

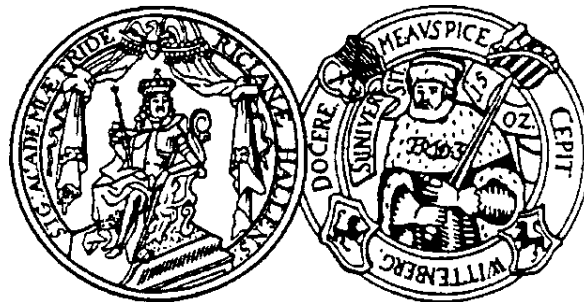
**Studien zur Bedeutung des PPAR α für die Regulation des
Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises sowie zu
humanspezifischen Einflussfaktoren auf die PPAR α -Expression**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik



der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Nicole Wege

geboren am 12.11.1982 in Weißenfels

1. Gutachter: Frau Prof. G. I. Stangl
2. Gutachter: Herr Prof. K. Eder

Verteidigungstermin: 26.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Der Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptor α (PPARα)	1
1.2 Schilddrüsenhormonstoffwechsel und Fasten	2
1.3 Zirkadiane Rhythmik von PPARα	6
2. Zielstellung	8
3. Material und Methoden	10
3.1 <i>In-vitro</i>-Untersuchungen	10
3.1.1 Kultivierung der Zellen	10
3.1.2 MTT-Test	11
3.1.3 Inkubation der T α T1-Zellen	12
3.1.4 Analytik	12
3.2 Tierexperimentelle Studien	13
3.2.1. Fastenversuche (<i>in-vivo</i> -Versuch 1 und 2)	13
3.2.1.1 Probennahme	13
3.2.1.2 Analytik	14
3.2.2 Orale Applikation von WY 14.643 (<i>in-vivo</i> -Versuch 3)	14
3.2.2.1 Probennahme	15
3.2.2.2 Analytik	15
3.3 Humanstudien	16
3.3.1 Probandenauswahl	16
3.3.2 Studiendesign	16
3.3.3 Probennahme	17
3.3.4 Analytik	18
3.4 Analytische Methoden	18
3.4.1 Bestimmung der Konzentrationen von NEFA im Plasma	18
3.4.2 Analyse der Konzentrationen von Schilddrüsenhormonen im Plasma/Serum	19
3.4.2.1 Bestimmung von T4, T3, fT4 und fT3 mittels Radioimmunassay	19
3.4.2.2 Bestimmung von fT4 mittels ELISA	20
3.4.3 Bestimmung der Leptinkonzentration im Plasma	21
3.4.4 Protein-Expressionsanalysen	22
3.4.4.1 Proteinisolierung	22
3.4.4.2 SDS-Page und Western Blot	22
3.4.5 Genexpressionsanalysen mittels <i>realtime</i> RT-PCR und <i>in-situ</i> -Hybridisierung	24
3.4.5.1 RNA-Isolierung	24
3.4.5.2 cDNA-Synthese	26
3.4.5.3 <i>Realtime</i> RT-PCR	27
3.4.5.4 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	31

3.4.6 TSH β -Promotoraktivitätsanalyse	32
3.4.6.1 Gewinnung des TSH β -Promotor-Reportergenkonstrukts	32
3.4.6.2 Transiente Transfektion und Dualer Luciferase-Assay	34
3.5 Statistik	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Ergebnisse der <i>in-vitro</i>-Untersuchungen	36
4.1.1 Relative mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen nach Inkubation der T α T1-Zellen mit synthetischen PPAR α -Agonisten	36
4.1.2 Relative mRNA-Konzentration von TSH β nach Inkubation der T α T1-Zellen mit synthetischen PPAR α -Agonisten	37
4.1.3 Relative mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen nach Inkubation der T α T1-Zellen mit natürlichen PPAR α -Agonisten	38
4.1.4 Relative mRNA-Konzentration von TSH β nach Inkubation der T α T1-Zellen mit natürlichen PPAR α -Agonisten	40
4.1.5 Relative mRNA-Konzentrationen von TR β 2, RXR α und Neuromedin B nach Inkubation der T α T1-Zellen mit PPAR α -Agonisten	41
4.1.6 Relative mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Corepressoren nach Inkubation der T α T1-Zellen mit PPAR α -Agonisten	41
4.1.7 Ergebnisse der TSH β -Promotoraktivitätsanalysen	44
4.2 Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen	45
4.2.1 Fastenversuch (<i>in-vivo</i> -Versuch 1)	45
4.2.1.1 Körper- und relatives Lebergewicht	45
4.2.1.2 Konzentrationen von NEFA im Plasma	46
4.2.1.3 Konzentrationen von T4, T3, fT4 und fT3 im Plasma	47
4.2.1.4 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen im Hypothalamus	48
4.2.1.5 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen in der Hypophyse	49
4.2.1.6 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen in der Schilddrüse	50
4.2.2 Fastenversuch (<i>in-vivo</i> -Versuch 2)	52
4.2.2.1 Körper- und relatives Lebergewicht	52
4.2.2.2 Konzentrationen von NEFA im Plasma	53
4.2.2.3 Konzentration von fT4 im Plasma	54
4.2.2.4 Konzentration von Leptin im Plasma	54
4.2.2.5 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen im Hypothalamus	55
4.2.2.6 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen in der Hypophyse	56
4.2.2.7 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen in der Schilddrüse	58
4.2.2.8 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen in der Leber	59
4.2.3 Orale Applikation von WY 14.643 (<i>in-vivo</i> -Versuch 3)	61
4.2.3.1 Körpergewichtsentwicklung und relatives Lebergewicht	61
4.2.3.2 Konzentration von fT4 im Plasma	62
4.2.3.3 Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung	62
4.2.3.4 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen im Hypothalamus	63
4.2.3.5 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen in der Hypophyse	64
4.2.3.6 Ergebnisse der <i>realtime</i> RT-PCR-Analysen in der Schilddrüse	66
4.3 Ergebnisse der Humanstudien	67
4.3.1 24 h-mRNA-Expressionsprofile von PPAR α und BMAL1 in Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen	67
4.3.2 Unterschiede in den Nacht/Tag-mRNA-Expressionen von PPAR α und BMAL1 in Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen	68
4.3.3 Unterschiede in der Nacht/Tag-Protein-Expression von PPAR α in	

Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen	69
5. Diskussion	71
5.1 Bedeutung des PPARα für die fastenbedingten Veränderungen des Schilddrüsenhormonstoffwechsels	71
5.1.1 Einfluss einer PPAR α -Aktivierung durch synthetische und natürliche PPAR α -Agonisten auf die TSH-mRNA-Expression	71
5.1.2 Bedeutung des PPAR α für die Expression neuronaler und peripherer Einflussfaktoren der TSH-Synthese und-Sekretion	76
5.1.3 Auswirkungen einer fasten- und genotypbedingten Veränderung der TSH-Expression auf die Synthese der Schilddrüsenhormone	83
5.1.4 Einfluss von PPAR α auf Schilddrüsenhormon-inaktivierende Gene der Leber	84
5.1.5 Einfluss von PPAR α auf die Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT10	86
5.2 Effekt einer regelmäßigen Nahrungsaufnahme versus Fasten auf die 24 h-Expression von PPARα und BMAL1 männlicher und weiblicher Probanden	88
6. Zusammenfassung	92
7. Summary	97
8. Literaturverzeichnis	101

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Transkriptionsregulierung durch Bindung des PPAR α -RXR-Komplex an PPREs von PPAR α -Zielgenen.
- Abbildung 2: A) Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis mit klassischem Feedbackmechanismus
B) Inaktivierung und Ausscheidung von T4 in der Leber.
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zentrifugation zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus Vollblut mittels Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich).
- Abbildung 4: Relative mRNA-Konzentrationen der A) Carnitin-Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) und B) Carnitin-Acylcarnitintranslokase (CACT) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen mit 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643, Ciprofibrat oder 0,01 % DMSO (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.
- Abbildung 5: Relative mRNA-Konzentration der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen in 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643, Ciprofibrat oder 0,01 % DMSO (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.
- Abbildung 6: Relative mRNA-Konzentrationen der A) langkettigen Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase (LCAD) und B) Carnitin-Acylcarnitintranslokase (CACT) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen in 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h-Inkubation der Zellen mit 20 μ M 9(S)-HODE, 2 μ M 8(S)-HETE oder 0,64 % Ethanol (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.
- Abbildung 7: Relative mRNA-Konzentrationen der A) Carnitin-Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) und B) Carnitin-Acylcarnitintranslokase (CACT) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen mit 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 200 μ M und 400 μ M Ölsäure oder mit 0,5 % FKS-haltigem Medium allein (Kontrolle).
- Abbildung 8: Relative mRNA-Konzentration der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen in 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h-Inkubation der Zellen mit 20 μ M 9(S)-HODE, 2 μ M 8(S)-HETE oder 0,64 % Ethanol (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.
- Abbildung 9: Relative mRNA-Konzentration der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen mit 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 200 μ M und 400 μ M Ölsäure oder mit 0,5 % FKS-haltigem Medium allein

- (Kontrolle).
- Abbildung 10: Effekt des PPAR α -Agonisten WY 14.643 auf die Promotoraktivität der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) in HepG2-Zellen.
- Abbildung 11: A) Körpergewicht (g) und B) relatives Lebergewicht (g/100 g KG) von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 12: Konzentrationen unveresterter Fettsäuren (NEFA) (mmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 13: Konzentrationen von A) Thyroxin (T4) (nmol/l), B) Triiodthyronin (T3) (nmol/l), C) freiem T4 (fT4) (pmol/l) und D) freiem T3 (fT3) (pmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 14: Relative mRNA-Konzentration von Thyreoliberin (TRH) im Hypothalamus von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 15: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2 (HMGCS2), B) β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β), C) α -Untereinheit des Thyreotropins (TSH α), D) Neuromedin B, E) TRH-*degrading enzyme* (TRHDE), F) Schilddrüsenhormonrezeptor (TR β 2), G) Typ II 5' Deiodase (DIO2) und H) 9-cis Retinoid-X-Rezeptor α (RXR α) in der Hypophyse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 16: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Thyreotropin-Rezeptor (TSHR), B) *paired-domain/homeo box transcription factor 8* (PAX-8), C) Natrium-Iodid-Symporter (NIS) und D) Thyreoperoxidase (TPO) in der Schilddrüse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 17: A) Körpergewicht (g) und B) relatives Lebergewicht (g/100 g KG) von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 18: Konzentrationen unveresterter Fettsäuren (NEFA) (mmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 19: Konzentration an freiem Triiodthyronin (fT4) (pmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 20: Konzentration an Leptin (ng/ml) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung

(Kontrolle).

