.

### 5.2.2.6 Proteine der Cholesterol-Biosynthese

Die Detektion erhöhter Mengen von FDFT1 und CYP51 nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung ausschließlich in Mäusen unter HFD legte es nahe die Proteomdaten auch über die *Pathway*-Analysen hinaus genauer hinsichtlich einer Beeinflussung des Sterol-Stoffwechsels auszuwerten. Dabei stellte sich heraus, dass einige weitere in den Sterol-Stoffwechsel involvierte Proteine signifikant differenzielle Abundanzen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD aufwiesen (Abbildung 5.5).

Die cytosolische Acetyl-CoA-Acetyltransferase ACAT2, welche die Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA katalysiert, und das Protein HSD17B7, welches als 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase an der Sexualhormon-Biosynthese und als 3-Ketosteroid-Reduktase an der Cholesterol-Biosynthese beteiligt ist (Mazein *et al.*, 2013), zeigten verringerte Abundanzen ausschließlich in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD (1,52- und 1,65-fach). Die korrespondierenden Transkriptmengen der beiden Proteine waren hingegen unverändert. In HFD-gefütterten Mäusen wurden nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung zwei peroxisomale Enzyme mit erhöhten Abundanzen detektiert, die unter SD jedoch keine

Änderungen zeigten. Diese Proteine waren zum einen die Mevalonatkinase (MVK, 6,38-fach), welche die Phosphorylierung von Mevalonat zu Phosphomevalonat katalysiert, und zum anderen die Isopentenylidiphosphat-Isomerase 1 (IDI1, 2,67-fach), welche die Isomerisierung von Isopentenylidiphosphat zu Dimethylallyldiphosphat katalysiert (Mazein *et al.*, 2013). Für IDI1 konnten im korrespondierenden Transkriptom ebenfalls erhöhte mRNA-Mengen detektiert werden (3,21-fach).



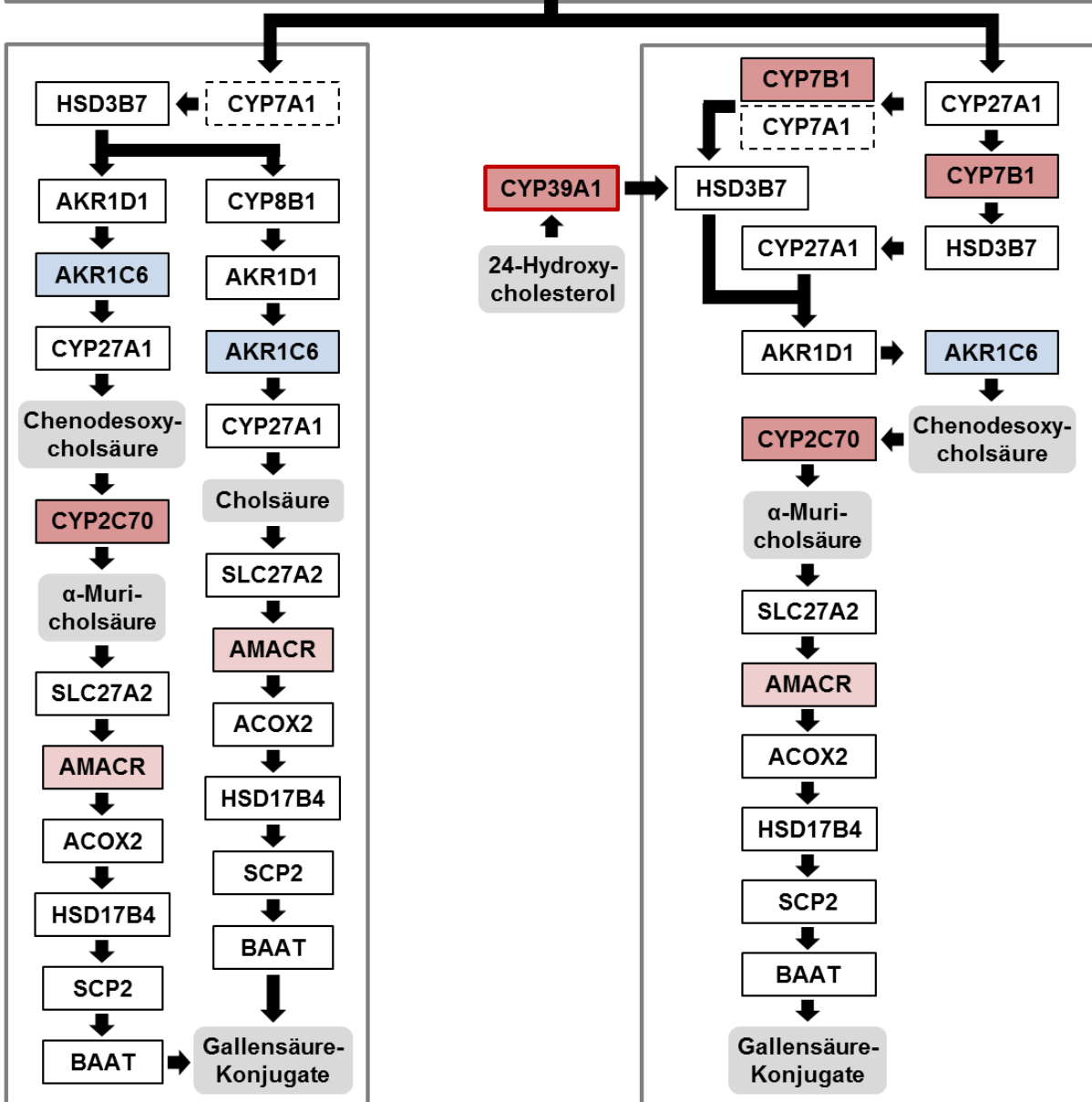
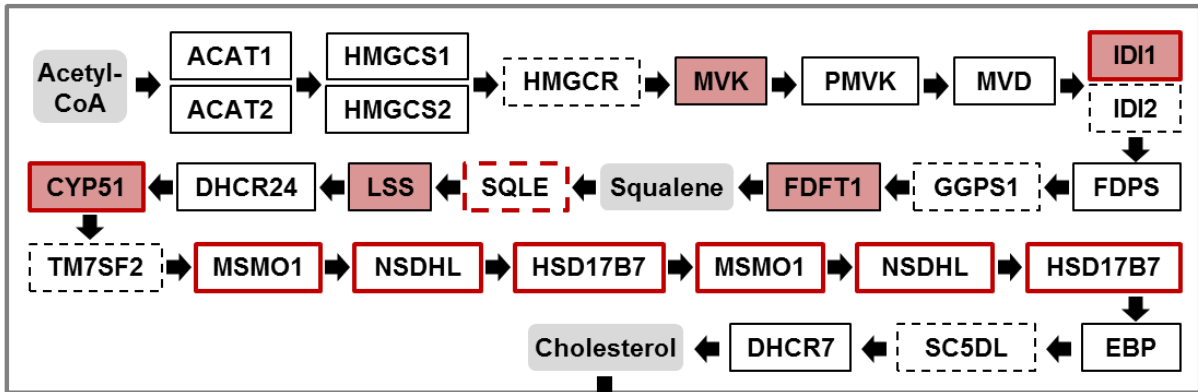
**Abbildung 5.5: Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Abundanz ausgewählter hepatischer Proteine in Mäusen unter SD und HFD.** Dargestellt sind spezifische Proteine ausgewählter *Pathways*, die unter mindestens einer der beiden Bedingungen in SD- oder HFD-gefütterten 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen ( $p \leq 0,05$  (\*), Standardabweichung  $\geq 2$  (○),  $fold\ change \geq |1,5|$ ; Ausnahme AMACR:  $fold\ change \geq |1,24|$ ). Proteine, welche nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung mit erhöhter Abundanz im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe detektiert wurden, sind rot und solche mit verringerter blau dargestellt. Proteine die einen  $fold\ change > |5,0|$  aufwiesen sind mit der dunkelsten Rot- bzw. Blaufärbung dargestellt. Proteine, die in einer der beiden Bedingungen nicht detektiert werden konnten, sind diagonal gestreift dargestellt.

Da die Mengen weiterer Enzyme der Cholesterol-Biosynthese nicht als signifikant differenziell abundant detektiert werden konnten, wurden die restlichen 18 involvierten Enzyme individuell im gesamten Proteomdatensatz analysiert (Abbildung 5.6). Dabei konnten 11 Proteine in mindestens einem Vergleich (SD oder HFD) in mindestens drei Tieren in beiden experimentellen Gruppen (Kontrolle und 3,5-T<sub>2</sub>) detektiert werden. Jedoch konnten hier keine signifikanten Veränderungen nach Durchführung des Welch-Tests identifiziert werden. Zu diesen Proteinen zählten ACAT1 (mitochondriale Acetyl-CoA-Acetyltransferase), HMGCS1 und HMGCS2 (cytosolische und mitochondriale Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase),

PMVK (Phosphomevalonat-Kinase), MVD (Diphosphomevalonat-Decarboxylase), FDPS (Farnesyl-Diphosphat-Synthase), DHCR24 (Sterol- $\Delta$ 24-Reduktase), MSMO1 (Methylsterol-Monooxygenase 1), NSDHL (Sterol-4 $\alpha$ -carboxylat-3-Dehydrogenase), EBP (3 $\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta$ 8,  $\Delta$ 7-Isomerase) und DHCR7 (7-Dehydrocholesterol-Reduktase). Weiterhin konnten sechs Proteine in keiner der insgesamt 15 untersuchten Proben detektiert werden. Diese Proteine waren namentlich HMGCR (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase), IDI2 (Isopentenylidiphosphat-Isomerase 2), GGPS1 (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase), SQLE (Squalen-Monooxygenase), TM7SF2 (Sterol- $\Delta$ 14-Reduktase) und SC5DL (Lathosterol-Oxidase). Eine Besonderheit stellt die Lanosterin-Synthase (LSS) dar, welche ausschließlich in der Gruppe 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäusen unter HFD in allen vier Tieren detektiert werden konnte, während in den anderen Gruppen keine verlässliche Detektion möglich war. Daher wurde LSS, basierend auf der Auswertung nach der 2-fachen Standardabweichung, als ein weiteres Enzym der Cholesterol-Biosynthese mit erhöhter Abundanz kategorisiert.

Folglich zeigten mit MVK, IDI1, FDFT1, LSS und CYP51 fünf der 24 in die Cholesterol-Biosynthese involvierten Enzyme erhöhte Abundanzen ausschließlich in Mäusen unter HFD nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung. Hingegen wiesen zwei Enzyme, namentlich ACAT2 und HSD17B7, nur in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD verringerte Mengen auf. Über die sechs nicht detektierten Proteine kann folglich keine Aussage bezüglich ihres Verhaltens nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung getroffen werden, während weitere 11 Proteine keine signifikanten Veränderungen in ihrer Abundanz aufwiesen. In der korrespondierenden Transkriptomanalyse konnte außerdem für *Idi1*, *Sqle*, *Cyp51*, *Msmo1*, *Nsdhl* und *Hsd17b7* eine erhöhte Expression (zwischen 1,77- und 4,76-fach) ausschließlich in HFD-gefütterten Mäusen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung beobachtet werden. Für *Hmgcr* konnte in der Transkriptomanalyse keine differenzielle Expression gezeigt werden. Jedoch konnte in einer anderen Studie eine durch das klassische TH T<sub>3</sub> vermittelte Induktion nachgewiesen werden (Ness *et al.*, 1990). Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der Proteom- und Transkriptomanalyse daher auf eine 3,5-T<sub>2</sub>-induzierte Stimulation der Cholesterol-Biosynthese in HFD-gefütterten Mäusen hin, während in Mäusen unter SD eine reduzierte Biosynthese interpretiert werden könnte.

Cholesterol-Biosynthese-Pathway



Klassischer Gallensäure-Biosynthese-Pathway

Alternativer Gallensäure-Biosynthese-Pathway

Abbildung 5.6: Darstellung der Pathways zur Cholesterol- sowie klassischen und alternativen Gallensäure-Biosynthese, die den Einfluss von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Mengen darin involvierter hepatischer Proteine und korrespondierender Transkripte in Mäusen unter HFD zeigt. Proteine sind in viereckigen Umrahmungen dargestellt, wobei ein durchgehender Rand in der vorliegenden

Proteomanalyse detektierte Proteine und ein gestrichelter nicht detektierte Proteine kennzeichnet. Ein roter Hintergrund markiert Proteine mit signifikant erhöhten Abundanzen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren, während ein blauer Hintergrund Proteine mit signifikant verringerten markiert ( $p \leq 0,05$  oder Standardabweichung  $\geq 2$ , *fold change*  $\geq 1,5$  (dunkler Hintergrund) oder *fold change*  $\geq 1,2$  (heller Hintergrund)). Eine rote Umrahmung markiert korrespondierende Transkripte mit signifikant erhöhten Mengen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ( $p \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq 1,5$ ). Die Pfeile kennzeichnen die Richtung des metabolischen Flusses und die jeweiligen Metabolite sind grau hinterlegt. Einzelheiten siehe Text (nach Mazein *et al.*, 2013; Russell, 2003; Norlin und Wikvall, 2007).

### 5.2.2.7 Proteine der Gallensäure-Biosynthese

Im Kontext der Detektion differenziell abundanter Enzyme der Cholesterol-Biosynthese fiel auf, dass auch einige Proteine, die dem Cholesterol-Biosynthese-*Pathway* nachgeschaltet sind und in die Gallensäure-Biosynthese involviert sind, signifikant differenzielle Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung aufwiesen. Dazu zählten die beiden Oxysterol-7- $\alpha$ -Hydroxylasen CYP7B1 und CYP39A1 sowie die Chenodesoxycholsäure-6-Hydroxylase CYP2C70, welche in Mäusen unter HFD 4,96-, 13,83- und 3,37-fach erhöhte Proteinmengen zeigten. In Mäusen unter SD hingegen waren diese Effekte deutlich abgeschwächt, da CYP39A1 und CYP2C70 nur 2,61- und 2,81-fach erhöhte Abundanzen zeigten und CYP7B1 zwar eine 3,46-fache, jedoch keinen signifikanten  $p$ -Wert aufwies (Abbildung 5.5). Auf Transkript-Ebene konnten nur für CYP39A1 2,85-fach erhöhte Mengen in Mäusen unter HFD detektiert werden, während für CYP7B1 und CYP2C70 keine korrespondierenden Änderungen unter SD und HFD beobachtet werden konnten.

CYP7B1, welches in der Leber hochabundant ist, katalysiert die 7 $\alpha$ -Hydroxylierung von 27-Hydroxycholesterol und 3 $\beta$ -Hydroxy-5-Cholestensäure zu 7 $\alpha$ ,27-Dihydroxycholesterol und 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5-cholestensäure. Diese beiden Cholesterol-Derivate stellen Vorstufen der Chenodesoxycholsäure im alternativen bzw. sauren *Pathway* der Gallensäure-Biosynthese dar, welcher in Mäusen 25 bis 30 % der Gallensäuren synthetisiert (Russell, 2003; Norlin und Wikvall, 2007; Lorbek *et al.*, 2012).

Die 7- $\alpha$ -Hydroxylase CYP39A1 konvertiert 24-Hydroxycholesterol zu 7 $\alpha$ ,24-Dihydroxycholesterol. Interessanterweise wird im Menschen 24-Hydroxycholesterol nicht in der Leber, sondern überwiegend im Gehirn synthetisiert. Der Haupt-*Pathway* zur Eliminierung von überschüssigem Cholesterol in Neuronen des Gehirns ist die Hydroxylierung zu 24-Hydroxycholesterol, welche durch CYP46A1 katalysiert wird. Die Expression von *Cyp46a1* erfolgt dabei ausschließlich im Gehirn. Aufgrund der angefügten Hydroxylgruppe kann 24-Hydroxycholesterol lipophile Membranen wie die Blut-Hirn-Schranke deutlich besser passieren als Cholesterol (Zhang und Liu, 2015). Über den Blutstrom gelangt 24-Hydroxycholesterol in die Leber, wo CYP39A1 es zu 7 $\alpha$ ,24-Dihydroxycholesterol konvertiert,

bevor es im alternativen bzw. sauren *Pathway* der Gallensäure-Biosynthese zu Chenodesoxycholsäure weiterprozessiert wird (Norlin und Wikvall, 2007). Der Cholesterolfstoffwechsel im Gehirn ist von dem des restlichen Körpers stark abgegrenzt und basiert primär auf der *de novo* Synthese, da die Blut-Hirn-Schranke die Aufnahme von Lipoproteinen aus der Zirkulation verhindert (Zhang und Liu, 2015). Daher stellt beim Menschen das Gehirn die einzige Quelle für 24-Hydroxycholesterol dar, dessen Konzentration in der Zirkulation folglich nicht durch die ernährungsbedingte Cholesterolfaufnahme beeinflusst wird. In Mäusen hingegen konnte in Experimenten mit Deuterium-markiertem Cholesterolf in der Nahrung gezeigt werden, dass 50 % des zirkulierenden 24-Hydroxycholesterols aus dem Gehirn stammen, während die andere Hälfte jedoch extracerebralen Ursprungs ist und höchstwahrscheinlich überwiegend in der Leber synthetisiert wird (Meaney *et al.*, 2000). Demzufolge wurde postuliert, dass ein hepatisches Enzym mit entsprechender Aktivität existieren muss. Diese Hypothese konnte in Mäusen, welche homozygot für ein Nullallel im CYP46A1 kodierenden Gen (*Cyp46a1<sup>-/-</sup>*) waren, verifiziert werden, da hier dennoch 24-Hydroxycholesterolf in der Zirkulation detektiert werden konnte (Lund *et al.*, 1999). Die Identität dieses Enzyms ist jedoch noch unbekannt. Stimmigerweise zeigten sich in den hepatischen Transkriptomanalysen sogar verringerte mRNA-Mengen von *Cyp46a1* in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD (1,95-fach).

CYP2C70 ist für die Spezies-Unterschiede im Gallensäure-Stoffwechsel zwischen Menschen und Mäusen verantwortlich: Während in Mäusen CYP2C70 Chenodesoxycholsäure an Position 6 hydroxyliert um  $\alpha$ -Muricholsäure zu bilden, sind Menschen dazu nicht in der Lage (Takahashi *et al.*, 2016).

Da ähnlich zur Cholesterolf-Biosynthese auch in der Gallensäure-Biosynthese neben den bereits beschriebenen drei Proteinen CYP7B1, CYP39A1 und CYP2C70 keine weiteren Proteine als differenziell abundant detektiert wurden, wurde weiterhin untersucht, ob letztere überhaupt in der Proteomanalyse detektiert werden konnten. Von den insgesamt 15 untersuchten Proteinen, welche in die klassische und alternative Biosynthese der Gallensäuren sowie die Konjugation von Gallensäuren involviert sind, konnten 14 Proteine in allen analysierten Proben detektiert werden. Jedoch wiesen davon neun Proteine keine signifikant differenziellen Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung auf. Dazu zählten die Proteine HSD3B7 (3 $\beta$ -Hydroxy- $\Delta$ 5-C27-Steroid-Oxidoreduktase), AKR1D1 ( $\Delta$ 4-3-Oxosteroid-5 $\beta$ -Reduktase), CYP8B1 (Sterol-12 $\alpha$ -Hydroxylase), CYP27A1 (Sterol-27-Hydroxylase), SLC27A2 (*Very long-chain* Acyl-CoA-Synthetase), ACOX2 (peroxisomale *branched-chain* Acyl-CoA Oxidase 2), HSD17B4 (peroxisomales multifunktionales Enzym Typ 2), SCP2 (Nicht-spezifisches Lipid-Transfer-Protein) und BAAT (Gallensäure-CoA:Aminosäure-N-Acyltransferase). Hervorzuheben sind außerdem AMACR ( $\alpha$ -Methylacyl-CoA-Racemase) und AKR1C6 (Estradiol-17 $\beta$ -Dehydrogenase 5), welche zwar signifikante *p*-Werte in HFD-

gefütterten Mäusen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung besaßen, jedoch nur leicht erhöhte bzw. verringerte Abundanzen (1,24-fach und 1,37-fach) aufwiesen. CYP7A1 (Cholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase) hingegen konnte in keiner der analysierten Leberproben detektiert werden. Im korrespondierenden Transkriptom konnten für keines dieser Proteine signifikante Mengenveränderungen beobachtet werden.

Folglich deuten die erhöhten Mengen von CYP7B1, CYP39A1, CYP2C70 sowie AMACR auf eine Stimulation der Gallensäure-Biosynthese in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD hin. Tatsächlich ist für die klassischen TH die Stimulation der Umwandlung von Cholesterol zu Gallensäuren bekannt (Mullur *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014). Dabei wurde vor allem die transkriptionelle Induktion des Gens, welches für das Enzym CYP7A1 kodiert, das den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt im Abbau von Cholesterol zu 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol im klassischen Gallensäure-Biosynthese-*Pathway* katalysiert, als wichtiger regulatorischer Mechanismus beschrieben (Mullur *et al.*, 2014; Sinha *et al.*, 2014). Da CYP7A1 in dieser Proteomanalyse nicht detektiert werden konnte und somit keine Aussage über den Einfluss von 3,5-T<sub>2</sub> auf die Abundanz von CYP7A1 möglich war, wurde zusätzlich die relative Gesamtmenge von CYP7A1 mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Dabei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte der 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäuse unter SD und HFD im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren gemessen werden (Abbildung 4.12 A + B). Der Vergleich der SD und HFD Kontroll-Mäuse untereinander ergab in HFD Tieren eine 1,99-fach erhöhte relative Gesamtmenge an CYP7A1 gegenüber den Mäusen unter SD (Abbildung 4.12 C). Weiterhin zeigte auch die Transkriptomanalyse keine veränderten mRNA-Mengen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD. In zahlreichen Transkriptomanalysen zur Untersuchung von hepatischen TH-Effekten in Nagern konnten allerdings lediglich in einer Studie mit Ratten erhöhte mRNA-Mengen von CYP7A1 nach 3-stündiger T<sub>3</sub>-Behandlung gezeigt werden (Bungay *et al.*, 2008). In anderen Studien mit Mäusen, die für 2 h bis zu 15 Tagen mit T<sub>3</sub> behandelt wurden, konnten keine entsprechenden Expressionsänderungen beobachtet werden (Feng *et al.*, 2000; Flores-Morales *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2003; Ohba *et al.*, 2016). Dies galt ebenso für weitere Studien mit Ratten, die eine T<sub>3</sub>-Behandlung für 6 bis 48 h erhielten (Weitzel *et al.*, 2001; Weitzel *et al.*, 2003; Severino *et al.*, 2011).

Unabhängig von CYP7A1, welches die initiale Hydroxylierung im klassischen Gallensäure-Biosynthese-*Pathway* katalysiert, deuten die erhöhten Abundanzen von CYP7B1, CYP39A1 und CYP2C70 auf einen verstärkten metabolischen Fluss über den alternativen Gallensäure-Biosynthese-*Pathway* und eine dadurch vermittelte gesteigerte Gallensäure-Biosynthese hin. Hierbei wird Cholesterol zunächst durch CYP27A1 zu 27-Hydroxycholesterol hydroxyliert und dann weiter zu 3 $\beta$ -Hydroxy-5-Cholestensäure oxidiert. Beide Intermediate werden anschließend von CYP7B1 zu 7 $\alpha$ ,27-Dihydroxycholesterol und 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-5-cholestensäure hydroxyliert, bevor sie zu Chenodesoxycholsäure weiter prozessiert werden.

Zudem kann CYP39A1 24-Hydroxycholesterol zu  $7\alpha,24$ -Dihydroxycholesterol konvertieren, welches ebenfalls zu Chenodesoxycholsäure weiter prozessiert wird (Russell, 2003; Norlin und Wikvall, 2007). Die stark erhöhte Abundanz von CYP39A1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD deutet darauf hin, dass 24-Hydroxycholesterol unter diesen Bedingungen in erhöhter Menge in der Leber vorliegt und bestätigt damit indirekt die Existenz eines Enzyms mit Cholesterol-24-Hydroxylase-Aktivität in der Leber von Mäusen (Meaney *et al.*, 2000). Die Chenodesoxycholsäure wird schließlich durch CYP2C70 zu  $\alpha$ -Muricholsäure hydroxyliert und dann schrittweise weiter zu konjugierten Gallensäuren prozessiert (Abbildung 5.6) (Takahashi *et al.*, 2016).

Zusammenfassend betrachtet wurden in dieser Proteomanalyse neun Enzyme, die wichtige Funktionen in der Biosynthese von Cholesterol und Gallensäuren erfüllen, in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD mit erhöhten Abundanzen detektiert ( $p \leq 0,05$ ). Die plausibelste Erklärung dafür besteht darin, dass 3,5-T<sub>2</sub> die häufig beschriebene Reduktion von Leberfett nicht nur durch die Stimulation der Fettsäureoxidation vermittelt, sondern auch durch die Induktion der Cholesterol- und Gallensäure-Biosynthese mit anschließender Exkretion der konjugierten Gallensäuren (Gallensalze) über die Galle. Dabei dient das beim Abbau von hepatischen Fettsäuren generierte Acetyl-CoA als Ausgangsprodukt für diese Biosynthesewege. Der zugrundeliegende Regulationsmechanismus ist zwar noch unklar, jedoch lässt die Tatsache, dass von den neun signifikant veränderten Proteinen nur drei auch auf mRNA-Ebene erhöhte Mengen zeigten, vermuten, dass posttranslationale Regulationsmechanismen daran beteiligt sind.

#### 5.2.2.8 Proteine und Metabolite der Sexualhormon-Biosynthese

Neben mehreren differenziell abundanten Proteinen der Cholesterol- und Gallensäure-Biosynthese konnte auch ein wichtiges Schlüsselenzym der Sexualhormon-Biosynthese mit erhöhter Abundanz in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um die Steroid-17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase CYP17A1, welche mit 20,87-fach erhöhter Abundanz nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung laut Welch-Test die stärkste Induktion in Mäusen unter HFD zeigte (Abbildung 5.5). Unter SD war zwar eine 6,03-fache Induktion nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung zu beobachten, jedoch ohne statistische Signifikanz. Im korrespondierenden Transkriptom konnten sowohl unter HFD als auch SD signifikant erhöhte mRNA-Mengen für CYP17A1 nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung detektiert werden (3,50- und 3,91-fach).

Die Biosynthese aller Steroidhormone beginnt mit der 20 $\alpha$ -Hydroxylierung, 22-Hydroxylierung und Abspaltung der Seitenkette des Cholesterols, wobei Pregnenolon und Isocaproensäure entstehen. Diese drei Reaktionen werden durch die mitochondriale Cholesterin-

Monooxygenase CYP11A1 katalysiert. Da CYP11A1 jedoch nicht in Hepatozyten synthetisiert wird kann der erste Schritt der Steroidhormon-Biosynthese nur in sogenannten steroidogenen Geweben stattfinden, die dadurch definiert sind, dass in ihnen CYP11A1 gebildet wird (Miller, 2008). Von diesen kann Pregnenolon anschließend über die Blutzirkulation überwiegend in Form von Pregnenolonsulfat zur Leber transportiert werden, wo es als Vorstufe für die Steroidhormon-Biosynthese dienen kann (Hill *et al.*, 1999; Harteneck, 2013). Pregnenolon kann dabei entweder durch CYP17A1 zu  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon oder durch die  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD3B) zu Progesteron konvertiert werden. HSD3B kommt in der Maus in den Isoformen HSD3B1 bis 7 vor. Von diesen Isoformen konnten in der vorliegenden Proteomanalyse HSD3B1, HSD3B3, HSD3B5 und HSD3B7 detektiert werden, wobei jedoch keine signifikanten Veränderungen der Abundanzen nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung zu beobachten waren. Progesteron stellt ebenfalls ein Substrat für CYP17A1 dar und wird zu  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron konvertiert. Die 17,20-Lyase-Aktivität von CYP17A1 katalysiert außerdem die Umwandlung von  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) sowie zu einem geringen Anteil die Umwandlung von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu Androstendion. Außerdem stellen sowohl  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon als auch DHEA weitere Substrate der HSD3B-Isoenzyme dar und werden zu  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron bzw. Androstendion umgewandelt (Miller, 2008). Für die vollständige Konversion von  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu DHEA und Androstendion benötigt CYP17A1 die Interaktion mit Cytochrom b5 Typ a (CYB5A), welches als allosterischer Effektor den Elektronentransfer für die 17,20-Lyase-Reaktion stimuliert (Miller, 2008). In Abwesenheit von CYB5A zeigt CYP17A1 deshalb ausschließlich  $17\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität, was die Bildung von  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon und  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron erlaubt, nicht aber die weitere Prozessierung zu DHEA und Androstendion (Nakamura *et al.*, 2015). In der vorliegenden Proteomanalyse wurde, wie bereits im Kapitel *Proteine des Lipidstoffwechsels* (5.2.2.5) erwähnt, CYB5A mit leicht verringerter Abundanz nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung in Mäusen unter SD und HFD (1,62- und 1,83-fach) detektiert (Abbildung 5.5), ohne korrespondierende Änderungen auf mRNA-Ebene. Letztlich deutete somit die starke Induktion von CYP17A1 als ein Schlüsselenzym der Steroidhormon-Biosynthese auf eine Stimulation der durch CYP17A1 katalysierten Reaktionen, vor allem der Umwandlung von Pregnenolon über  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon zu DHEA, hin, wobei zunächst nicht klar war, inwieweit die verhältnismäßig geringfügig verringerten Mengen an CYB5A diesem Effekt entgegenwirken würden.

Generell werden in den nachfolgenden Schritten der Sexualhormon-Biosynthese durch die  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 3 (HSD17B3) DHEA zu Androstendiol und Androstendion zu Testosteron konvertiert. Dieses Enzym wurde in der vorliegenden Proteomanalyse nicht detektiert. Androstendiol kann durch HSD3B-Isoenzyme ebenfalls zu

Testosteron umgewandelt werden (Miller, 2008). Testosteron wird im männlichen Organismus primär in den Hoden produziert und gelangt über die Blutbahn zu den Zielgeweben. Dort wird es durch die 5 $\alpha$ -Reduktase (Isoenzyme SRD5A1-3) in den biologisch wesentlich aktiveren Metaboliten Dihydrotestosteron umgewandelt, welcher im Vergleich zu Testosteron mit höherer Affinität an den nukleären Androgenrezeptor binden kann, was zu einer stärkeren Expression der entsprechenden Zielgene führt (Auchus, 2004). Die SRD5A-Isoenzyme konnten in dieser Proteomanalyse nicht detektiert werden. Im weiblichen Organismus werden Testosteron und Androstendion in den Ovarien durch die Aromatase CYP19A1 in Estradiol und Estron umgewandelt, wobei Estron durch HSD17B1 sofort zu Estradiol konvertiert wird (Miller, 2008).

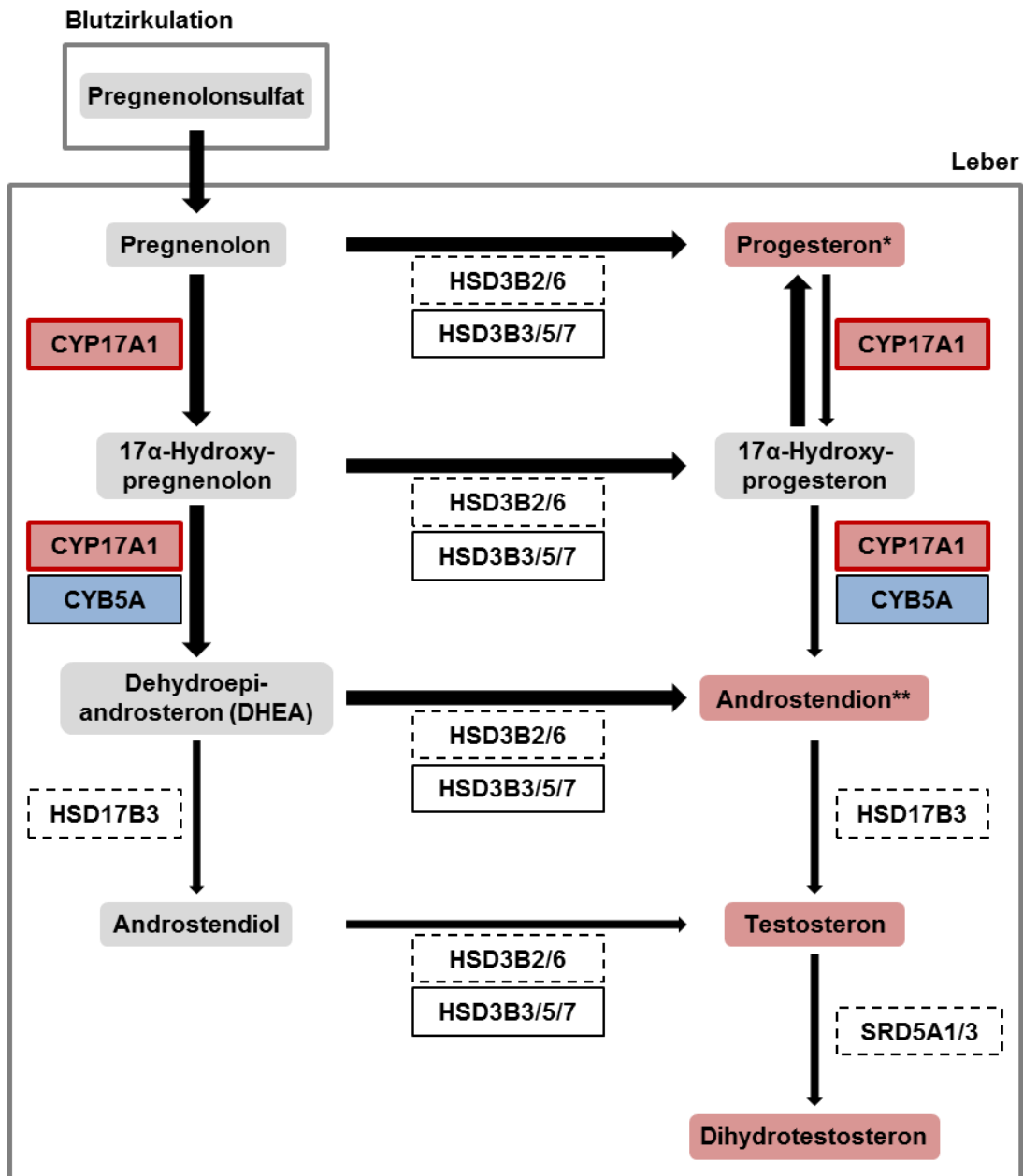
Unter der Voraussetzung einer ausreichenden Zufuhr von Pregnenolonsulfat in die Leber konnte also angenommen werden, dass die beobachtete Induktion von CYP17A1 bei (vermutetem) nur geringem Effekt der leicht verringerten CYP5A-Menge zu einer verstärkten Umwandlung von Pregnenolon zu 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon und weiter zu DHEA führen würde. Da das für HSD17B3 kodierende Gen in der Leber nur schwach exprimiert wird (Yue *et al.*, 2014), wurde entsprechend nur eine geringfügige Konversion von DHEA zu Androstendiol erwartet. Die folglich vermehrt vorhandenen Metabolite 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon und DHEA würden dann durch HSD3B-Isoenzyme weiter in 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron und Androstendion umgewandelt. Da CYP17A1 die Konversion von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu Androstendion nur mit geringer Effizienz katalysiert, konnte angenommen werden, dass entsprechend die entgegengesetzte Reaktion von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu Progesteron kinetisch bevorzugt werden würde. Daher ließ sich voraussagen, dass die Steroidhormone Androstendion und vielleicht auch Progesteron in erhöhten Konzentrationen in der Leber vorliegen würden, da sie dort nicht weiter metabolisiert werden. Weiterhin konnte vermutet werden, dass Progesteron und Androstendion anschließend in die Blutzirkulation abgegeben würden und die resultierenden erhöhten Mengen von Androstendion zu einer Stimulation der Testosteron-Synthese in den Hoden führen könnten. Erhöhte zirkulierende Testosteronmengen würden wiederum entsprechend höhere Dihydrotestosteron-Konzentrationen in den Zielgeweben zur Folge haben. Dies würde demnach verstärkte systemische Effekte der männlichen Sexualhormone infolge der 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung implizieren.