- Abbildung 21: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Thyreoliberin (TRH), B) Proopiomelanocortin (POMC), C) Typ II 5' Deiodase (DIO2), D) Neuropeptid Y (NPY), E) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und F) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) im Hypothalamus von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 22: Relative mRNA-Konzentrationen von A) β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β), B) Proopiomelanocortin (POMC), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Hypophyse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 23: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Natrium-Iodid-Symporter (NIS), B) Thyreoperoxidase (TPO), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Schilddrüse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 24: Relative mRNA-Konzentrationen von A) *fibroblast growth factor* (FGF21), B) konstitutiver Androstan-Rezeptor (CAR), C) UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1), D) Sulfotransferase 1A1 (Sult1A1), E) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und F) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Leber von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).
- Abbildung 25: A) Körpergewichtsentwicklung über die 4-tägige Behandlung der Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäuse mit WY 14.643 (WY)- oder Kontroll (K)-lösung sowie B) das relative Lebergewicht (g/100 g KG) der Tiere zum Ende der Behandlung.
- Abbildung 26: Konzentration an freiem Thyroxin (fT4) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.
- Abbildung 27: Relative mRNA-Expression von Thyreoliberin (TRH) im paraventriculärem Nucleus (PVN) des Hypothalamus nach 4-tägiger Behandlung von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.
- Abbildung 28: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2 (HMGCS2), B) Thyreoliberin (TRH), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) im Hypothalamus von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.

- Abbildung 29: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2 (HMGCS2), B) β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Hypophyse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.
- Abbildung 30: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Natrium-Iodid-Symporter (NIS), B) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und C) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Schilddrüse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -*knockout* (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.
- Abbildung 31: In der Heatmap sind die Spearman-Korrelationskoeffizienten der 24 h-mRNA-Expressionsprofile von BMAL1 und PPAR α in Monozyten nicht-fastender (nf) und fastender (f) Männer (♂) und Frauen (♀) dargestellt.
- Abbildung 32: Veränderung der Nacht-mRNA-Expressionsprofile (1.00-7.00 Uhr) von A) PPAR α und B) BMAL1 relativ zu den Tages-mRNA-Expressionsprofilen (9.00-23.00 Uhr) nicht-fastender (nf) und fastender (f) Männer (♂) und Frauen (♀).
- Abbildung 33: Veränderung des Nacht-Protein-Expressionsprofils (1.00-7.00 Uhr) von PPAR α relativ zum Tages-mRNA-Expressionsprofil (9.00-23.00 Uhr) nicht-fastender (nf) und fastender (f) Männer (♂) und Frauen (♀).
- Abbildung 34: Fastenbedingte Veränderungen in der Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Reagenzien des NEFA C Testkits
Tabelle 2:	Reaktionsbedingungen des RIAs
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Pufferlösungen für die SDS-PAGE und den Western Blot
Tabelle 4:	Reagenzien für die FA-Agarose-Gel-Elektrophorese
Tabelle 5:	Mastermixkomponenten für cDNA-Synthese je Reaktionsansatz
Tabelle 6:	Bedingungen der <i>realtime</i> RT-PCR
Tabelle 7:	Primersequenzen der <i>realtime</i> RT-PCR
Tabelle 8:	PCR-Bedingungen der TSH β -Promotoranalyse
Tabelle 9:	Relative mRNA-Konzentrationen von Schilddrüsenhormonrezeptor β 2 (TR β 2), 9-cis Retinoid-X-Rezeptor α (RXR α) und Neuromedin B der T α T1-Zellen nach 6 h- und 24 h-Inkubation mit synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten
Tabelle 10:	Relative mRNA-Konzentrationen von <i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i> (Rev-erb α), <i>silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors</i> (SMRT) und <i>nuclear receptor corepressor 1</i> (Ncor1) der T α T1-Zellen nach 6 h- und 24 h-Inkubation mit synthetischen PPAR α -Agonisten
Tabelle 11:	Ergebnisse der NUBIScan-Analyse

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
BMAL1	<i>brain and muscle Arnt-like protein-1</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
CACT	Carnitin-Acylcarnitintranslokase
CAR	konstitutiver Androstan-Rezeptor
CPT1a	Carnitin-Palmitoyltransferase 1a
Cyp7B1	Steroid/Oxysterol-7-alpha-Hydroxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIO2	Typ II 5' Deiodase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Östrogenrezeptor
FA	Formaldehyd
FGF21	<i>fibroblast growth factor 21</i>
FKS	fetales Kälberserum
fT3, fT4	freies T3, freies T4
8(S)-HETE	8(S)-Hydroxyeicosatetraensäure
HMGCS2	Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2
9(S)-HODE	9(S)-Hydroxyoctadecadiensäure
HRP	<i>Horseradish</i> Peroxidase
KO	<i>knockout</i>
LCAD	langkettige Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase
LSD-Test	<i>Least Significant Difference-Test</i>
MCT	Monocarboxylat-Transporter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl
Ncor1	<i>nuclear corepressor 1</i>

NEFA	unveresterte Fettsäuren
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
NPY	Neuropeptid Y
PAX-8	<i>paired-domain/homeo box transcription factor 8</i>
Pit-1	<i>pituitary transcription factor 1</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR α	Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor α
PPRE	<i>PPAR response element</i>
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
PVN	paraventriculärer Nucleus
Rev-erba	<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>
RIA	Radioimmunoassay
RPLP0	<i>ribosomal protein, large, P0</i>
RT	Raumtemperatur
RXR	9-cis Retinoid-X-Rezeptor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors</i>
Sult	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TPO	Thyreoperoxidase
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor
TRH	Thyreoliberin
TRHDE	<i>TRH-degrading enzyme</i>
TSH	Thyreotropin
TSHR	Thyreotropin-Rezeptor
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
v/v	<i>volume/volume</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i>