Um diese metabolisch weitreichenden Hypothesen zu überprüfen, wurden die Proteomergebnisse auf Metabolit-Ebene validiert. Dazu wurden die Sexualhormon-Konzentrationen von Progesteron, Androstendion, Testosteron und Dihydrotestosteron in Lebergewebe, Serum sowie inguinalem und gonadalem weißem Fettgewebe (WAT) von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD und HFD mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) bestimmt. Die hepatischen Konzentrationen der vier

Sexualhormone waren im Durchschnitt in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD erhöht, wobei allerdings nur Progesteron und Androstendion statistische Signifikanz zeigten und Dihydrotestosteron einen *p*-Wert von exakt 0,05 aufwies (Abbildung 4.15). Mit der Ausnahme von Progesteron, welches in inguinalem WAT von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD erhöhte Konzentrationen zeigte, konnten für die anderen analysierten Gewebe keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden. In Mäusen unter SD konnten keinerlei signifikante Effekte nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung detektiert werden.

Die Daten der Metaboliten-Analyse demonstrieren folglich eine Erhöhung der Sexualhormon-Konzentration in der Leber von 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD, jedoch nicht in der Blutzirkulation und anderen Geweben. Daher können tatsächlich weitreichende systemische Effekte ausgeschlossen werden. Die erhöhten Progesteron-Spiegel im inguinalen WAT könnten auch durch die direkte 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Stimulation von CYP17A1 in diesem Gewebe hervorgerufen worden sein. Da sich die Testosteron-Konzentration im Serum als unverändert darstellte und daher keine verstärkte gonadale Umwandlung Leber-sekretierten Androstendions anzeigte, deutete dies darauf hin, dass die erhöhten hepatischen Testosteron- und Dihydrotestosteron-Konzentrationen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD das Ergebnis der intrahepatischen Testosteron-Synthese aus DHEA *via* Androstendiol oder Androstendion darstellen. Da bei letzteren Reaktionen HSD17B3 das Schlüsselenzym darstellt, sein kodierendes Gen in der Leber jedoch nur gering exprimiert wird, könnte dies zu einer unverhältnismäßigen Anreicherung von Androstendion im Vergleich zu Testosteron und Dihydrotestosteron führen.

Zusammenfassend belegen die Daten, dass die Leber 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter HFD erhöhten Konzentrationen endogener männlicher Sexualhormone exponiert ist. Dies könnte eine Maskulinisierung dieses Organs zur Folge haben, wobei die potenziellen physiologischen Konsequenzen jedoch noch unklar sind. Ein hypothetisches Modell der Sexualhormon-Biosynthese unter Einbeziehung der Änderungen der hepatischen Mengen der involvierten Enzyme und Androgen-Metabolite ist in Abbildung 5.7 dargestellt.



**Abbildung 5.7: Modell, das den Einfluss von 3,5-T<sub>2</sub> auf hepatische Enzyme der Sexualhormon-Biosynthese sowie Sexualhormon-Metabolite in Mäusen unter HFD zeigt.** Enzyme sind in viereckigen Umrahmungen dargestellt, wobei ein durchgehender Rand in der vorliegenden Proteomanalyse detektierte und ein gestrichelter nicht detektierte Proteine kennzeichnet. Ein roter bzw. blauer Hintergrund markiert Proteine mit signifikant erhöhten bzw. verringerten Abundanzen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ( $p \leq 0,05$ , fold change  $\geq 1,5$ ). Eine rote Umrahmung markiert korrespondierende Transkripte mit signifikant erhöhten Mengen in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ( $p \leq 0,05$ , fold change  $\geq 1,5$ ). Metabolite sind in Umrahmungen mit abgerundeten Ecken dargestellt, wobei ein grauer Hintergrund nicht mittels GC-MS/MS vermessene Metabolite kennzeichnet. Ein roter Hintergrund markiert Metabolite mit erhöhten Spiegeln, wobei signifikant erhöhte Konzentrationen mit einem Sternchen gekennzeichnet sind (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ ). Die Pfeile kennzeichnen die Richtung des metabolischen Flusses, wobei ihre Stärke dessen Ausmaß widerspiegelt. Einzelheiten siehe Text (nach Miller, 2008).

#### 5.2.2.9 Proteine weiterer Stoffwechselwege

Die IPA-Pathways *Thymine Degradation* und *Uracil Degradation II (reductive)* enthielten jeweils die beiden Enzyme Beta-Ureidopropionase (UPB1) und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPYD), die in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD verringerte Abundanzen zeigten (2,05- und 1,70-fach). Für UPB1 konnten in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD ebenfalls verringerte Mengen beobachtet werden (2,73-fach). Auf Transkriptom-Ebene konnten keine korrespondierenden Änderungen detektiert werden. Wie die Zuordnung zu den beiden IPA-Pathways bereits indiziert sind UPB1 und DPYD am Abbau der Pyrimidine Thymin und Uracil beteiligt.

Dem IPA-Pathway *Molybdenum Cofactor Biosynthesis* war zum einen das Protein Gephyrin (GPHN) zugeordnet, welches zwei Schritte der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese katalysiert und 2,68-fach erhöhte Abundanz in Mäusen unter SD nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung aufwies. Das andere Protein war die Cystein-Desulfurase (NFS1), welche mit 86,56-fach verringerter Abundanz die stärkste Reduktion laut Welch-Test in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD zeigte. NFS1 katalysiert die Entfernung von elementarem Schwefel aus Cystein und führt somit zur Entstehung von Alanin und ist ebenfalls in die Molybdän-Cofaktor-Biosynthese involviert. In 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD sowie im korrespondierenden Transkriptom der Mäuse unter SD konnten keine Änderungen der Protein- bzw. Transkriptmengen beobachtet werden.

Weiterhin wurden Proteine mit signifikant veränderter Abundanz nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung detektiert, die als klassische TH-responsive Proteine gelten, jedoch in den bereits diskutierten zehn IPA-Pathways mit der größten Signifikanz nicht enthalten waren. Zu ihnen zählt die Deiodase Typ I (DIO1), welche in Mäusen unter HFD nach 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene erhöhte Mengen zeigte (2,76- und 2,74-fach). Diese Effekte wurden bereits ausführlich in Kapitel 5.2.1 diskutiert. Außerdem wurde das NADP-abhängige Malatenzym 1 (ME1) sowohl in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD als auch unter HFD mit erhöhten Abundanzen detektiert (1,92- und 3,72-fach). Im korrespondierenden Transkriptom konnten keine Expressionsänderungen beobachtet werden. Für das TH-responsive ME1 wurde bereits eine 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Stimulation der Aktivität beschrieben (Lombardi *et al.*, 2000). Daher bestätigen die in dieser Arbeit detektierten Effekte auf ME1 diese Ergebnisse.

### 5.2.3 Vergleich der Wirkungen von 3,5-T<sub>2</sub> auf das hepatische Transkriptom und Proteom von Mäusen unter Standard- und Hochfettdiät

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom- und Proteomanalysen auf RNA- bzw. Protein-Proben aus denselben Lebergeweben 3,5-T<sub>2</sub>-behandelter Mäuse unter SD und HFD im Vergleich zu Kontrolltieren beruhten, erlaubte die vergleichende Analyse beider Ansätze. In 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter SD konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt 221 signifikant differenziell abundante Transkripte und 223 Proteine mit signifikant veränderten Mengen detektiert werden. Dabei war die Expression von 21 Genen (4,96 %) sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikant verändert (Abbildung 4.13 A). In Mäusen unter HFD und 3,5-T<sub>2</sub>-Behandlung wurden insgesamt 103 Transkripte mit signifikant differenziellen Mengen und 272 signifikant differenziell abundante Proteine im Vergleich zur Kontroll-Bedingung nachgewiesen. Davon wiesen 15 Gene (4,17 %) auf beiden Ebenen der Expression signifikante Veränderungen auf (Abbildung 4.13 B). Folglich ergab der Vergleich der sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene signifikant veränderten Gene eine niedrige Kongruenz der Ergebnisse. Diese ließ sich dadurch erklären, dass tatsächlich für etwa 85 % jener Gene, die auf Transkript-Ebene signifikant veränderte Expression in Mäusen unter SD sowie HFD zeigten, die entsprechenden Proteine nicht detektiert werden konnten. Hierfür könnten die zu geringe Abundanz dieser Proteine oder technische Ursachen in der massenspektrometrischen Analyse verantwortlich sein. Die Erklärung der geringen Detektionsrate ließ sich jedoch andererseits nicht auf jene Gene anwenden, deren Expression ausschließlich auf Protein-Ebene signifikant verändert war, nicht aber auf Transkript-Ebene, da die verwendeten Microarrays nahezu das komplette murine Transkriptom repräsentierten. Daher wurde eine Analyse der Variationskoeffizienten der Transkript- und Protein-Intensitätswerte aller Bio-Replikate der vier experimentellen Gruppen durchgeführt (Abbildung 4.14). Diese Analyse zeigte, dass die Varianzen für die Proteinintensitäten zwischen den einzelnen Proben innerhalb einer experimentellen Gruppe sowohl für die Gesamtheit der Proteine als auch für jene Proteine, die signifikante Veränderungen aufwiesen, verglichen mit dem Transkriptom-Datensatz deutlich größer waren. Folglich konnten technisch bedingte interindividuelle Unterschiede der Transkriptmengen innerhalb einer experimentellen Behandlungsgruppe als Ursache der fehlenden Kongruenz weitgehend ausgeschlossen werden.

Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass den Diskrepanzen zwischen Transkriptom- und Proteom-Ergebnissen tatsächlich physiologische Mechanismen zugrunde liegen. Einerseits könnte die verhältnismäßig lange Behandlungsdauer von vier Wochen auf transkriptioneller Ebene dazu geführt haben, dass akute Effekte auf die Genexpression nicht mehr nachweisbar waren, da die Transkriptmengen bereits auf Basisniveau zurückgegangen waren, während auf Proteinebene durch veränderte proteostatische Bedingungen in den Hepatozyten die

Abundanzänderungen fixiert waren. In Mäusen konnte tatsächlich nach T<sub>3</sub>-Behandlung die Desensibilisierung einer Vielzahl von akut (6 h) induzierten bzw. reprimierten hepatischen Genen auf Transkript-Ebene gezeigt werden, während andere Transkripte ausschließlich nach einer längeren Behandlungsdauer von 10 Tagen als differenziell abundant detektiert werden konnten. Die Überlappung der zu beiden Zeitpunkten differenziell abundanten Transkripte war auch hier eher gering (Ohba *et al.*, 2016). In dieser Studie wurden jedoch keine korrespondierenden Proteomanalysen durchgeführt. Neben der Desensibilisierung könnten auch posttranskriptionale Mechanismen für die Änderungen verantwortlich sein, die ausschließlich auf Protein-Ebene nachweisbar sind. Hierzu zählen die verstärkte oder verminderte Translation spezifischer mRNAs, eine veränderte Protein-Prozessierung und die Modifikation der Protein-Stabilität. Diese Prozesse könnten durch nicht-klassische TH-vermittelte Signalwege, wie z. B. über cytoplasmatische 3,5-T<sub>2</sub>-aktivierte TRs, die Stimulation bzw. Repression von Phosphorylierungskaskaden oder die Aktivierung bzw. Inaktivierung von regulatorischen Schlüsselproteinen der genannten Mechanismen, moduliert werden. Die Fähigkeit von 3,5-T<sub>2</sub> nicht-klassische TH-Signalwege zu regulieren konnte bereits in mehreren Studien demonstriert werden (Incerpi *et al.*, 2002; Rochira *et al.*, 2013; de Lange *et al.*, 2011; Lombardi *et al.*, 2009).

Weiterhin konnten in 3,5-T<sub>2</sub>-behandelten Mäusen unter HFD knapp 22 % mehr signifikant differenziell abundante Proteine ( $p \leq 0,05$  oder Standardabweichung  $\geq 2$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ) als in Mäusen unter SD detektiert werden, wobei dieser Unterschied bei Betrachtung aller signifikant differenziell abundanten Proteine unabhängig vom *fold change* sogar knapp 40 % betrug. Die Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen physiologischen Bedingungen in den Hepatozyten unter SD und HFD sein. Dabei stellt der durch die Fettleber bedingte erhöhte Lipid-Gehalt in den Mäusen unter HFD den wohl bedeutendsten Unterschied dar. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit vom Lipid-Gehalt im Gewebe die Aktivität mehrerer nukleärer Rezeptoren beeinflusst wird. Dazu zählen beispielsweise die Mitglieder der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR)-Familie ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ), welche durch Fettsäuren reguliert werden (Ahmadian *et al.*, 2013; Vacca *et al.*, 2011). Daher unterscheidet sich die Zusammensetzung aktiver nukleärer und cytoplasmatischer Rezeptoren in den Hepatozyten zwischen SD- und HFD-Mäusen sehr wahrscheinlich deutlich. Zudem interagieren verschiedene hepatische nukleäre Rezeptoren, wie z. B. TR, Farnesoid-X-Rezeptoren (FXR), Leber-X-Rezeptoren (LXR) und PPARs miteinander. Dabei teilen sie sich außerdem mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) einen gemeinsamen Dimerisierungspartner zur DNA-Bindung, wobei es teilweise zur Konkurrenz um die limitierte Verfügbarkeit von RXR kommt (Sinha *et al.*, 2014; Mullur *et al.*, 2014). Vermutlich könnte also die hepatozelluläre Umgebung in Mäusen unter HFD, welche durch einen hohen Lipid-Gehalt

charakterisiert wird, die Wirkung von 3,5-T<sub>2</sub> verstärken und sich folglich in einer erhöhten Anzahl differenziell abundanter Proteine niederschlagen.

### **5.3 Wirkungen von T<sub>4</sub>- und Methimazol-induzierter Hyper- und Hypothyreose auf das hepatische Proteom von Mäusen**

Die klassischen TH T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> spielen bei der Regulation zahlreicher physiologischer und metabolischer Prozesse eine wichtige Rolle. Dabei können sie unter anderem durch Regulation des Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsels den Energiestoffwechsel beeinflussen, wobei die Leber ein wichtiges Zielorgan darstellt (Mullur *et al.*, 2014). Die Wirkung der TH wird über einen komplexen negativen Rückkopplungsmechanismus, die sogenannte Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT)-Achse, reguliert. Durch verschiedene Fehlfunktionen kann die TH-Homöostase aus dem Gleichgewicht geraten, wodurch es zur Ausbildung von diversen Krankheitsbildern kommt. So führt ein Mangel an TH beispielsweise zur Entstehung einer Hypothyreose, während ein Überschuss an TH eine Hyperthyreose hervorruft (Zoeller *et al.*, 2007). Autoimmunerkrankungen, wie die Hashimoto-Thyreoiditis und Morbus Basedow, sind die häufigsten Ursachen für eine Hypo- bzw. Hyperthyreose. Im klinischen Alltag treten diese Erkrankungen vor allem mit fortschreitendem Alter und bei Frauen auf, können jedoch mittels verschiedener Therapien behandelt werden (Chaker *et al.*, 2017; de Leo *et al.*, 2016).

Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) wurden die Auswirkungen einer Hypo- und Hyperthyreose auf das hepatische Transkriptom untersucht. Dazu wurde Lebergewebe von euthyreoten, hypothyreoten sowie hyperthyreoten Mäusen analysiert, welche über einen Zeitraum von sieben Wochen behandelt wurden, um den jeweiligen TH-Status zu erzielen. Die euthyreote Kontrollgruppe erhielt i. p. physiologische Kochsalzlösung, während der hyperthyreoten Gruppe i. p. T<sub>4</sub> (1 µg/g Körpergewicht) appliziert wurde. Der hypothyreoten Gruppe wurde eine Niedrig-Iod-Diät sowie mit Methimazol (0,02 %) und Perchlorat (0,5 %) versetztes Trinkwasser verabreicht, wobei zusätzlich i. p. physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde. Die Phänotyp-Daten dieses Mausmodells wurden bereits von Rakov *et al.* (2016) publiziert. In dieser Arbeit konnten gezeigt werden, dass wie erwartet die Serum-Konzentrationen von totalem T<sub>4</sub> (TT<sub>4</sub>), freiem T<sub>4</sub> (fT<sub>4</sub>) und freiem T<sub>3</sub> (fT<sub>3</sub>) in hyperthyreoten Mäusen im Vergleich zu euthyreoten Tieren erhöht waren, während TSH verringerte Spiegel aufwies. In hypothyreoten Mäusen hingegen waren nur die TT<sub>4</sub>-Konzentration im Serum verringert und die TSH-Konzentration erhöht. Zudem war die Herzfrequenz in Mäusen unter hyperthyreoten Bedingungen erhöht, während sie unter hypothyreoten Bedingungen reduziert war. Weiterhin wies das totale Cholesterol im Serum in hyperthyreoten Mäusen verringerte und in hypothyreoten Mäusen erhöhte Konzentrationen

auf. In der Leber konnte in hyperthyreoten Mäusen mittels RT-qPCR eine Induktion der Genexpression von *Dio1* und *Me1* sowie eine Repression von *Tbg* (*Serpina7*) im Vergleich zu euthyreoten Kontrolltieren nachgewiesen werden. In hypothyreoten Mäusen zeigte sich ein entgegengesetztes Expressionsmuster dieser Gene (Rakov *et al.*, 2016). Die beschriebenen Phänotyp-Daten der hypo- und hyperthyreoten Mäusen sowie deren hepatische Genexpressionsmuster, welche in der erwähnten Masterarbeit (Janine Golchert, 2014) durch die Transkriptomanalysen erhoben worden waren, sollten nun weiter komplementiert und auf Protein-Ebene validiert werden. Daher wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit korrespondierende Proteomanalysen derselben Leberproben, die für die Transkriptomanalysen eingesetzt worden waren, sowie drei, vier bzw. fünf zusätzlicher Leberproben pro Gruppe durchgeführt.

In der Proteomanalyse der hypothyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen konnten insgesamt 257 Proteine mit signifikant differenzieller Abundanz ( $p \leq 0,05$  oder Standardabweichung  $\geq 2$ ) und einem *fold change*  $\geq |1,5|$  detektiert werden, wobei 103 Proteine erhöhte und 154 Proteine verringerte hepatische Mengen aufwiesen. Die Proteomanalyse hyperthyreoter vs. euthyreoter Mäuse ergab 234 signifikant differenziell abundante Proteine mit einem *fold change*  $\geq |1,5|$ , von denen 153 erhöhte und 81 verringerte Mengen aufwiesen. Beim Vergleich signifikanter Proteine der hypo- und hyperthyreoten Mäuse im Vergleich zu den euthyreoten Kontroll-Mäusen konnten 47 Proteine (10,59 %) mit signifikanten Veränderungen in beiden Vergleichen identifiziert werden. Von diesen zeigten 34 Proteine (7,66 %) entgegengesetzte Mengenveränderungen und stellten somit erstrangige Kandidaten für eine weiterführende Analyse dar, da sie die erwarteten gegenläufigen Veränderungen infolge des Mangels bzw. Überschusses an TH widerspiegeln. Insgesamt 210 bzw. 187 Proteine zeigten unter hypothyreoten bzw. hyperthyreoten Bedingungen signifikante Abundanzveränderungen und stellten damit Schilddrüsenstatus-spezifische Effekte dar.

Um aus den Proteomprofilen Hinweise auf den physiologischen Kontext ableiten zu können wurden *in silico-Pathway-Analysen* unter Nutzung der Software IPA durchgeführt, in welche nur signifikant differenziell abundante Proteine ( $p \leq 0,05$ , *fold change*  $\geq |1,5|$ ) einbezogen wurden. Anschließend wurden die zehn IPA-Pathways mit der höchsten Signifikanz genauer betrachtet (Abbildung 4.20, Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8). Im Folgenden sollen einzelne Proteine, die teilweise mehreren der Pathways zugeordnet waren, im Detail diskutiert werden.

Unter hypothyreoten Bedingungen wurden vermehrt Glutathion-S-Transferasen (GST), zu denen GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM6, GSTA1, GSTA4, GSTT1 und MGST3 zählten, mit erhöhten Abundanzen in hypothyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen detektiert (1,67- bis 10,69-fach). Außerdem konnten für alle GSTs, bis auf GSTT1, erhöhte mRNA-Mengen in der korrespondierenden Transkriptomanalyse detektiert werden (1,49- bis 7,08-fach). Unter hyperthyreoten Bedingungen wurden ebenfalls zahlreiche GSTs mit

veränderter Abundanz detektiert. Dazu zählten GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM6, GSTM7, GSTA4 und GSTP1/GSTP2, die hier durchweg verringerte Mengen in hyperthyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen zeigten (2,00- bis 4,22-fach). GSTT1 wies hingegen in hyperthyreoten Tieren erhöhte Abundanzen auf (2,56-fach). Die korrespondierenden Transkriptmengen dieser Proteine waren, bis auf GSTM3, ebenfalls signifikant in gleicher Richtung verändert (1,57- bis 4,05-fach). Folglich weisen die Proteine GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTM6 und GSTA4 entgegengesetzte Abundanzen unter hypo- und hyperthyreoten Bedingungen auf. In den *Pathway*-Analysen wurden diese Proteine den *Pathways Glutathione-mediated Detoxification, Xenobiotic Metabolism Signaling, NRF2-mediated Oxidative Stress Response* und *Glutathione Redox Reactions I* zugeordnet. Tatsächlich zählen die GSTs zu den Phase II-Enzymen der Biotransformation und spielen bei der Detoxifizierung und Eliminierung von Xenobiotika eine wichtige Rolle (Lee *et al.*, 2011). Indem die GSTs die Bindung von Glutathion an Xenobiotika katalysieren, schützen sie außerdem vor oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Wu *et al.*, 2004; Townsend *et al.*, 2005). Zudem wies in hyperthyreoten Mäusen das Peroxiredoxin-6 (PRDX6) verringerte Mengen (1,69-fach) im Vergleich zu euthyreoten Kontrollen auf. PRDX6 besitzt ebenfalls eine wichtige Bedeutung beim Schutz vor oxidativem Stress, da es Wasserstoffperoxid und Hydroperoxide, die zu den ROS zählen, reduzieren kann (Arevalo und Vázquez-Medina, 2018). Daher deuten verringerte Mengen der GSTs in hyperthyreoten Mäusen auf eine verminderte Detoxifizierung von Xenobiotika und ROS hin. Daraus lässt sich wiederum folgern, dass unter hyperthyreoten Bedingungen weniger oxidativer Stress in der Leber herrscht, weshalb die Schutzsysteme entsprechend in geringerem Ausmaß benötigt werden. Unter hypothyreoten Bedingungen hingegen deuten die erhöhten Mengen der GSTs auf vermehrten oxidativen Stress hin.

Dem *Pathway NRF2-mediated Oxidative Stress Response* waren unter hypothyreoten Bedingungen außerdem einige Ko-Chaperone der DnaJ-Familie zugeordnet (DNAJA1, DNAJA2, DNAJB11, DNAJC3), welche verringerte Abundanzen im Vergleich zu euthyreoten Kontrolltieren zeigten (1,73- bis 3,17-fach). Zusätzlich konnten drei weitere Proteine der DnaJ-Familie (DNAJB12, DNAJC7, DNAJC25) identifiziert werden, die nur unter euthyreoten und nicht unter hypothyreoten Bedingungen in der massenspektrometrischen Analyse detektiert wurden und demnach ebenfalls in verringerten Mengen vorlagen. Unter hyperthyreoten Bedingungen wurden zwei Proteine der DnaJ-Familie identifiziert und dem *Pathway NRF2-mediated Oxidative Stress Response* zugeordnet (DNAJB4, DNAJC3). Dabei wies DNAJB4 verringerte und DNAJC3 erhöhte Mengen auf (1,52- und 1,53-fach). Die Proteine der DnaJ-Familie dienen als Ko-Chaperone für Hitzeschockproteine der HSP70-Klasse, assistieren bei der Proteinfaltung im Zuge der *de-novo*-Proteinsynthese und können im Rahmen der *Heat shock response* (HSR), bei der sie in erhöhten Mengen gebildet werden, falsch gefaltete oder

partiell entfaltete Proteine vor einer irreversiblen Aggregation mit anderen Proteinen schützen (Schröder und Kaufman, 2005b). Diese Funktionen erfüllen sie auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) während der co-translationalen Proteinbiosynthese. Im Kontext der sogenannten UPR (*Unfolded protein response*) werden sie hier als Teil der zellulären Stressantwort infolge einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER in höheren Mengen synthetisiert (Schröder und Kaufman, 2005a). Der *Pathway Unfolded protein response* wurde tatsächlich auch als einer der zehn höchst signifikant assoziierten IPA-*Pathways* unter hypothyreoten Bedingungen identifiziert. Der *Pathway* beinhaltete neben Proteinen der DnaJ-Familie drei weitere Proteine, namentlich die beiden Proteindisulfid-Isomerasen P4HB und PDIA6 sowie das Protein Sel-1 Homolog 1 (SEL1L), die verringerte Abundanzen in hypothyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen zeigten (1,56- bis 2,19-fach). In hyperthyreoten Mäusen konnte zusätzlich das ERO1-like Protein  $\beta$  (ERO1B) mit erhöhten Mengen (2,55-fach) im Vergleich zu euthyreoten Kontrolltieren nachgewiesen werden, welches ebenfalls in die UPR involviert ist, da es als Oxidoreduktase der Proteindisulfid-Isomerasen agiert (Schröder und Kaufman, 2005a). Zusammenfassend lässt sich demzufolge eine verminderte UPR unter hypothyreoten Bedingungen beobachten, während sich unter Hyperthyreose eine verstärkte UPR andeutet. Da die UPR infolge einer verstärkten Proteinbiosynthese oder durch zellulären Stress auftritt, könnte postuliert werden, dass unter hyperthyreoten relativ zu euthyreoten Bedingungen die hepatische Proteinbiosynthese stimuliert ist, während sich diese entsprechend unter den Bedingungen der Hypothyreose als reduziert darstellt.

Tatsächlich wurden, diese Interpretation unterstützend, unter hypothyreoten im Vergleich zu euthyreoten Bedingungen auch zahlreiche ribosomale Proteine (RPL3, RPL4, RPL5, RPL18, RPL19, RPL22L1, RPL26, RPS6, RPS8, RPS9) sowie zwei eukaryotische Translations-Initiationsfaktoren (EIF2S2, EIF4H) mit verringerter Abundanz detektiert (1,81- bis 2,98-fach), die in der *Pathway*-Analyse dem *Pathway EIF2 Signaling* zugeordnet wurden. In hyperthyreoten im Vergleich zu euthyreoten Mäusen zählte *EIF2 Signaling* zwar nicht zu den zehn höchst signifikanten *Pathways*, jedoch konnten nach intensiver Inspektion der Daten zwei ribosomale Proteine (RPS2, RPS27) und drei eukaryotische Translations-Initiationsfaktoren (EIF2B1, EIF3K, EIF3M) mit signifikant erhöhten Abundanzen detektiert werden (1,58- bis 100-fach). Bei erweiterter Analyse der signifikant differenziell abundanten Proteine ohne zusätzliche Berücksichtigung des *fold change*  $\geq |1,5|$  als Inklusionskriterium konnten sogar noch vier weitere Proteine dieser Kategorien (RPS3, RPLP0, EIF3I, EIF2B2) mit erhöhten Mengen detektiert werden (1,20- bis 1,44-fach). Folglich wurden unter hypothyreoten Bedingungen verringerte Mengen ribosomaler Proteine und eukaryotischer Translations-Initiationsfaktoren nachgewiesen, während deren Abundanzen unter hyperthyreoten Bedingungen in die entgegengesetzte Richtung verändert waren. Sowohl die

ribosomalen Proteine als Strukturkomponenten ribosomaler Untereinheiten, als auch die eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren, welche in die Initiation der Translation involviert sind, spielen eine zentrale Rolle bei der Proteinbiosynthese (de la Cruz *et al.*, 2015; Jackson *et al.*, 2010). Daher deuten verringerte Abundanzen dieser Proteine relativ zu euthyreoten Kontrolltieren ebenfalls auf eine verminderte Proteinbiosynthese unter hypothyreoten Bedingungen hin, während unter hyperthyreoten Bedingungen entsprechend eine vermehrte Synthese von Proteinen abgeleitet werden kann. Im korrespondierenden Transkriptom konnte für keines der ribosomalen Proteine und keinen eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor Veränderungen der entsprechenden mRNA-Mengen beobachtet werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die zugrundeliegende Regulation der Mengen dieser Proteine posttranskriptionell erfolgt.

Bemerkenswerterweise wurden in den *Pathway*-Analysen keine *Pathways* identifiziert, in denen Proteine enthalten waren, welche bereits in vorherigen Studien als klassische TH-responsive Gene bzw. Proteine beschrieben worden waren. Jedoch konnten nach genauer Auswertung der Proteomdaten tatsächlich für einige jener Proteine signifikant veränderte Abundanzen nachgewiesen werden. Zu ihnen gehörte beispielsweise die Deiodase Typ I (DIO1), welche nur in der Gruppe der hyperthyreoten Mäuse detektiert werden konnte und daher wie erwartet erhöhte Mengen zeigte. Im korrespondierenden Transkriptom konnte für *Dio1* ebenfalls eine erhöhte Expression in hyperthyreoten Mäusen beobachtet werden (5,31-fach), während diese in hypothyreoten Tieren verringert war (21,96-fach). Das NADP-abhängige Malatenzym 1 (ME1) zeigte unter keiner der Bedingungen signifikante Veränderungen, jedoch war in hyperthyreoten Mäusen ein Trend zu erhöhten Abundanzen zu erkennen (3,02-fach). Die korrespondierenden mRNA-Mengen von *Me1* waren unter hyperthyreoten Bedingungen signifikant erhöht (2,03-fach) und unter hypothyreoten Bedingungen signifikant verringert (2,91-fach). Das Thyroxin-bindende Globulin (TBG, SERPINA7) konnte in keiner der analysierten Proteinproben detektiert werden, jedoch zeigten sich im komplementären Transkriptom signifikante Veränderungen. Unter hypothyreoten Bedingungen waren die mRNA-Mengen von *Serpina7* erhöht (5,50-fach), während sie unter hyperthyreoten Bedingungen verringert waren (26,38-fach). Damit konnten die in Rakov *et al.* (2016) beschriebenen Effekte auf die Genexpression von *Dio1*, *Me1* und *Serpina7* zwar in der Transkriptomanalyse verifiziert werden, jedoch spiegeln sich die Effekte nicht proportional auf Protein-Ebene wieder.

Da TH bekanntermaßen an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt sind (Flores-Morales *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2006; Mynatt *et al.*, 1994), sollten die bekannten involvierten Gene bzw. Proteine auch in dieser Proteomanalyse untersucht werden. Neben dem bereits erwähnten ME1 konnte für das *thyroid hormone-inducible hepatic protein* (THRSP) in hypothyreoten Mäusen verringerte Abundanz (5,33-fach) nachgewiesen werden,

wobei sich diese Veränderung auch auf Transkriptom-Ebene widerspiegelte (3,68-fach). Unter hyperthyreoten Bedingungen konnten hingegen keine veränderten Mengen von THRSF oder *Thrsp*-mRNA beobachtet werden. Außerdem konnte für die Fettsäure-Synthase (FASN) eine Erhöhung der Abundanz unter hyperthyreoten Bedingungen nachgewiesen werden (3,93-fach), wobei diese jedoch nur nominelle Signifikanz aufwies. Weitere in den Lipidstoffwechsel involvierte Proteine wie die Acyl-CoA-Synthetase 5 (ACSL5), die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDX), das *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBF1), Fettsäure-bindende Proteine (FABPs), die Lipoproteinlipase (LPL) oder die Carnitin-Palmityltransferase 1 $\alpha$  (CPT1A) konnten hingegen entweder nicht detektiert werden oder zeigten keine signifikanten Veränderungen unter hypo- sowie hyperthyreoten Bedingungen relativ zu euthyreoten Kontrolltieren. Weiterhin konnten Abundanzveränderungen für die Monoglycerid-Lipase (MGLL), welche in den Stoffwechsel von Triglyceriden involviert ist (Jaworski *et al.*, 2007), nachgewiesen werden. Hier wurden in hyperthyreoten Mäusen erhöhte (3,27-fach) und in hypothyreoten Mäusen verringerte (2,95-fach) Mengen detektiert.

Der Einfluss von TH auf die Cholesterol-Biosynthese wird unter anderem durch die gesteigerte Expression der Gene, welche für die HMG-CoA-Reduktase (HMGCR), den LDL-Rezeptor (LDLR) und die Cholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) kodieren, vermittelt (Ness *et al.*, 1990). Von diesen konnten nur für CYP7A1 Veränderungen gezeigt werden, da es nur unter hyperthyreoten Bedingungen detektiert werden konnte und somit erhöhte Abundanz unter dieser Bedingung aufwies. Zudem konnten auch für die Isopentenylidiphosphat-Isomerase 1 (IDI1), welche ebenfalls an der Cholesterol-Biosynthese beteiligt ist (Mazein *et al.*, 2013), signifikant veränderte Abundanzen beobachtet werden. Unter hyperthyreoten Bedingungen waren ihre Mengen erhöht (2,28-fach), während sie unter hypothyreoten Bedingungen verringert waren (3,36-fach).