1. Einleitung

1.1 Der Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptor α (PPAR α)

PPAR α ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der zur Superfamilie der nuklearen Rezeptoren gehört (Issemann und Green, 1990; Michalik *et al.*, 2006). Mit seinem Heterodimerisierungspartner 9-cis Retinoid-X-Rezeptor (RXR) bildet der PPAR α einen Rezeptorkomplex, der durch Interaktion mit spezifischen Liganden aktiviert wird und an sogenannte PPAR *response elements* (PPREs) der DNA spezifischer Zielgene (Abb. 1) bindet. Charakteristisch für diese PPREs ist die direkte Wiederholung der hexameren Sequenz AGGTCA, dem sogenannten DR1-Motiv, welches ausschließlich durch ein Nukleotid getrennt ist (Schoonjans *et al.*, 1996a; Berger und Moller, 2002). Über die Bindung des PPAR α -RXR-Rezeptorkomplexes an die PPREs wird die Transkription des entsprechenden Zielgens reguliert. Dabei kommt es zumeist zu einer erhöhten Expression. Die Inhibierung von Genen erfordert häufig weitere Faktoren oder erfolgt unabhängig von einer DNA-Bindung beispielsweise durch Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Konkurrenz mit anderen Faktoren (Ijpenberg *et al.*, 1997; Desvergne und Wahli, 1999; Kersten *et al.*, 2000; Wahli, 2002; Mandard *et al.*, 2004).

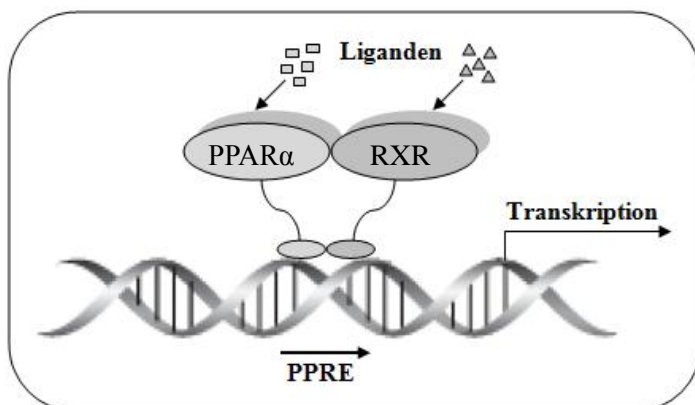


Abb. 1: Transkriptionsregulierung durch Bindung des PPAR α -RXR-Komplex an PPREs von PPAR α -Zielgenen.

(modifiziert nach Barbier *et al.*, 2004)

Es sind sowohl natürliche als auch synthetische Agonisten des PPAR α bekannt. Zu den synthetischen PPAR α -Agonisten gehören beispielsweise die Fibrate, wie Clofibrat und Ciprofibrat. Weiterhin zählt das Fibrat-Analogon WY14.643 zu den synthetischen Agonisten mit sehr hoher PPAR α -Selektivität und -Affinität (Forman *et al.*, 1997; Krey *et al.*, 1997; Watts und Dimmitt, 1999). Natürliche Agonisten mit hoher Affinität zum PPAR α sind unter anderem mit der Nahrung aufgenommene langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Kersten *et al.*, 2000; Jump *et al.*, 2005), Derivate langkettiger Fettsäuren (konjugierte

Linolsäure) (Moya-Camarena *et al.*, 1999) und oxidierte Fette (Chao *et al.*, 2001; Sülzle *et al.*, 2004). Auch die aus Arachidonsäure beziehungsweise Linolsäure endogen synthetisierten oxidierten Fettsäuren, wie zum Beispiel 8(S)-Hydroxyeicosatetraensäure (8(S)-HETE) und 9(S)-Hydroxyoctadecadiensäure (9(S)-HODE) sowie Eicosanoide stellen potente PPAR α -Agonisten dar (Yu *et al.*, 1995; Delerive *et al.*, 2000; Roman, 2002). Chakravarthy *et al.* (2007) zeigten, dass endogene Produkte der Fettsäuresynthese in der Lage sind, PPAR α zu aktivieren. Demzufolge scheinen neben den während des Fastens aus dem Fettgewebe lipolytisch freigesetzten Fettsäuren (Kersten *et al.*, 1999) zusätzlich endogen synthetisierte Fettsäuren für die PPAR α -Aktivierung von Bedeutung zu sein.

Die Expression des PPAR α erfolgt hauptsächlich in Geweben, die sich durch einen starken Fettsäurekatabolismus auszeichnen. Hohe Expressionsraten weisen daher Leber, Herz, Niere, Skelettmuskel, Dünndarm sowie das braune Fettgewebe auf (Desvergne und Wahli, 1999). Aber auch in anderen Geweben und Immunzellen, wie zum Beispiel in verschiedenen Gehirnarealen, Monozyten und Makrophagen konnte PPAR α nachgewiesen werden (Braissant *et al.*, 1996; Neve *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2004). Eine wesentliche Rolle nimmt PPAR α in der Anpassung des Energie- und Lipidstoffwechsels an das Fasten ein. So stimuliert PPAR α unter anderem die β -Oxidation, die Ketogenese und die Gluconeogenese. Zu weiteren Funktionen des PPAR α gehören die Kontrolle des Aminosäurestoffwechsels, der Harnstoffsynthese sowie die Regulation inflammatorischer Prozesse (Mandard *et al.*, 2004). Eine Beteiligung des PPAR α an den fastenbedingten Veränderungen des Schilddrüsenhormonstoffwechsels ist bisher noch nicht bekannt.