Zusammenfassend konnten neben einigen Effekten auf die klassischen TH-responsiven Gene bzw. Proteine weitere Signaturen aus den hepatischen Proteomprofilen der induzierten Hypo- und Hyperthyreose in Mäusen abgeleitet werden. Dazu zählte einerseits die Reduktion von oxidativem Stress unter hyperthyreoten Bedingungen, während die Ergebnisse in hypothyreoten Mäusen auf vermehrten oxidativen Stress hindeuten. Darüber hinaus scheinen *Unfolded protein response* sowie Proteinbiosynthese in hyperthyreoten Mäusen verstärkt und in hypothyreoten Tieren verringert zu sein. Daher lassen sich für die hier diskutierten Ergebnisse mehrfach entgegengesetzte Effekte beobachten, wie sie infolge einer Hypo- und Hyperthyreose auch erwartet würden.

#### 5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Hypothese einer möglichen direkten Wirkung des TH-Metaboliten 3-T<sub>1</sub>AM auf die Schilddrüse sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden. Dazu wurden 3-T<sub>1</sub>AM-behandelte Thyreozyten mittels Transkriptomanalysen untersucht. Trotz der in anderen Studien demonstrierten metabolischen Effekte von 3-T<sub>1</sub>AM konnten in dieser Arbeit keine 3-T<sub>1</sub>AM-induzierten Genexpressionsänderungen nachgewiesen werden. Hier wäre zunächst eine Optimierung des experimentellen Designs ratsam, da die biologische Vergleichbarkeit zwischen den Proben einer Gruppe verbessert und vermutlich auch die Dauer und Dosis der 3-T<sub>1</sub>AM-Behandlung angepasst werden müssten. Weiterhin sollte die Nutzung eines von Antonica *et al.* (2012) etablierten *in vitro*-Modells in Betracht gezogen werden, da es dieses erlaubt, funktionale Schilddrüsenfollikel aus murinen embryonalen bzw. humanen induzierten Stammzellen zu generieren. Dieses Modell könnte eine gute Alternative zu der hier verwendeten Zelllinie PCCL3 sein, da es den physiologischen Zustand in der Schilddrüse deutlich realistischer reflektiert.

Der TH-Metabolit 3,5-T<sub>2</sub> wird als ein potenzielles therapeutisches Agens gegen Adipositas und der damit assoziierten *Steatosis hepatis* ohne unerwünschte thyreomimetische Nebenwirkungen diskutiert. Daher wurden in dieser Arbeit die physiologischen Effekte von 3,5-T<sub>2</sub> auf Lebergewebe von Mäusen unter Standard- (SD) und Hochfettdiät (HFD) mittels komplementärer Transkriptom- und Proteomanalysen näher charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Analysen deuten unter anderem auf eine 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Induktion der hepatischen Cholesterol-, Gallensäure- und Sexualhormon-Biosynthese in HFD-gefütterten Mäusen hin. Außerdem zeigten in den Lipidstoffwechsel und Citratzyklus involvierte Proteine in Mäusen unter HFD deutlich mehr signifikante Mengenveränderungen als unter SD. Auch zahlreiche Transkripte und Proteine, welche mit dem Stoffwechsel von Xenobiotika assoziiert sind, konnten sowohl in Mäusen unter SD als auch unter HFD als signifikant differenziell abundant nachgewiesen werden. Wie in zahlreichen vorangegangenen Studien beschrieben, konnten auch in dieser Arbeit gesundheitsfördernde Effekte von 3,5-T<sub>2</sub> auf den Lipidstoffwechsel beobachtet werden. Jedoch wurden ebenfalls 3,5-T<sub>2</sub>-vermittelte Effekte auf Xenobiotikametabolisierende Proteine nachgewiesen. Zusammen mit der von Jonas *et al.* (2015) demonstrierten kardialen Hypertrophie und Effekten auf die HPT-Achse deuten sich folglich thyreomimetische Nebeneffekte von 3,5-T<sub>2</sub> an. Daher kann ein unbedenklicher Einsatz von 3,5-T<sub>2</sub> als Therapeutikum vorerst nicht empfohlen werden. Hinzu kommt, dass die in diesem Mausmodell aufgezeigten Effekte womöglich nicht direkt auf die Anwendung im Menschen translatierbar sind, weshalb es umso wichtiger ist die physiologische Funktion und Wirkungsweise von 3,5-T<sub>2</sub>, vor allem hinsichtlich kardiovaskulärer Effekte, vollständig aufzuklären.

Um die Effekte der aus dem Gleichgewicht geratenen TH-Homöostase zu untersuchen, wurden hepatische Proteomanalysen von Mäusen mit induzierter Hypo- und Hyperthyreose durchgeführt. Hierbei deuten die Ergebnisse unter hyperthyreoten Bedingungen auf verminderten oxidativen Stress und eine verstärkte Proteinbiosynthese hin, während unter hypothyreoten Bedingungen entgegengesetzte Effekte beobachtet wurden. Die hier generierten Proteomdaten bedürfen einer weiterführenden Analyse, in welcher sie mit den korrespondierenden Transkriptomdaten in einen Zusammenhang gebracht werden, um eine potenzielle klinische Relevanz für Patienten mit Hypo- und Hyperthyreose abzuleiten.

Grundsätzlich könnte für alle in dieser Arbeit durchgeführten Analysen das experimentelle Design optimiert bzw. erweitert werden. So wäre eine Vergrößerung der Gruppenanzahl sowie Untersuchung verschiedener Dosen und unterschiedlicher Behandlungsdauern (longitudinale Studien) von Vorteil. Dies würde zum einen die Power der statistischen Tests erhöhen und zum anderen die Differenzierung zwischen Kurz- und Langzeiteffekten ermöglichen. Allerdings müssten diese Überlegungen vor allem hinsichtlich finanzieller und ethischer Aspekte, speziell bei Tierversuchen, abgewogen werden. Eine zusätzliche Validierung der in dieser Arbeit beobachteten Effekte sollte weiterhin ebenfalls in Betracht gezogen werden. So könnten beispielsweise RT-qPCR- und Western Blot-Analysen durchgeführt werden, um die hier beobachteten Effekte auf Transkript- bzw. Proteinebene zu verifizieren. Außerdem könnten so auch potenzielle Zieltranskripte bzw. -proteine, welche in den Analysen dieser Arbeit nicht detektiert werden konnten bzw. keine signifikanten Mengenveränderungen zeigten, untersucht werden. Zudem beschränkten sich die nachgewiesenen Effekte von 3,5-T<sub>2</sub> sowie einer Hypo- und Hyperthyreose auf jeweils nur einen analysierten Gewebetyp. Eine Untersuchung weiterer Gewebe wäre daher ein erheblicher Zugewinn für die Aufklärung physiologischer Effekte und potenzieller therapeutischer Angriffspunkte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten globalen Transkriptom- und Proteomanalysen stellen einen signifikanten Zugewinn an Datenmaterial zur Aufklärung der Wirkungen und Wirkungsweisen von TH und deren Metaboliten dar. Neben den hier diskutierten Ergebnissen bieten die Daten eine Grundlage, die zahlreiche Ansatzpunkte für die tiefergehende Charakterisierung der durch 3-T<sub>1</sub>AM, 3,5-T<sub>2</sub> sowie Hypo- und Hyperthyreose vermittelten Effekte bietet.

## Literaturverzeichnis

- Ahmadian, M.; Suh, J. M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A. R.; Downes, M.; Evans, R. M. (2013): PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19 (5), S. 557–566.
- Allocati, N.; Masulli, M.; Di Ilio, C.; Federici, L. (2018): Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* 7 (1), S. 8.
- Alnouti, Y.; Klaassen, C. D. (2008): Regulation of sulfotransferase enzymes by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 324 (2), S. 612–621.
- Antonelli, A.; Fallahi, P.; Ferrari, S. M.; Di Domenicantonio, A.; Moreno, M.; Lanni, A.; Goglia, F. (2011): 3,5-diiodo-L-thyronine increases resting metabolic rate and reduces body weight without undesirable side effects. *J Biol Regul Homeost Agents* 25 (4), S. 655–660.
- Antonica, F.; Kasprzyk, D. F.; Opitz, R.; Iacovino, M.; Liao, X.-H.; Dumitrescu, A. M.; Refetoff, S.; Peremans, K.; Manto, M.; Kyba, M. *et al.* (2012): Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* 491 (7422), S. 66–71.
- Arevalo, J. A.; Vázquez-Medina, J. P. (2018): The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. *Antioxidants (Basel)* 7 (12).
- Arnold, S.; Goglia, F.; Kadenbach, B. (1998): 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur J Biochem* 252 (2), S. 325–330.
- Auchus, R. J. (2004): The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab* 15 (9), S. 432–438.
- Ball, S. G.; Sokolov, J.; Chin, W. W. (1997): 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro. *J Mol Endocrinol* 19 (2), S. 137–147.
- Baur, A.; Bauer, K.; Jarry, H.; Köhrle, J. (1997): 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5 $\alpha$ -deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. *Endocrinology* 138 (8), S. 3242–3248.
- Behrends, J. C.; Bischofberger, J.; Deutzmann, R.; Kurtz, A.; Wagner, C.; Hoth, M.; Rettig, J. (2012): *Duale Reihe - Physiologie*. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Bergh, J. J.; Lin, H.-Y.; Lansing, L.; Mohamed, S. N.; Davis, F. B.; Mousa, S.; Davis, P. J. (2005): Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146 (7), S. 2864–2871.
- Borowsky, B.; Adham, N.; Jones, K. A.; Raddatz, R.; Artymyshyn, R.; Ogozalek, K. L.; Durkin, M. M.; Lakhiani, P. P.; Bonini, J. A.; Pathirana, S. *et al.* (2001): Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (16), S. 8966–8971.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, S. 248–254.

- Braulke, L. J.; Klingenspor, M.; DeBarber, A.; Tobias, S. C.; Grandy, D. K.; Scanlan, T. S.; Heldmaier, G. (2008): 3-Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation. *J Comp Physiol B, Biochem Syst Environ Physiol* 178 (2), S. 167–177.
- Brent, G. A. (2012): Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 122 (9), S. 3035–3043.
- Bungay, A.; Selden, C.; Brown, D.; Malik, R.; Hubank, M.; Hodgson, H. (2008): Microarray analysis of mitogenic effects of T3 on the rat liver. *J Gastroenterol Hepatol* 23 (12), S. 1926–1933.
- Cao, X.; Kambe, F.; Moeller, L. C.; Refetoff, S.; 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. *Mol Endocrinol* 19 (1), S. 102–112.
- Carvalho, D. P.; Dupuy, C. (2017): Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* 458, S. 6–15.
- Chaker, L.; Bianco, A. C.; Jonklaas, J.; Peeters, R. P. (2017): Hypothyroidism. *The Lancet* 390 (10101), S. 1550–1562.
- Chanas, S. A.; Jiang, Q.; McMahan, M.; McWalter, G. K.; McLellan, L. I.; Elcombe, C. R.; Henderson, C. J.; Wolf, C. R.; Moffat, G. J.; Itoh, K. *et al.* (2002): Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* 365 (Pt 2), S. 405–416.
- Cheng, Q.; Aleksunes, L. M.; Manautou, J. E.; Cherrington, N. J.; Scheffer, G. L.; Yamasaki, H.; Slitt, A. L. (2008): Drug-metabolizing enzyme and transporter expression in a mouse model of diabetes and obesity. *Mol Pharm* 5 (1), S. 77–91.
- Choi, S. H.; Ginsberg, H. N. (2011): Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 22 (9), S. 353–363.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1), S. 156–159.
- Chowdhury, I.; Mo, Y.; Gao, L.; Kazi, A.; Fisher, A. B.; Feinstein, S. I. (2009): Oxidant stress stimulates expression of the human peroxiredoxin 6 gene by a transcriptional mechanism involving an antioxidant response element. *Free Radic Biol Med* 46 (2), S. 146–153.
- Coppola, M.; Cioffi, F.; Moreno, M.; Goglia, F.; Silvestri, E. (2016): 3,5-diiodo-L-thyronine: A Possible Pharmacological Agent? *Curr Drug Deliv* 13 (3), S. 330–338.
- Coppola, M.; Glinni, D.; Moreno, M.; Cioffi, F.; Silvestri, E.; Goglia, F. (2014): Thyroid hormone analogues and derivatives: Actions in fatty liver. *World J Hepatol* 6 (3), S. 114–129.
- Cox, J.; Hein, M. Y.; Luber, C. A.; Paron, I.; Nagaraj, N.; Mann, M. (2014): Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13 (9), S. 2513–2526.
- Danese, S.; Vetrano, S.; Zhang, L.; Poplis, V. A.; Castellino, F. J. (2010): The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 115 (6), S. 1121–1130.
- de la Cruz, J.; Karbstein, K.; Woolford, J. L. (2015): Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem* 84, S. 93–129.
- de Lange, P.; Cioffi, F.; Senese, R.; Moreno, M.; Lombardi, A.; Silvestri, E.; de Matteis, R.; Lionetti, L.; Mollica, M. P.; Goglia, F. *et al.* (2011): Nonthyrotoxic prevention of diet-

- induced insulin resistance by 3,5-diiodo-L-thyronine in rats. *Diabetes* 60 (11), S. 2730–2739.
- de Leo, S.; Lee, S. Y.; Braverman, L. E. (2016): Hyperthyroidism. *The Lancet* 388 (10047), S. 906–918.
- Dinter, J.; Khajavi, N.; Mühlhaus, J.; Wienchol, C. L.; Cöster, M.; Hermsdorf, T.; Stäubert, C.; Köhrle, J.; Schöneberg, T.; Kleinau, G. *et al.* (2015a): The Multitarget Ligand 3-Iodothyronamine Modulates  $\beta$ -Adrenergic Receptor 2 Signaling. *Eur Thyroid J* 4 (Suppl 1), S. 21–29.
- Dinter, J.; Mühlhaus, J.; Jacobi, S. F.; Wienchol, C. L.; Cöster, M.; Meister, J.; Hoefig, C. S.; Müller, A.; Köhrle, J.; Grüters, A. *et al.* (2015b): 3-iodothyronamine differentially modulates  $\alpha$ -2A-adrenergic receptor-mediated signaling. *J Mol Endocrinol* 54 (3), S. 205–216.
- Dinter, J.; Mühlhaus, J.; Wienchol, C. L.; Yi, C.-X.; Nürnberg, D.; Morin, S.; Grüters, A.; Köhrle, J.; Schöneberg, T.; Tschöp, M. *et al.* (2015c): Inverse agonistic action of 3-iodothyronamine at the human trace amine-associated receptor 5. *PLoS ONE* 10 (2), e0117774.
- Dominiczak, M. H.; Caslake, M. J. (2011): Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem* 48 (Pt 6), S. 498–515.
- Dong, H.; Yauk, C. L.; Williams, A.; Lee, A.; Douglas, G. R.; Wade, M. G. (2007): Hepatic gene expression changes in hypothyroid juvenile mice: characterization of a novel negative thyroid-responsive element. *Endocrinology* 148 (8), S. 3932–3940.
- Dumitrescu, A. M.; Liao, X.-H.; Best, T. B.; Brockmann, K.; Refetoff, S. (2004): A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 74 (1), S. 168–175.
- Faber, J.; Kirkegaard, C.; Lumholtz, I. B.; Siersbaek-Nielsen, K.; Friis, T. (1982): Simultaneous measurement of 3,5-diiodothyronine and 3,5,3'-triiodothyronine turnover kinetics in euthyroid, hyperthyroid, and hypothyroid subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 55 (1), S. 8–12.
- Fekete, C.; Lechan, R. M. (2014): Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev* 35 (2), S. 159–194.
- Feng, X.; Jiang, Y.; Meltzer, P.; Yen, P. M. (2000): Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocrinol* 14 (7), S. 947–955.
- Fish, R. J.; Neerman-Arbez, M. (2012): Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost* 108 (3), S. 419–426.
- Flores-Morales, A.; Gullberg, H.; Fernandez, L.; Ståhlberg, N.; Lee, N. H.; Vennström, B.; Norstedt, G. (2002): Patterns of liver gene expression governed by TR $\beta$ . *Mol Endocrinol* 16 (6), S. 1257–1268.
- Fu, Z. D.; Klaassen, C. D. (2014): Short-term calorie restriction feminizes the mRNA profiles of drug metabolizing enzymes and transporters in livers of mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 274 (1), S. 137–146.
- Fusco, A.; Berlingieri, M. T.; Di Fiore, P. P.; Portella, G.; Grieco, M.; Vecchio, G. (1987): One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* 7 (9), S. 3365–3370.
- Galli, E.; Marchini, M.; Saba, A.; Berti, S.; Tonacchera, M.; Vitti, P.; Scanlan, T. S.; Iervasi, G.; Zucchi, R. (2012): Detection of 3-iodothyronamine in human patients: a preliminary study. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (1), E69-74.

- Giannakopoulos, B.; Mirarabshahi, P.; Krilis, S. A. (2011): New insights into the biology and pathobiology of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep* 13 (1), S. 90–95.
- Gnocchi, D.; Steffensen, K. R.; Bruscalupi, G.; Parini, P. (2016): Emerging role of thyroid hormone metabolites. *Acta Physiol (Oxf)* 217 (3), S. 184–216.
- Goglia, F. (2014): The effects of 3,5-diiodothyronine on energy balance. *Front Physiol* 5, S. 528.
- Goglia, F.; Lanni, A.; Horst, C.; Moreno, M.; Thoma, R. (1994): In vitro binding of 3,5-di-iodo-L-thyronine to rat liver mitochondria. *J Mol Endocrinol* 13 (3), S. 275–282.
- Goldberg, I. J.; Huang, L.-S.; Huggins, L. A.; Yu, S.; Nagareddy, P. R.; Scanlan, T. S.; Ehrenkranz, J. R. (2012): Thyroid hormone reduces cholesterol via a non-LDL receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 153 (11), S. 5143–5149.
- Grasselli, E.; Canesi, L.; Voci, A.; Matteis, R. de; Demori, I.; Fugassa, E.; Vergani, L. (2008): Effects of 3,5-diiodo-L-thyronine administration on the liver of high fat diet-fed rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 233 (5), S. 549–557.
- Grasselli, E.; Voci, A.; Canesi, L.; Goglia, F.; Ravera, S.; Panfoli, I.; Gallo, G.; Vergani, L. (2011): Non-receptor-mediated actions are responsible for the lipid-lowering effects of iodothyronines in FaO rat hepatoma cells. *J Endocrinol* 210 (1), S. 59–69.
- Grasselli, E.; Voci, A.; Demori, I.; Canesi, L.; Matteis, R. de; Goglia, F.; Lanni, A.; Gallo, G.; Vergani, L. (2012): 3,5-Diiodo-L-thyronine modulates the expression of genes of lipid metabolism in a rat model of fatty liver. *J Endocrinol* 212 (2), S. 149–158.
- Guengerich, F. P. (2017): Intersection of the Roles of Cytochrome P450 Enzymes with Xenobiotic and Endogenous Substrates: Relevance to Toxicity and Drug Interactions. *Chem Res Toxicol* 30 (1), S. 2–12.
- Hackenmueller, S. A.; Scanlan, T. S. (2012): Identification and quantification of 3-iodothyronamine metabolites in mouse serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1256, S. 89–97.
- Haitina, T.; Lindblom, J.; Renström, T.; Fredriksson, R. (2006): Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics* 88 (6), S. 779–790.
- Harteneck, C. (2013): Pregnenolone sulfate: from steroid metabolite to TRP channel ligand. *Molecules* 18 (10), S. 12012–12028.
- Hashimoto, K.; Yamada, M.; Matsumoto, S.; Monden, T.; Satoh, T.; Mori, M. (2006): Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* 147 (9), S. 4292–4302.
- Hatfield, M. J.; Umans, R. A.; Hyatt, J. L.; Edwards, C. C.; Wierdl, M.; Tsurkan, L.; Taylor, M. R.; Potter, P. M. (2016): Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chem Biol Interact* 259 (Pt B), S. 327–331.
- Haviland, J. A.; Reiland, H.; Butz, D. E.; Tonelli, M.; Porter, W. P.; Zucchi, R.; Scanlan, T. S.; Chiellini, G.; Assadi-Porter, F. M. (2013): NMR-based metabolomics and breath studies show lipid and protein catabolism during low dose chronic T(1)AM treatment. *Obesity (Silver Spring)* 21 (12), S. 2538–2544.
- Hayashi, Y.; Shimamura, A.; Ishikawa, T.; Fujiwara, Y.; Ichi, I. (2018): FADS2 inhibition in essential fatty acid deficiency induces hepatic lipid accumulation via impairment of very low-density lipoprotein (VLDL) secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 496 (2), S. 549–555.
- Hemmerich, S.; Verdugo, D.; Rath, V. L. (2004): Strategies for drug discovery by targeting sulfation pathways. *Drug Discov Today* 9 (22), S. 967–975.

- Hill, M.; Lukác, D.; Lapčík, O.; Sulcová, J.; Hampl, R.; Pouzar, V.; Stárka, L. (1999): Age relationships and sex differences in serum levels of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 37 (4), S. 439–447.
- Hoefig, C. S.; Köhrle, J.; Brabant, G.; Dixit, K.; Yap, B.; Strasburger, C. J.; Wu, Z. (2011): Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (6), S. 1864–1872.
- Hoefig, C. S.; Wuensch, T.; Rijntjes, E.; Lehmpful, I.; Daniel, H.; Schweizer, U.; Mittag, J.; Köhrle, J. (2015): Biosynthesis of 3-Iodothyronamine From T4 in Murine Intestinal Tissue. *Endocrinology* 156 (11), S. 4356–4364.
- Hönes, G. S.; Rakov, H.; Logan, J.; Liao, X.-H.; Werbenko, E.; Pollard, A. S.; Præstholm, S. M.; Siersbæk, M. S.; Rijntjes, E.; Gassen, J. *et al.* (2017): Noncanonical thyroid hormone signaling mediates cardiometabolic effects in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (52), E11323–E11332.
- Hooper, J. M. W.; Stuijver, D. J. F.; Orme, S. M.; van Zaane, B.; Hess, K.; Gerdes, V. E.; Phoenix, F.; Rice, P.; Smith, K. A.; Alzahrani, S. H. *et al.* (2012): Thyroid dysfunction and fibrin network structure: a mechanism for increased thrombotic risk in hyperthyroid individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (5), S. 1463–1473.
- Horst, C.; Rokos, H.; Seitz, H. J. (1989): Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine. *Biochem J* 261 (3), S. 945–950.
- Hosokawa, M. (2008): Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs. *Molecules* 13 (2), S. 412–431.
- Hoter, A.; El-Sabban, M. E.; Naim, H. Y. (2018): The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 19 (9).
- Ianculescu, A. G.; Giacomini, K. M.; Scanlan, T. S. (2009): Identification and characterization of 3-iodothyronamine intracellular transport. *Endocrinology* 150 (4), S. 1991–1999.
- Ibrahim, M. A.; Kelleni, M.; Gedawy, A. (2013): Nonalcoholic fatty liver disease: current and potential therapies. *Life Sci* 92 (2), S. 114–118.
- Incerpi, S.; de Vito, P.; Luly, P.; Spagnuolo, S.; Leoni, S. (2002): Short-term effects of thyroid hormones and 3,5-diiodothyronine on membrane transport systems in chick embryo hepatocytes. *Endocrinology* 143 (5), S. 1660–1668.
- Irmscher, S.; Döring, N.; Halder, L. D.; Jo, E. A. H.; Kopka, I.; Dunker, C.; Jacobsen, I. D.; Luo, S.; Slevogt, H.; Lorkowski, S. *et al.* (2018): Kallikrein Cleaves C3 and Activates Complement. *J Innate Immun* 10 (2), S. 94–105.
- Irrcher, I.; Walkinshaw, D. R.; Sheehan, T. E.; Hood, D. A. (2008): Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo. *Journal of applied physiology* 104 (1), S. 178–185.
- Jackson, R. J.; Hellen, C. U. T.; Pestova, T. V. (2010): The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2), S. 113–127.
- James, T. D.; Moffett, S. X.; Scanlan, T. S.; Martin, J. V. (2013): Effects of acute microinjections of the thyroid hormone derivative 3-iodothyronamine to the preoptic region of adult male rats on sleep, thermoregulation and motor activity. *Horm Behav* 64 (1), S. 81–88.
- Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. (2010): Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154 (2), S. 103–116.

- Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Duncan, R. E.; Ahmadian, M.; Sul, H. S. (2007): Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293 (1), G1-4.
- Jonas, W.; Lietzow, J.; Wohlgemuth, F.; Hoefig, C. S.; Wiedmer, P.; Schweizer, U.; Köhrle, J.; Schürmann, A. (2015): 3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-t<sub>2</sub>) exerts thyromimetic effects on hypothalamus-pituitary-thyroid axis, body composition, and energy metabolism in male diet-induced obese mice. *Endocrinology* 156 (1), S. 389–399.
- Khajavi, N.; Reinach, P. S.; Slavi, N.; Skrzypski, M.; Lucius, A.; Strauß, O.; Köhrle, J.; Mergler, S. (2015): Thyronamine induces TRPM8 channel activation in human conjunctival epithelial cells. *Cell Signal* 27 (2), S. 315–325.
- Kinne, A.; Kleinau, G.; Hoefig, C. S.; Grüters, A.; Köhrle, J.; Krause, G.; Schweizer, U. (2010): Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J Biol Chem* 285 (36), S. 28054–28063.
- Klieverik, L. P.; Foppen, E.; Ackermans, M. T.; Serlie, M. J.; Sauerwein, H. P.; Scanlan, T. S.; Grandy, D. K.; Fliers, E.; Kalsbeek, A. (2009): Central effects of thyronamines on glucose metabolism in rats. *J Endocrinol* 201 (3), S. 377–386.
- Knight, T. R.; Choudhuri, S.; Klaassen, C. D. (2008): Induction of hepatic glutathione S-transferases in male mice by prototypes of various classes of microsomal enzyme inducers. *Toxicol Sci* 106 (2), S. 329–338.
- Kobayashi, Y.; Ohshiro, N.; Sakai, R.; Ohbayashi, M.; Kohyama, N.; Yamamoto, T. (2005): Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 SLC22A7). *J Pharm Pharmacol* 57 (5), S. 573–578.
- Koliaki, C.; Szendroedi, J.; Kaul, K.; Jelenik, T.; Nowotny, P.; Jankowiak, F.; Herder, C.; Carstensen, M.; Krausch, M.; Knoefel, W. T. *et al.* (2015): Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab* 21 (5), S. 739–746.
- Kotite, L.; Zhang, L.-H.; Yu, Z.; Burlingame, A. L.; Havel, R. J. (2003): Human apoC-IV: isolation, characterization, and immunochemical quantification in plasma and plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 44 (7), S. 1387–1394.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Cioffi, M.; Goglia, F. (1992): Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver oxidative capacity. *Mol Cell Endocrinol* 86 (3), S. 143–148.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Cioffi, M.; Goglia, F. (1993): Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver mitochondria. *J Endocrinol* 136 (1), S. 59–64.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A.; 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. *Mol Cell Endocrinol* 99 (1), S. 89–94.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A.; Goglia, F. (1996): Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *J Physiol (Lond)* 494 (Pt 3), S. 831–837.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A.; Lange, P. de; Silvestri, E.; Ragni, M.; Farina, P.; Baccari, G. C.; Fallahi, P.; Antonelli, A. *et al.* (2005): 3,5-diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats. *FASEB J* 19 (11), S. 1552–1554.
- Lee, J. S.; Ward, W. O.; Liu, J.; Ren, H.; Vallanat, B.; Delker, D.; Corton, J. C. (2011): Hepatic xenobiotic metabolizing enzyme and transporter gene expression through the life stages of the mouse. *PLoS ONE* 6 (9), e24381.
- Lehmphul, I.; Brabant, G.; Wallaschofski, H.; Ruchala, M.; Strasburger, C. J.; Köhrle, J.; 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* 24 (9), S. 1350–1360.
- Lietzow, J.; Golchert, J.; Homuth, G.; Völker, U.; Jonas, W.; Köhrle, J. (2016): 3,5-T2 alters murine genes relevant for xenobiotic, steroid, and thyroid hormone metabolism. *J Mol Endocrinol* 56 (4), S. 311–323.
- Lillo, C.; Kataya, A. R. A.; Heidari, B.; Creighton, M. T.; Nemie-Feyissa, D.; Ginbot, Z.; Jonassen, E. M. (2014): Protein phosphatases PP2A, PP4 and PP6: mediators and regulators in development and responses to environmental cues. *Plant Cell Environ* 37 (12), S. 2631–2648.
- Lin, H.-Y.; Sun, M.; Tang, H.-Y.; Lin, C.; Luidens, M. K.; Mousa, S. A.; Incerpi, S.; Drusano, G. L.; Davis, F. B.; Davis, P. J. (2009): L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol, Cell Physiol* 296 (5), C980-91.
- Lombardi, A.; Beneduce, L.; Moreno, M.; Diano, S.; Colantuoni, V.; Ursini, M. V.; Lanni, A.; Goglia, F. (2000): 3,5-diiodo-L-thyronine regulates glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in the rat. *Endocrinology* 141 (5), S. 1729–1734.
- Lombardi, A.; de Lange, P.; Silvestri, E.; Busiello, R. A.; Lanni, A.; Goglia, F.; 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. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (3), E497-502.
- Lombardi, A.; Lanni, A.; Moreno, M.; Brand, M. D.; Goglia, F. (1998): Effect of 3,5-di-iodo-L-thyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus. *Biochem J* 330 (Pt 1), S. 521–526.
- Lorbek, G.; Lewinska, M.; Rozman, D. (2012): Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids--from mouse models to human diseases. *FEBS J* 279 (9), S. 1516–1533.
- Lowe, M. E. (1997): Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annu Rev Nutr* 17, S. 141–158.
- Lucius, A.; Khajavi, N.; Reinach, P. S.; Köhrle, J.; Dhandapani, P.; Huimann, P.; Ljubojevic, N.; Grötzing, C.; Mergler, S. (2016): 3-Iodothyronamine increases transient receptor potential melastatin channel 8 (TRPM8) activity in immortalized human corneal epithelial cells. *Cell Signal* 28 (3), S. 136–147.
- Lund, E. G.; Guileyardo, J. M.; Russell, D. W. (1999): cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13), S. 7238–7243.
- Manni, M. E.; Siena, G. de; Saba, A.; Marchini, M.; Dicembrini, I.; Bigagli, E.; Cinci, L.; Lodovici, M.; Chiellini, G.; Zucchi, R. *et al.* (2012): 3-Iodothyronamine: a modulator of the hypothalamus-pancreas-thyroid axes in mice. *Br J Pharmacol* 166 (2), S. 650–658.
- Manni, M. E.; Siena, G. de; Saba, A.; Marchini, M.; Landucci, E.; Gerace, E.; Zazzeri, M.; Musilli, C.; Pellegrini-Giampietro, D.; Maticucci, R. *et al.* (2013): Pharmacological effects of 3-iodothyronamine (T1AM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold. *Br J Pharmacol* 168 (2), S. 354–362.
- Mariotti, V.; Melissari, E.; Iofrida, C.; Righi, M.; Di Russo, M.; Donzelli, R.; Saba, A.; Frascarelli, S.; Chiellini, G.; Zucchi, R. *et al.* (2014): Modulation of gene expression by 3-iodothyronamine: genetic evidence for a lipolytic pattern. *PLoS ONE* 9 (11), e106923.
- Martín-Montalvo, A.; Villalba, J. M.; Navas, P.; de Cabo, R. (2011): NRF2, cancer and calorie restriction. *Oncogene* 30 (5), S. 505–520.
- Matityahu, A.; Onn, I. (2018): A new twist in the coil: functions of the coiled-coil domain of structural maintenance of chromosome (SMC) proteins. *Curr Genet* 64 (1), S. 109–116.

- Mazein, A.; Watterson, S.; Hsieh, W.-Y.; Griffiths, W. J.; Ghazal, P. (2013): A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. *Biochem Pharmacol* 86 (1), S. 56–66.
- McCarver, D. G.; Hines, R. N. (2002): The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 300 (2), S. 361–366.
- McCullough, A. J. (2006): Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 40 Suppl 1, S17-29.
- Meaney, S.; Lütjohann, D.; Diczfalusy, U.; Björkhem, I. (2000): Formation of oxysterols from different pools of cholesterol as studied by stable isotope technique: cerebral origin of most circulating 24S-hydroxycholesterol in rats, but not in mice. *Biochim Biophys Acta* 1486 (2-3), S. 293–298.
- Mendoza, A.; Navarrete-Ramírez, P.; Hernández-Puga, G.; Villalobos, P.; Holzer, G.; Renaud, J. P.; Laudet, V.; Orozco, A. (2013): 3,5-T2 is an alternative ligand for the thyroid hormone receptor  $\beta$ 1. *Endocrinology* 154 (8), S. 2948–2958.
- Miller, W. L. (2008): Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev* 13, S. 1–18.
- Mollica, M. P.; Lionetti, L.; Moreno, M.; Lombardi, A.; de Lange, P.; Antonelli, A.; Lanni, A.; Cavaliere, G.; Barletta, A.; Goglia, F. (2009): 3,5-diiodo-L-thyronine, by modulating mitochondrial functions, reverses hepatic fat accumulation in rats fed a high-fat diet. *J Hepatol* 51 (2), S. 363–370.
- Mondal, S.; Raja, K.; Schweizer, U.; Mugesh, G. (2016): Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. *Angew Chem Int Ed Engl* 55 (27), S. 7606–7630.
- Moran, C.; Chatterjee, K. (2015): Resistance to thyroid hormone due to defective thyroid receptor alpha. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29 (4), S. 647–657.
- Moreno, M.; de Lange, P.; Lombardi, A.; Silvestri, E.; Lanni, A.; Goglia, F. (2008): Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid* 18 (2), S. 239–253.
- Moreno, M.; Lanni, A.; Lombardi, A.; Goglia, F. (1997): How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J Physiol (Lond)* 505 (Pt 2), S. 529–538.
- Moreno, M.; Lombardi, A.; Beneduce, L.; Silvestri, E.; Pinna, G.; Goglia, F.; Lanni, A. (2002): Are the effects of T3 on resting metabolic rate in euthyroid rats entirely caused by T3 itself? *Endocrinology* 143 (2), S. 504–510.
- Moreno, M.; Silvestri, E.; Coppola, M.; Goldberg, I. J.; Huang, L.-S.; Salzano, A. M.; D'Angelo, F.; Ehrenkranz, J. R.; Goglia, F. (2016): 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine- and 3,5-Diiodo-L-Thyronine- Affected Metabolic Pathways in Liver of LDL Receptor Deficient Mice. *Front Physiol* 7, S. 545.
- Moreno, M.; Silvestri, E.; de Matteis, R.; de Lange, P.; Lombardi, A.; Glinni, D.; Senese, R.; Cioffi, F.; Salzano, A. M.; Scaloni, A. *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 J* 25 (10), S. 3312–3324.
- Mullur, R.; Liu, Y.-Y.; Brent, G. A. (2014): Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev* 94 (2), S. 355–382.
- Mynatt, R. L.; Park, E. A.; Thorngate, F. E.; Das, H. K.; Cook, G. A. (1994): Changes in carnitine palmitoyltransferase-I mRNA abundance produced by hyperthyroidism and hypothyroidism parallel changes in activity. *Biochem Biophys Res Commun* 201 (2), S. 932–937.