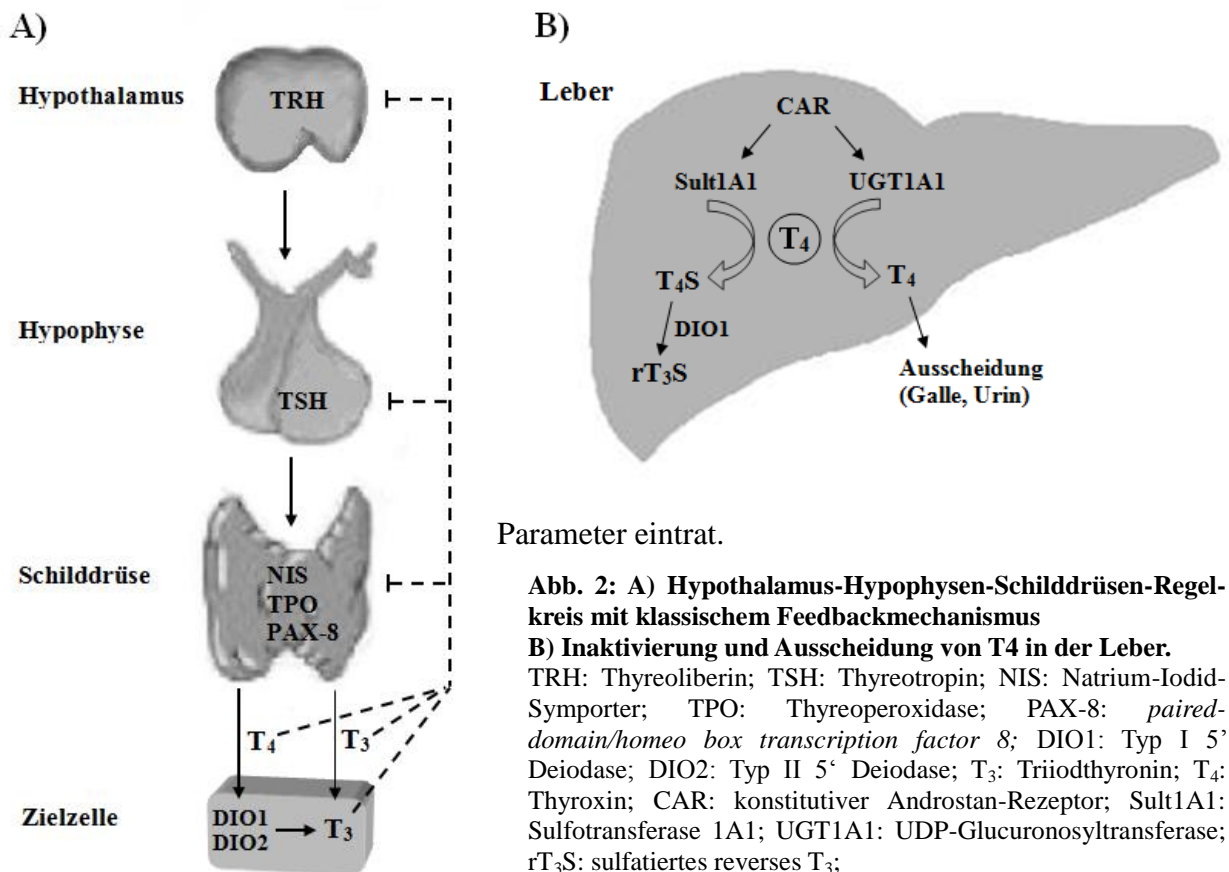
1.2 Schilddrüsenhormonstoffwechsel und Fasten

Schilddrüsenhormone sind für den Energiestoffwechsel von entscheidender Bedeutung, indem sie unter anderem den Grundumsatz regulieren. Der Schilddrüsenhormonstoffwechsel wird durch den Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis kontrolliert, der bei bedarfsdeckender Energiezufuhr einen klassischen Feedbackmechanismus aufweist (Abb. 2 A). Daran sind hauptsächlich das Thyreoliberin (TRH) des Hypothalamus, das Thyreotropin (TSH) der Hypophyse sowie die Schilddrüsenhormone Thyroxin (T₄) und Triiodthyronin (T₃) beteiligt. Das TRH ist ein Tripeptid (Glutamin-Histidin-Prolamin), das aus einer inaktiven Vorstufe via Prohormon-Konvertasen gebildet wird (Schaner *et al.*, 1997; Perello und Nillni, 2007). Zur TRH-Synthese sind Neurone verschiedener Bereiche des zentralen Nervensystems, wie des Hypothalamus, des Hirnstamms und des Hippocampus fähig (Lechan