- Nakamura, Y.; Fujishima, F.; Hui, X.-g.; Felizola, S. J. A.; Shibahara, Y.; Akahira, J.-i.; McNamara, K. M.; Rainey, W. E.; Sasano, H. (2015):  $3\beta$ HSD and CYB5A double positive adrenocortical cells during adrenal development/aging. *Endocr Res* 40 (1), S. 8–13.
- Navarrete-Ramírez, P.; Luna, M.; Valverde-R, C.; Orozco, A. (2014): 3,5-di-iodothyronine stimulates tilapia growth through an alternate isoform of thyroid hormone receptor  $\beta$ 1. *J Mol Endocrinol* 52 (1), S. 1–9.
- Ness, G. C.; Pendleton, L. C.; Li, Y. C.; Chiang, J. Y. (1990): Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 alpha hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 172 (3), S. 1150–1156.
- Neuschwander-Tetri, B. A. (2017): Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med* 15 (1), S. 45.
- Nilsson, M. E.; Vandenput, L.; Tivesten, Å.; Norlén, A.-K.; Lagerquist, M. K.; Windahl, S. H.; Börjesson, A. E.; Farman, H. H.; Poutanen, M.; Benrick, A. *et al.* (2015): Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology* 156 (7), S. 2492–2502.
- Niture, S. K.; Khatri, R.; Jaiswal, A. K. (2014): Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med* 66, S. 36–44.
- Norlin, M.; Wikvall, K. (2007): Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Curr Mol Med* 7 (2), S. 199–218.
- Ohba, K.; Leow, M. K.-S.; Singh, B. K.; Sinha, R. A.; Lesmana, R.; Liao, X.-H.; Ghosh, S.; Refetoff, S.; Sng, J. C. G.; Yen, P. M. (2016): Desensitization and Incomplete Recovery of Hepatic Target Genes After Chronic Thyroid Hormone Treatment and Withdrawal in Male Adult Mice. *Endocrinology* 157 (4), S. 1660–1672.
- O'Leary, K. A.; Li, H. C.; Ram, P. A.; McQuiddy, P.; Waxman, D. J.; Kasper, C. B. (1997): Thyroid regulation of NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase: identification of a thyroid-responsive element in the 5'-flank of the oxidoreductase gene. *Mol Pharmacol* 52 (1), S. 46–53.
- Ortiga-Carvalho, T. M.; Sidhaye, A. R.; Wondisford, F. E. (2014): Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol* 10 (10), S. 582–591.
- Padron, A. S.; Neto, R. A. L.; Pantaleão, T. U.; Souza dos Santos, M. C. de; Araujo, R. L.; Andrade, B. M. de; da Silva Leandro, M.; Castro, J. P. S. W. de; Ferreira, A. C. F.; Carvalho, D. P. de (2014): Administration of 3,5-diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>) causes central hypothyroidism and stimulates thyroid-sensitive tissues. *J Endocrinol* 221 (3), S. 415–427.
- Perkins, A.; Nelson, K. J.; Parsonage, D.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. (2015): Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci* 40 (8), S. 435–445.
- Perra, A.; Simbula, G.; Simbula, M.; Pibiri, M.; Kowalik, M. A.; Sulas, P.; Cocco, M. T.; Ledda-Columbano, G. M.; Columbano, A. (2008): Thyroid hormone (T<sub>3</sub>) and TRbeta agonist GC-1 inhibit/reverse nonalcoholic fatty liver in rats. *FASEB J* 22 (8), S. 2981–2989.
- Pessayre, D. (2007): Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1, S20-7.
- Pfreundschuh, M.; Schölmerich, J. (2004): Pathophysiologie Pathobiochemie. 2. Auflage. München: Elsevier GmbH.
- Piehl, S.; Heberer, T.; Balizs, G.; Scanlan, T. S.; Köhrle, J. (2008a): 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 Commun Mass Spectrom* 22 (20), S. 3286–3296.

- Piehl, S.; Heberer, T.; Balizs, G.; Scanlan, T. S.; Smits, R.; Kokscho, B.; Köhrle, J. (2008b): Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* 149 (6), S. 3037–3045.
- Pietsch, C. A.; Scanlan, T. S.; Anderson, R. J. (2007): Thyronamines are substrates for human liver sulfotransferases. *Endocrinology* 148 (4), S. 1921–1927.
- Pietzner, M.; Lehmphul, I.; Friedrich, N.; Schurmann, C.; Ittermann, T.; Dörr, M.; Nauck, M.; Laqua, R.; Völker, U.; Brabant, G. *et al.* (2015): Translating pharmacological findings from hypothyroid rodents to euthyroid humans: is there a functional role of endogenous 3,5-T<sub>2</sub>? *Thyroid* 25 (2), S. 188–197.
- Postic, C.; Girard, J. (2008): The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes & Metabolism* 34 (6), S. 643–648.
- Poynton, R. A.; Hampton, M. B. (2014): Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1840 (2), S. 906–912.
- Rakov, H.; Engels, K.; Hönes, G. S.; Strucksberg, K.-H.; Moeller, L. C.; Köhrle, J.; Zwanziger, D.; Führer, D. (2016): Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in mice. *Biol Sex Differ* 7 (1), S. 36.
- Ram, P. A.; Waxman, D. J. (1991): Hepatic P450 expression in hypothyroid rats: differential responsiveness of male-specific P450 forms 2a (IIIA2), 2c (IIC11), and RLM2 (IIA2) to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 5 (1), S. 13–20.
- Ram, P. A.; Waxman, D. J. (1992): Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 267 (5), S. 3294–3301.
- Refetoff, S. (2000): Thyroid Hormone Serum Transport Proteins. Hg. v. Kenneth R. Feingold, Bradley Anawalt, Alison Boyce, George Chrousos, Kathleen Dungan, Ashley Grossman, et al. South Dartmouth (MA): Endotext.
- Regard, J. B.; Kataoka, H.; Cano, D. A.; Camerer, E.; Yin, L.; Zheng, Y.-W.; Scanlan, T. S.; Hebrok, M.; Coughlin, S. R. (2007): Probing cell type-specific functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion. *J Clin Invest* 117 (12), S. 4034–4043.
- Rochira, A.; Damiano, F.; Marsigliante, S.; Gnoni, G. V.; Siculella, L. (2013): 3,5-Diiodo-L-thyronine induces SREBP-1 proteolytic cleavage block and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells. *Biochim Biophys Acta* 1831 (12), S. 1679–1689.
- Ross, M. K.; Crow, J. A. (2007): Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *J Biochem Mol Toxicol* 21 (4), S. 187–196.
- Roy, G.; Placzek, E.; Scanlan, T. S. (2012): ApoB-100-containing lipoproteins are major carriers of 3-iodothyronamine in circulation. *J Biol Chem* 287 (3), S. 1790–1800.
- Russell, D. W. (2003): The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72, S. 137–174.
- Rutter, J.; Winge, D. R.; Schiffman, J. D. (2010): Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion* 10 (4), S. 393–401.
- Saba, A.; Chiellini, G.; Frascarelli, S.; Marchini, M.; Ghelardoni, S.; Raffaelli, A.; Tonacchera, M.; Vitti, P.; Scanlan, T. S.; Zucchi, R. (2010): Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology* 151 (10), S. 5063–5073.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (Hg.) (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. New York: Cold Spring Laboratory Press.
- Satoh, T.; Hosokawa, M. (1998): The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, S. 257–288.

- Scanlan, T. S.; Suchland, K. L.; Hart, M. E.; Chiellini, G.; Huang, Y.; Kruzich, P. J.; Frascarelli, S.; Crossley, D. A.; Bunzow, J. R.; Ronca-Testoni, S. *et al.* (2004): 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med* 10 (6), S. 638–642.
- Schanze, N.; Jacobi, S. F.; Rijntjes, E.; Mergler, S.; Del Olmo, M.; Hoefig, C. S.; Khajavi, N.; Lehmphul, I.; Biebermann, H.; Mittag, J. *et al.* (2017): 3-Iodothyronamine Decreases Expression of Genes Involved in Iodide Metabolism in Mouse Thyroids and Inhibits Iodide Uptake in PCCL3 Thyrocytes. *Thyroid* 27 (1), S. 11–22.
- Schröder, M.; Kaufman, R. J. (2005a): ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569 (1-2), S. 29–63.
- Schröder, M.; Kaufman, R. J. (2005b): The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, S. 739–789.
- Schwartz, C. E.; May, M. M.; Carpenter, N. J.; Rogers, R. C.; Martin, J.; Bialer, M. G.; Ward, J.; Sanabria, J.; Marsa, S.; Lewis, J. A. *et al.* (2005): Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am J Hum Genet* 77 (1), S. 41–53.
- Schwarzenbacher, R.; Zeth, K.; Diederichs, K.; Gries, A.; Kostner, G. M.; Laggner, P.; Prassl, R. (1999): Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J* 18 (22), S. 6228–6239.
- Senese, R.; Cioffi, F.; de Lange, P.; Goglia, F.; Lanni, A. (2014): Thyroid: biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. *J Endocrinol* 221 (2), R1-12.
- Severino, V.; Locker, J.; Ledda-Columbano, G. M.; Columbano, A.; Parente, A.; Chambery, A. (2011): Proteomic characterization of early changes induced by triiodothyronine in rat liver. *J Proteome Res* 10 (7), S. 3212–3224.
- Silva, J. C.; Gorenstein, M. V.; Li, G.-Z.; Vissers, J. P. C.; Geromanos, S. J. (2006): Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* 5 (1), S. 144–156.
- Sinha, R. A.; Singh, B. K.; Yen, P. M. (2014): Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 25 (10), S. 538–545.
- Slitt, A. L.; Cherrington, N. J.; Maher, J. M.; Klaassen, C. D. (2003): Induction of multidrug resistance protein 3 in rat liver is associated with altered vectorial excretion of acetaminophen metabolites. *Drug Metab Dispos* 31 (9), S. 1176–1186.
- Soundar, S.; O'Hagan, M.; Fomulu, K. S.; Colman, R. F. (2006): Identification of Mn<sup>2+</sup>-binding aspartates from alpha, beta, and gamma subunits of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 281 (30), S. 21073–21081.
- Squizzato, A.; Romualdi, E.; Büller, H. R.; Gerdes, V. E. A. (2007): Clinical review: Thyroid dysfunction and effects on coagulation and fibrinolysis: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (7), S. 2415–2420.
- Stuijver, D. J. F.; van Zaane, B.; Romualdi, E.; Brandjes, D. P. M.; Gerdes, V. E. A.; Squizzato, A. (2012): The effect of hyperthyroidism on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost* 108 (6), S. 1077–1088.
- Takahashi, S.; Fukami, T.; Masuo, Y.; Brocker, C. N.; Xie, C.; Krausz, K. W.; Wolf, C. R.; Henderson, C. J.; Gonzalez, F. J. (2016): Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *J Lipid Res* 57 (12), S. 2130–2137.
- Thakran, S.; Sharma, P.; Attia, R. R.; Hori, R. T.; Deng, X.; Elam, M. B.; Park, E. A. (2013): Role of sirtuin 1 in the regulation of hepatic gene expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* 288 (2), S. 807–818.

- Tortora, G. J.; Derrickson, B. H. (2006): Anatomie und Physiologie. 1. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Townsend, D. M.; Findlay, V. L.; Tew, K. D. (2005): Glutathione S-Transferases as Regulators of Kinase Pathways and Anticancer Drug Targets. In: Helmut Sies (Hg.): Glutathione transferases and gamma-glutamyl transpeptidases, Bd. 401. Amsterdam: Elsevier (Methods in Enzymology, 401), S. 287–307.
- Trauner, M.; Boyer, J. L. (2003): Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83 (2), S. 633–671.
- Vacca, M.; Degirolamo, C.; Mariani-Costantini, R.; Palasciano, G.; Moschetta, A. (2011): Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3 (5), S. 562–587.
- van Zaane, B.; Squizzato, A.; Debeij, J.; Dekkers, O. M.; Meijers, J. C. M.; van Zanten, A. P.; Büller, H. R.; Gerdes, V. E. A.; Cannegieter, S. C.; Brandjes, D. P. M. (2011): Alterations in coagulation and fibrinolysis after levothyroxine exposure in healthy volunteers: a controlled randomized crossover study. *J Thromb Haemost* 9 (9), S. 1816–1824.
- Vatner, D. F.; Snikeris, J.; Popov, V.; Perry, R. J.; Rahimi, Y.; Samuel, V. T. (2015): 3,5 Diiodo-L-Thyronine (T2) Does Not Prevent Hepatic Steatosis or Insulin Resistance in Fat-Fed Sprague Dawley Rats. *PLoS ONE* 10 (10), e0140837.
- Visser, W. E.; Friesema, E. C. H.; Visser, T. J. (2011): Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 25 (1), S. 1–14.
- Vomhof-DeKrey, E. E.; Picklo, M. J. (2012): The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem* 23 (10), S. 1201–1206.
- Weber, J.; McInnes, J.; Kizilirmak, C.; Rehders, M.; Qatato, M.; Wirth, E. K.; Schweizer, U.; Verrey, F.; Heuer, H.; Brix, K. (2017): Interdependence of thyroglobulin processing and thyroid hormone export in the mouse thyroid gland. *Eur J Cell Biol* 96 (5), S. 440–456.
- Weitzel, J. M.; Hamann, S.; Jauk, M.; Lacey, M.; Filbry, A.; Radtke, C.; Iwen, K. A. H.; Kutz, S.; Harneit, A.; Lizardi, P. M. *et al.* (2003): Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats. *J Mol Endocrinol* 31 (2), S. 291–303.
- Weitzel, J. M.; Radtke, C.; Seitz, H. J. (2001): Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Nucleic Acids Res* 29 (24), S. 5148–5155.
- Winterbourn, C. C. (2013): The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Meth Enzymol* 528, S. 3–25.
- Wirth, E. K.; Roth, S.; Blechschmidt, C.; Hölter, S. M.; Becker, L.; Racz, I.; Zimmer, A.; Klopstock, T.; Gailus-Durner, V.; Fuchs, H. *et al.* (2009): Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J Neurosci* 29 (30), S. 9439–9449.
- Wood, W. J. L.; Geraci, T.; Nilsen, A.; DeBarber, A. E.; Scanlan, T. S. (2009): Iodothyronamines are oxidatively deaminated to iodothyroacetic acids in vivo. *Chembiochem* 10 (2), S. 361–365.
- Wu, G.; Fang, Y.-Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D. (2004): Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134 (3), S. 489–492.
- Wu, K. C.; Cui, J. Y.; Klaassen, C. D. (2012): Effect of graded Nrf2 activation on phase-I and -II drug metabolizing enzymes and transporters in mouse liver. *PLoS ONE* 7 (7), e39006.
- Wu, S.-Y.; Green, W. L.; Huang, W.-S.; Hays, M. T.; Chopra, I. J. (2005): Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15 (8), S. 943–958.

- Yeager, R. L.; Reisman, S. A.; Aleksunes, L. M.; Klaassen, C. D. (2009): Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery". *Toxicol Sci* 111 (2), S. 238–246.
- Yen, P. M.; Feng, X.; Flamant, F.; Chen, Y.; Walker, R. L.; Weiss, R. E.; Chassande, O.; Samarut, J.; Refetoff, S.; Meltzer, P. S. (2003): Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep* 4 (6), S. 581–587.
- Yue, F.; Cheng, Y.; Breschi, A.; Vierstra, J.; Wu, W.; Ryba, T.; Sandstrom, R.; Ma, Z.; Davis, C.; Pope, B. D. *et al.* (2014): A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* 515 (7527), S. 355–364.
- Zhang, J.; Liu, Q. (2015): Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 6 (4), S. 254–264.
- Zhang, Y.; Cheng, X.; Aleksunes, L.; Klaassen, C. D. (2012): Transcription factor-mediated regulation of carboxylesterase enzymes in livers of mice. *Drug Metab Dispos* 40 (6), S. 1191–1197.
- Zimmermann, M. B.; Boelaert, K. (2015): Iodine deficiency and thyroid disorders. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 3 (4), S. 286–295.
- Zoeller, R. T.; Tan, S. W.; Tyl, R. W. (2007): General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit Rev Toxicol* 37 (1-2), S. 11–53.



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Die Biosynthese und Freisetzung von Schilddrüsenhormonen.....	2
Abbildung 1.2:	Die sequenzielle Monodeiodierungs-Kaskade. ....	4
Abbildung 1.3:	Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT)-Achse.....	5
Abbildung 1.4:	Die kanonischen und nicht-kanonischen Wirkmechanismen von Schilddrüsen-hormonen.....	6
Abbildung 1.5:	3-Iodthyronamin (3-T <sub>1</sub> AM) und seine Metabolite. ....	10
Abbildung 3.1:	Ablauf der Transkriptomanalyse unter Nutzung des <i>GeneChip</i> <sup>®</sup> <i>WT</i> <i>PLUS Reagent Kits</i> .....	33
Abbildung 3.2:	Gradient für die Auftrennung und Elution der Peptide am UltiMate 3000 RSLC System.....	39
Abbildung 4.1:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-basierten Genexpressionsmuster von PCCL3-Zellen unter TSH-Stimulation mit bzw. ohne 3-T <sub>1</sub> AM-Behandlung für 3 h. ....	48
Abbildung 4.2:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-basierten hepatischen Genexpressionsmuster von HFD-gefütterten Mäusen mit und ohne 3,5-T <sub>2</sub> -Behandlung.....	50
Abbildung 4.3:	„Volcano-Plot“ der in der Transkriptomanalyse detektierten Gen- spezifischen Transkripte von 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zur HFD-Kontrollgruppe. ....	51
Abbildung 4.4:	Ergebnisse der <i>in silico</i> -Pathway-Analyse der hepatischen Gene mit signifikant veränderter mRNA-Menge ( $p \leq 0,05$ , fold change $\geq  1,5 $ ) in den 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten HFD-Mäusen im Vergleich zur HFD- Kontrollgruppe. ....	52
Abbildung 4.5:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Microarray-basierten hepatischen Genexpressionsmuster von SD- und HFD-gefütterten Mäusen mit und ohne 3,5-T <sub>2</sub> -Behandlung.....	54
Abbildung 4.6:	Vergleich der Anzahl der auf mRNA-Ebene signifikant differenziell exprimierten hepatischen Gene in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD bzw. HFD im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen ( $p \leq 0,05$ , fold change $\geq  1,5 $ ). ....	55
Abbildung 4.7:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der hepatischen Proteomprofile von SD- und HFD-gefütterten Mäusen mit und ohne 3,5-T <sub>2</sub> -Behandlung.....	56

Abbildung 4.8:	Anzahl identifizierter hepatischer Proteine in der Proteomanalyse von Kontroll- und 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD und HFD.....	57
Abbildung 4.9:	Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanter hepatischer Proteine in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD bzw. HFD im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen. ....	58
Abbildung 4.10:	Heatmap der differenziell abundanten hepatischen Proteine von 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD und HFD im Vergleich zur Kontrollgruppe. ....	60
Abbildung 4.11:	Ergebnisse der <i>in silico</i> -Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p \leq 0,05$ , $fold\ change \geq  1,5 $ ) in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD (A) und HFD (B) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.....	61
Abbildung 4.12:	Western Blot-Analyse von CYP7A1 in Lebergewebe von Kontroll- sowie 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD und HFD.....	65
Abbildung 4.13:	Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanter hepatischer Transkripte und Proteine in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD (A) und HFD (B) im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen. ....	66
Abbildung 4.14:	Graphen, welche den Zusammenhang zwischen Transkript- und Protein-Intensitäten (x-Achse) und den jeweiligen Variationskoeffizienten (CV, y-Achse) für alle Bio-Replikate der 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten und Kontroll (Saline)-Mäuse unter SD und HFD darstellen.....	71
Abbildung 4.15:	Konzentrationen der Sexualhormone Progesteron (A), Androstendion (B), Testosteron (C) und Dihydrotestosteron (D) in Lebergewebe von Kontroll- und 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter HFD. ....	73
Abbildung 4.16:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der hepatischen Proteomprofile euthyreoter und hypothyreoter Mäuse. ....	76
Abbildung 4.17:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der hepatischen Proteomprofile euthyreoter und hyperthyreoter Mäuse. ....	76
Abbildung 4.18:	Anzahl detektierter Proteine in den Proteomanalysen hypo-, eu- und hyperthyreoter Mäuse.....	78
Abbildung 4.19:	Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanter hepatischer Proteine in hypo- und hyperthyreoten Mäusen im Vergleich zur jeweiligen euthyreoten Kontrollgruppe. ....	78
Abbildung 4.20:	Ergebnisse der <i>in silico</i> -Pathway-Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p(FDR) \leq 0,05$ , $fold\ change \geq  1,5 $ ) in hypothyreoten (A) und hyperthyreoten (B) Mäusen im Vergleich zur euthyreoten Kontrollgruppe.....	80

---

Abbildung 4.21:	Vergleich der Anzahl signifikant differenziell abundanter hepatischer Transkripte und Proteine in hypothyreoten (A) und hyperthyreoten (B) Mäusen im Vergleich zu ihren jeweiligen euthyreoten Kontrollgruppen...84
Abbildung 5.1:	Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T <sub>2</sub> auf die Expression hepatischer Gene, welche Proteine des Cholesterol- und Gallensäure-Metabolismus kodieren, in Mäusen unter SD und HFD.....93
Abbildung 5.2:	Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T <sub>2</sub> auf die Expression hepatischer Gene, welche Xenobiotika-metabolisierende Enzyme kodieren, in Mäusen unter SD und HFD. ....95
Abbildung 5.3:	Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T <sub>2</sub> auf die Abundanz hepatischer NRF2-regulierter bzw. ROS-protektiver Proteine in Mäusen unter SD und HFD. .... 104
Abbildung 5.4:	Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T <sub>2</sub> auf die Abundanz hepatischer Apolipoproteine in Mäusen unter SD und HFD. .... 106
Abbildung 5.5:	Heatmap zur Illustration des Einflusses von 3,5-T <sub>2</sub> auf die Abundanz ausgewählter hepatischer Proteine in Mäusen unter SD und HFD..... 109
Abbildung 5.6:	Darstellung der <i>Pathways</i> zur Cholesterol- sowie klassischen und alternativen Gallensäure-Biosynthese, die den Einfluss von 3,5-T <sub>2</sub> auf die Mengen darin involvierter hepatischer Proteine und korrespondierender Transkripte in Mäusen unter HFD zeigt. .... 111
Abbildung 5.7:	Modell, das den Einfluss von 3,5-T <sub>2</sub> auf hepatische Enzyme der Sexualhormon-Biosynthese sowie Sexualhormon-Metabolite in Mäusen unter HFD zeigt. .... 119



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	In dieser Arbeit verwendete Mausstämme .....	19
Tabelle 2.2:	In dieser Arbeit verwendete Zelllinien .....	19
Tabelle 2.3:	In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte und Hilfsmittel .....	19
Tabelle 2.4:	In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien .....	21
Tabelle 2.5:	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.....	21
Tabelle 2.6:	In dieser Arbeit verwendete Enzyme .....	22
Tabelle 2.7:	In dieser Arbeit verwendete Kits .....	23
Tabelle 2.8:	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Protein- Präparation.....	23
Tabelle 2.9:	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für den Trypsinverdau mit vorangehendem Reduzieren und Alkylieren.....	23
Tabelle 2.10:	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Entsalzung von Peptidlösungen an C18-Material.....	24
Tabelle 2.11:	In dieser Arbeit verwendete Puffer für die LC-MS/MS.....	24
Tabelle 2.12:	In dieser Arbeit verwendete Puffer für die 1D-SDS-PAGE .....	24
Tabelle 2.13:	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse .....	25
Tabelle 2.14:	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen für die Coomassie- Färbung.....	25
Tabelle 2.15:	In dieser Arbeit verwendete Software und Datenbanken .....	26
Tabelle 3.1:	Endverdünnungen der Poly-A-RNA-Kontrollen .....	34
Tabelle 3.2:	Endkonzentrationen der Hybridisierungs-Kontrollen .....	34
Tabelle 3.3:	Eichgerade für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ...	37
Tabelle 3.4:	Parameter der massenspektrometrischen Analyse.....	39
Tabelle 3.5:	Zur Proteinidentifikation in <i>GeneData Refiner MS 10.0.3</i> verwendete Parameter.....	40
Tabelle 3.6:	Zur Proteinidentifikation in <i>MaxQuant 1.6.0.16</i> verwendete Parameter.....	41
Tabelle 4.1:	Ergebnisse der <i>in silico-Pathway-Analyse</i> der hepatischen Gene mit signifikant veränderten mRNA-Mengen ( $p \leq 0,05$ , <i>fold change</i> $\geq  1,5 $ ) in den 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten HFD-Mäusen im Vergleich zur HFD- Kontrollgruppe. ....	52

Tabelle 4.2:	Ergebnisse der <i>in silico-Pathway</i> -Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p \leq 0,05$ , <i>fold change</i> $\geq  1,5 $ ) in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten SD-gefütterten Mäusen im Vergleich zur SD-Kontrollgruppe. . 62	62
Tabelle 4.3:	Ergebnisse der <i>in silico-Pathway</i> -Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p \leq 0,05$ , <i>fold change</i> $\geq  1,5 $ ) in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten HFD-gefütterten Mäusen im Vergleich zur HFD-Kontrollgruppe. .... 63	63
Tabelle 4.4:	Transkripte und Proteine, die in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter SD sowohl im Transkriptom als auch im Proteom signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen. .... 67	67
Tabelle 4.5:	Transkripte und Proteine, die in 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter HFD sowohl im Transkriptom als auch im Proteom signifikant differenzielle Abundanzen aufwiesen. .... 68	68
Tabelle 4.6:	Sexualhormon-Konzentrationen im Serum sowie inguinalem und gonadalem weißen Fettgewebe (WAT) von 3,5-T <sub>2</sub> -behandelten Mäusen unter HFD im Vergleich zur Kontrollgruppe. .... 73	73
Tabelle 4.7:	Ergebnisse der <i>in silico-Pathway</i> -Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , <i>fold change</i> $\geq  1,5 $ ) im Vergleich hypothyreote vs. euthyreote Mäuse. .... 81	81
Tabelle 4.8:	Ergebnisse der <i>in silico-Pathway</i> -Analyse der hepatischen Proteine mit signifikant veränderter Abundanz ( $p(\text{FDR}) \leq 0,05$ , <i>fold change</i> $\geq  1,5 $ ) im Vergleich hyperthyreote vs. euthyreote Mäuse. .... 82	82
Tabelle 5.1:	Ergebnisse der Transkriptomanalyse 3-T <sub>1</sub> AM-behandelter PCCL3-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen für ausgewählte Gene..... 88	88

## Anhang

Auf der beiliegenden CD befinden sich folgende Dateien:

Abbildung\_A-I\_Western\_Blot-Analyse

Tabelle\_A-I\_Transkriptom\_PCCL3-Zellen\_3-T1AM

Tabelle\_A-II\_Transkriptom\_SD+HFD\_Mäuse\_3,5-T2

Tabelle\_A-III\_Proteom\_SD+HFD\_Mäuse\_3,5-T2

Tabelle\_A-IV\_Proteom+Transkriptom\_hypo- & hyperthyreote\_Mäuse



## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

---

Janine Golchert



## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Datenschutz-Gründen nicht enthalten.



## Publikationen

- Lietzow, Julika\*; **Golchert, Janine\***; Pietzner, Maik; Völker, Uwe; Poutanen, Matti; Ohlsson, Claes; Homuth, Georg; Köhrle, Josef (2020): Comparative analysis of the effects of long term 3,5-T2 treatment on the murine hepatic proteome and transcriptome under conditions of normal diet and high fat diet. *eingereicht*.  
\* gleichberechtigte Erstautorenschaft
- Sendler, Matthias; van den Brandt, Cindy; Glaubitz, Juliane; Wilden, Anika; **Golchert, Janine**; Weiss, Frank Ulrich; Homuth, Georg; De Freitas Chama, L. L.; Mishra, Neha; Mahajan, Ujjwal Mukund; Bossaller, Lukas; Völker, U.; Bröker, Babara M.; Mayerle, Julia; Lerch, Markus M. (2019): NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Responses in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 158 (1), 253-269.e14.
- Klinger-König, Johanna; Hertel, Johannes; van der Auwera, Sandra; Frenzel, Stefan; Pfeiffer, Liliane; Waldenberger, Melanie; **Golchert, Janine**; Teumer, Alexander; Nauck, Matthias; Homuth, Georg; Völzke, Henry; Grabe, Hans J. (2019): Methylation of the FKBP5 gene in association with FKBP5 genotypes, childhood maltreatment and depression. *Neuropsychopharmacology* 44 (5), S. 930–938.
- Witte, Jeannine; Mühlbauer, Melanie; Braun, Diana; Steinbach, Antje; **Golchert, Janine**; Rettig, Rainer; Grisk, Olaf (2018): Renal Soluble Guanylate Cyclase Is Downregulated in Sunitinib-Induced Hypertension. *J Am Heart Assoc* 7 (18), e009557.
- Sendler, Matthias; Weiss, Frank-Ulrich; **Golchert, Janine**; Homuth, Georg; van den Brandt, Cindy; Mahajan, Ujjwal M.; Partecke, Lars-Ivo; Döring, Paula; Gukovsky, Ilya; Gukovskaya, Anna S.; Wagh, Preshit R.; Lerch, Markus M.; Mayerle, Julia (2018): Cathepsin B-Mediated Activation of Trypsinogen in Endocytosing Macrophages Increases Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* 154 (3), 704-718.e10.
- Pietzner, Maik; Engelmann, Beatrice; Kacprowski, Tim; **Golchert, Janine**; Dirk, Anna-Luise; Hammer, Elke; Iwen, K. Alexander; Nauck, Matthias; Wallaschofski, Henri; Führer, Dagmar; Münte, Thomas F.; Friedrich, Nele; Völker, Uwe; Homuth, Georg; Brabant, Georg (2017): Plasma proteome and metabolome characterization of an experimental human thyrotoxicosis model. *BMC Med* 15 (1), S. 6.
- Lietzow, Julika; **Golchert, Janine**; Homuth, Georg; Völker, Uwe; Jonas, Wenke; Köhrle, Josef (2016): 3,5-T2 alters murine genes relevant for xenobiotic, steroid, and thyroid hormone metabolism. *J Mol Endocrinol* 56 (4), S. 311–323.
- Mühlhaus, Jessica; Dinter, Juliane; Nürnberg, Daniela; Rehders, Maren; Depke, Maren; **Golchert, Janine**; Homuth, Georg; Yi, Chun-Xia; Morin, Silke; Köhrle, Josef; Brix, Klaudia; Tschöp, Matthias; Kleinau, Gunnar; Biebermann, Heike (2014): Analysis of human TAAR8 and murine Taar8b mediated signaling pathways and expression profile. *Int J Mol Sci* 15 (11), S. 20638–20655.



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Völker bedanken, der mir die Möglichkeit gab dieses interessante Thema im Rahmen meiner Doktorarbeit zu bearbeiten. Zudem möchte ich ihm dafür danken, dass ich bereits seit meinem Studium in seiner Arbeitsgruppe diverse Methoden erlernen durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Georg Homuth, der mich nicht nur während meiner Doktorarbeit stets kompetent und fürsorglich betreut hat, sondern mir bereits während meiner Bachelor- und Masterarbeit zur Seite stand. Seine vielen wertvollen Anregungen und die konstruktiven Gespräche mit ihm haben maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Josef Köhrle, Dr. Julika Lietzow und Dr. Nancy Schanze vom Institut für Experimentelle Endokrinologie an der Charité Berlin sowie Dr. Wenke Jonas vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke. Ihnen möchte ich für die Bereitstellung der Proben und die überaus freundliche Kooperation sowie Diskussion der Daten danken. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dr. Dagmar Führer-Sakel und Dr. Helena Kerp von der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen am Universitätsklinikum Essen, die mir ebenso Proben für diese Arbeit bereitgestellt haben.

Diese Dissertation wurde im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms SPP1629 „ThyroidTransAct“ durchgeführt und finanziert. Für die dadurch ermöglichte Förderung der in dieser Arbeit durchgeführten Projekte sowie sämtliche anderen damit verbundenen Möglichkeiten zur individuellen wissenschaftlichen Weiterentwicklung, wie zahlreiche Dienstreisen, Tagungsteilnahmen und Kooperationen mit externen Partnern im SPP, bin ich sehr dankbar.

Bei Dr. Beatrice Engelmann und Dr. Maik Pietzner möchte ich mich herzlich für die wunderbare Zusammenarbeit in den verschiedenen Schilddrüsen-Projekten bedanken. Sie haben mir nicht nur bei der Auswertung der Proteomdaten, deren visueller Darstellung und anderen fachlichen Fragen weitergeholfen, sondern ohne sie wären auch die vielen Konferenzen nur halb so schön gewesen.

Für die zahlreichen MS-Messungen der Protein-Proben möchte ich mich bei Dr. Manuela Gesell Salazar und Dr. Vishnu M. Dhople bedanken.

„Meinen“ beiden Studentinnen Vanessa Kracke und Vivien Reinecke sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt. Ihre Betreuung im Rahmen verschiedener mit dieser Arbeit assoziierter Schilddrüsen-Projekte hat mir viel Freude bereitet.

Ich bedanke mich weiterhin bei Anja Wiechert, Marc Schaffer, Katrin Schoknecht und Ulrike Lissner, die mir im Laboralltag bei jeder noch so kleinen Frage stets freundlich mit Rat und Tat zur Seite standen.

Außerdem möchte ich allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Funktionellen Genomforschung danken, die für eine unheimlich tolle Arbeitsatmosphäre gesorgt und die Zeit meiner Promotion mit fachlicher Hilfsbereitschaft sowie privaten Momenten bereichert haben. Vor allem die Kaffee- und Mittagsrunde wird mir unvergessen bleiben, da sie immer für gute Laune, Ablenkung und Motivation im Arbeitsalltag gesorgt hat.

Auch bei meinen lieben Freunden, die außerhalb des Instituts in anderen Arbeitsgruppen das gleiche Schicksal durchlebten, möchte ich mich bedanken. Ihnen verdanke ich nicht nur hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen, sondern auch zahlreiche schöne und lustige Stunden, die mich daran erinnern haben, dass es manchmal auch wichtigere Dinge als die Arbeit gibt.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Familie und besonders meinen Eltern danken. Ihre kontinuierliche Unterstützung und ihr Verständnis in den letzten Jahren gaben mir stetigen Rückhalt. Ihr habt mich so weit gebracht und euch verdanke ich die Fertigstellung dieser Arbeit.