und Segerson, 1989). Jedoch ausschließlich das im paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus gebildete TRH gelangt über die *Eminentia medialis* zur Hypophyse und stimuliert dort die TSH-Synthese und -Sekretion (Fekete und Lechan, 2007). Das Glykoprotein-Hormon TSH wird in den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse synthetisiert und besteht aus einer für das TSH spezifischen β -Untereinheit sowie einer α -Untereinheit, die auch einen Bestandteil der gonadotropen Hormone follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) darstellt (Gurr *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1999). Nach Sekretion gelangt das TSH zu den follikulären Zellen der Schilddrüse, bindet dort an G-Protein-gekoppelte TSH-Rezeptoren (TSHR) und stimuliert zahlreiche an der Schilddrüsenhormonsynthese beteiligten Prozesse. So reguliert das TSH unter anderem die mRNA-Expression und die Aktivität des Natrium-Iodid-Symporters (NIS), der Thyreoperoxidase (TPO) und des *paired-domain/homeo box transcription factor 8* (PAX-8) (Zarrilli *et al.*, 1990; Zannini *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1997; Fabbro *et al.*, 1998). NIS vermittelt die Iodidaufnahme über die basolaterale Membran in die Thyreozyten (Portulano *et al.*, 2014). An der apikalen Membran wird Iodid durch weitere Transporter in das Lumen abgegeben. Die dort befindliche TPO, deren Transkription der Kontrolle des Transkriptionsfaktors PAX-8 unterliegt (Zannini *et al.*, 1992), katalysiert die oxidative Iodierung von Thyrosinresten im Thyreoglobulin zu Iodtyrosinen sowie die anschließende Kopplung zweier Iodtyrosine zu Thyronin. Das Thyreoglobulin wird über rezeptorvermittelte Endozytose wieder in die Thyreozyten aufgenommen und unter Freisetzung der Schilddrüsenhormone hydrolysiert (Gärtner *et al.*, 2004). Die synthetisierten Schilddrüsenhormone gelangen in hohem Maße in Form des inaktiven Prohormons T4 und nur in geringem Umfang als aktives T3 in den Blutkreislauf und werden an Albumin, Transthyretin und Thyroxin-bindendem Globulin gebunden transportiert (Schussler, 2000). An der Aufnahme der Schilddrüsenhormone in die Zielzellen sind verschiedene Transportsysteme, wie die Monocarboxylat-Transporter 8 und 10 (MCT8, MCT10), beteiligt (Heuer und Visser, 2009). In den Zellen erfolgt die Deiodierung und somit die Aktivierung von T4 zu T3 über die Typ I 5' Deiodase und die Typ II 5' Deiodase (DIO2).

Die Inaktivierung und Ausscheidung der Schilddrüsenhormone erfolgt mittels hepatischer Sulfotransferasen (Sults) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) (Abb. 2). Sults führen zur Sulfatierung der phenolischen Hydroxylgruppe von T3 und T4. Über die darauffolgende Deiodierung am inneren Ring kommt es zur Bildung inaktiver Schilddrüsenhormonmetabolite (Visser, 1994; Visser, 1996). Eine Glucuronidierung durch UGTs erhöht die Wasserlöslichkeit der Schilddrüsenhormone und ermöglicht so deren biliäre und renale Ausscheidung (Visser *et*

al., 1993; Findlay *et al.*, 2000; Vansell und Klaassen, 2002). Die Transkription der hepatischen UGTs und Sults wird unter anderem durch den konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR) reguliert (Maglich *et al.*, 2002) (Abb. 2 B). Qatanani *et al.* (2005) zeigten, dass eine Stimulierung von CAR bei Wildtyp (WT)-Mäusen mit einer gesteigerten mRNA-Expression hepatischer Sults und UGTs und mit verminderten Schilddrüsenhormonspiegeln im Serum einhergeht, während bei CAR-knockout (KO)-Mäusen keine Veränderung der genannten



Parameter eintrat.

Abb. 2: A) Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis mit klassischem Feedbackmechanismus

B) Inaktivierung und Ausscheidung von T₄ in der Leber.

TRH: Thyreoliberin; TSH: Thyreotropin; NIS: Natrium-Iodid-Sympporter; TPO: Thyreperoxidase; PAX-8: *paired-domain/homeo box transcription factor 8*; DIO1: Typ I 5' Deiodase; DIO2: Typ II 5' Deiodase; T₃: Triiodthyronin; T₄: Thyroxin; CAR: konstitutiver Androstan-Rezeptor; Sult1A1: Sulfotransferase 1A1; UGT1A1: UDP-Glucuronosyltransferase; rT₃S: sulfatiertes reverses T₃;

Abb. 2 A) modifiziert nach Moura & Moura, 2004

Abb. 2 B) modifiziert nach Vella *et al.*, 2011.

Die Wirkung der Schilddrüsenhormone entfaltet sich über die Bindung des T₃ an spezifische Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR). Die TR bilden ähnlich wie der PPAR α mit dem Heterodimerisierungspartner RXR einen TR-RXR-Rezeptorkomplex, der an sogenannte *thyroid response elements* in der Promotorregion Schilddrüsenhormon-abhängiger Zielgene bindet (Leid *et al.*, 1992; Kliewer *et al.*, 1992; Wahlstrom *et al.*, 1992). Bislang wurden 5 verschiedene TRs identifiziert. Dazu gehören die β -Rezeptoren TR β 1, TR β 2 sowie die α -Rezeptoren TR α 1, TR α 2-vI und TR α 2-vII (Munoz und Bernal, 1997). TR β 2 wird im Gegensatz zum ubiquitären Vorkommen der anderen TR-Isoformen ausschließlich in den TRH-Neuronen des PVN (Lechan *et al.*, 1994) und in den thyreotropen Zellen der Hypophyse

(Hodin *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1991) exprimiert. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass ein TR β 2-*knockout* mit einer gesteigerten TRH- und TSH-mRNA-Expression einhergeht (Gauthier *et al.*, 1999; Abel *et al.*, 2001). Dies weist auf eine zentrale Rolle des TR β 2 in der negativen Feedbackregulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises hin. Die Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises ist neben den Schilddrüsenhormonen noch von weiteren Faktoren abhängig. Einen wichtigen modulierenden Faktor stellt dabei das Leptin dar. Der Effekt des Leptins auf die TRH-Neurone des PVN wird hauptsächlich über die Regulation der im Nucleus Arcuatus des Hypothalamus gebildeten Neuropeptide vermittelt (Fekete und Lechan, 2007). Zu den Neuropeptiden des Nucleus Arcuatus gehören das Neuropeptid Y (NPY) sowie das aus dem Vorläufer Proopiomelanocortin (POMC) gebildete α -Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH). Das NPY wirkt inhibierend, das α -MSH dagegen stimulierend auf die TRH-Expression (Kim *et al.*, 2000; Fekete *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Fekete *et al.* (2006) konnten anhand von gefasteten Mäusen zeigen, dass intracerebroventrikuläre Leptingaben verminderte NPY-mRNA-Konzentrationen und erhöhte POMC-mRNA-Konzentrationen nach sich ziehen und somit einer fastenbedingten Abnahme der TRH-Expression entgegenwirken. Neben den indirekten wurden auch direkte Effekte des Leptins auf die TRH-Neuronen beschrieben (Harris *et al.*, 2001; Ghamari-Langroudi *et al.*, 2010). In einer primären Zellkultur hypothalamischer Neurone war infolge einer Leptinbehandlung eine dosisabhängige Erhöhung der TRH-Biosynthese und -Sekretion zu beobachten (Nillni *et al.*, 2000). Auch die Sekretion von TSH scheint der Regulation durch Leptin zu unterliegen. *In-vivo* führen Leptingaben, möglicherweise indirekt über die Stimulation von TRH-Neuronen im Hypothalamus, zu einer Steigerung der TSH-Sekretion (Ahima *et al.*, 1996; Legradi *et al.*, 1997). Dagegen wirkt endogen in der Hypophyse gebildetes Leptin als autokriner/parakriner Inhibitor der TSH-Sekretion (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2002).

Während des Fastens kommt es zu zahlreichen Veränderungen des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises, die mit einer Abnahme der im Blut zirkulierenden Schilddrüsenhormone einhergehen. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bislang jedoch nicht vollständig bekannt. Untersuchungen an Nagern konnten belegen, dass unter Fastenbedingungen die Expression und die Aktivität der DIO2 im Hypothalamus unabhängig von den Schilddrüsenhormonen zunimmt. Daraufhin kommt es zu lokal gesteigerten T3-Konzentrationen im Hypothalamus, die zur fastenbedingten Abnahme der TRH-Expression beitragen könnten (Diano *et al.*, 1998). Der Anstieg der hypothalamischen DIO2-Expression und -Aktivität wurde mit der Abnahme der Leptinspiegel und der Zunahme

an Glukokortikoiden im Plasma infolge des Fastens in Verbindung gebracht (Coppola *et al.*, 2005). Auch die mRNA-Expression von TSH β in der Hypophyse ist während des Fastens gehemmt. Die Konzentration des TSHs scheint jedoch unter Fastenbedingungen unabhängig von Leptin und TRH zu sinken, da eine Leptingabe bei gefasteten Mäusen den Abfall der TRH-Expression verhinderte, dagegen aber keine Wirkung auf die Abnahme der TSH β -Expression zeigte (Boelen *et al.*, 2006). Fekete und Lechan (2007) vermuteten, dass das im Hypothalamus gebildete und über den Portalkreislauf zur Hypophyse gelangte T3 zur fasten-induzierten Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration beitragen könnte. Neben der TSH-Synthese ist auch die TSH-Sekretion unter Fastenbedingungen vermindert. Das bombesinähnliche Peptid Neuromedin B wird in den thyreotropen Zellen der Hypophyse gebildet und stellt einen Inhibitor der TSH-Sekretion dar (Oliveira *et al.*, 2006). Eine Studie von Ortiga-Carvalho *et al.* (1997) belegte, dass die Neuromedin B-Expression während des Fastens steigt und somit zur fastenbedingten Abnahme der TSH-Sekretion beiträgt. Fasten führt weiterhin zu einer Abnahme von T3 und T4 im Plasma, was vermutlich auf deren verminderte Freisetzung aus der Schilddrüse und eine verstärkte hepatische Metabolisierung und Ausscheidung zurückzuführen ist (Kinlaw *et al.*, 1985, Vella *et al.*, 2011). Die gesunkenen Schilddrüsenhormonspiegel haben eine Herunterregulation von T3-abhängigen Genen zur Folge. Insgesamt scheinen die fastenbedingten Veränderungen des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises einen Energiesparmechanismus darzustellen (Boelen *et al.*, 2008). Möglicherweise spielt dabei der PPAR α eine entscheidende Rolle. König *et al.* (2009) konnten bereits unter Fastenbedingungen eine PPAR α -Aktivierung in der Hypophyse von WT-Mäusen belegen. Zudem zeigte sich, dass PPAR α -KO-Mäuse deutlich geringere TSH-mRNA-Konzentrationen in der Hypophyse als WT-Mäuse aufwiesen. Daraufhin liegt die Vermutung nahe, dass PPAR α an der Regulation der TSH-Synthese und der TSH-induzierten Prozesse in der Schilddrüse beteiligt ist.

1.3 Zirkadiane Rhythmik von PPAR α

Aus Nagerstudien ist bekannt, dass die Expression von PPAR α tageszeitlichen Schwankungen unterliegt (Lemberger *et al.*, 1996; Stavinoha *et al.*, 2004; Oishi *et al.*, 2008). An der Regulation dieser tageszeitlichen Schwankungen ist der Transkriptionsfaktor *brain and muscle Arnt-like protein-1* (BMAL1) beteiligt, der einen zirkadianen Schrittmacher darstellt. Studien an Mäusen sowie humane *in-vitro*-Untersuchungen zeigten, dass sich PPAR α und BMAL1 wechselseitig auf Transkriptionsebene beeinflussen (Canaple *et al.*, 2006; Shirai *et*

al., 2007; Nakamura *et al.*, 2008). Aufgrund dessen wurde bereits diskutiert, PPAR α -Liganden in der Behandlung zirkadianer Schlafstörungen einzusetzen (Shirai *et al.*, 2007). Nachtaktive Tiere, wie Ratte und Maus, deren Nahrungsaufnahme hauptsächlich nachts erfolgt, weisen am Tag hohe, in der Nacht dagegen geringe PPAR α -Expressionslevel auf (Patel *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2006). Canaple *et al.* (2006) konnten nach Umstellung auf Tagfütterung in der Leber von Mäusen ein entgegengesetztes Tag/Nacht-PPAR α -Expressionsprofil beobachten, was auf einen direkten Einfluss der Nahrungsaufnahme hindeutet. Auch das Geschlecht scheint das Tagesexpressionsprofil von PPAR α zu beeinflussen. So zeigte eine Untersuchung von Yang *et al.* (2009), dass sich die PPAR α -mRNA-Expression weiblicher Mäuse im Tagesverlauf von männlichen Mäusen unterscheidet. Dunn *et al.* (2007) konnten zudem höheren PPAR α -Expressionslevel in T-Zellen männlicher gegenüber weiblicher Mäuse beobachten. Die Autoren vermuteten, dass aufgrund dieser geschlechtsspezifischen Unterschiede Frauen häufiger zu Autoimmunerkrankungen neigen als Männer. Die im Rahmen von Nagerstudien gewonnenen Daten sind jedoch nur bedingt auf den Menschen übertragbar, da Ratten und Mäuse im Vergleich zum Menschen neben vielen weiteren Faktoren ein völlig anderes Nahrungsaufnahmeverhalten zeigen sowie eine deutlich stärkere PPAR α -Expression aufweisen. Zudem reagieren Nager auf eine PPAR α -Aktivierung mit einer gesteigerten Peroxisomenproliferation und werden deshalb auch zu den proliferierenden Spezies gezählt. Nichtproliferierende Spezies wie der Mensch weisen nach Stimulierung mit PPAR α -Liganden dagegen keine oder nur eine sehr geringe Peroxisomenproliferation auf (Peters *et al.*, 2005). Beim Menschen spielt PPAR α als therapeutisches Target in der Behandlung verschiedener Erkrankungen eine Rolle. So werden synthetische PPAR α -Agonisten, wie die Fibrate, aufgrund ihrer hypolipidämischen Wirkung in der Therapie von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt (Berger und Moller, 2002; Fruchart, 2009). Dass PPAR α auch im Menschen tageszeitlichen Schwankungen unterliegen könnte, blieb dabei in der Vergangenheit unberücksichtigt. Zudem wurde bislang nicht untersucht, ob das Geschlecht oder die Nahrungsaufnahme Einfluss auf die Expression von PPAR α nimmt. Die Aufklärung möglicher Einflussfaktoren auf das 24 h-PPAR α -Expressionsprofil könnte jedoch wesentlich dazu beitragen, Therapiekonzepte mit PPAR α -Agonisten zu optimieren.

Zielstellung

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob PPAR α für die fastenbedingten Veränderungen des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises von Bedeutung ist. Um dieser Zielstellung nachzugehen, wurden verschiedene *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien durchgeführt. Für die *in-vitro*-Versuche wurde die murine TSH-produzierende, thyreotrope Adenohypophysen-Tumorzelllinie T α T1 genutzt, die eine typische T3-abhängige TSH β -Expression aufweist (Yusta *et al.*, 1998). Anhand dieses Zellmodells sollte der Effekt einer PPAR α -Aktivierung auf die relative mRNA-Konzentration von TSH β und verschiedene Einflussfaktoren der TSH-Synthese und -Sekretion untersucht werden. Dazu wurden die T α T1-Zellen mit verschiedenen synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten, wie Ciprofibrat, WY 14.643 sowie den natürlichen PPAR α -Agonisten Ölsäure und den beiden Arachidonsäuremetaboliten 8(S)-HETE und 9(S)-HODE inkubiert. In weiteren *in-vitro*-Versuchen mit HepG2-Zellen sollte anhand von TSH β -Promotoraktivitätsanalysen herausgefunden werden, ob die Transkription von TSH möglicherweise einer direkten Regulation durch PPAR α unterliegt.

Im Anschluss an die *in-vitro*-Versuche wurde der Einfluss von PPAR α auf die Regulation der Synthese von TSH und weiterer relevanter Parameter des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenhormonstoffwechsels *in-vivo* untersucht. Dazu wurden 3 *in-vivo*-Versuche mit männlichen WT- und PPAR α -KO-Mäusen durchgeführt. In den ersten beiden Versuchen wurden die Tiere über einen Zeitraum von 48 h gefastet, da sich die Effekte des PPAR α hauptsächlich während des Fastens manifestieren. Zahlreiche Studien mit PPAR α -KO-Mäusen konnten bereits zeigen, dass der Verlust an PPAR α im gefütterten Zustand nur geringe Auswirkungen hat, im Fastenzustand jedoch eine erheblich gestörte Homöostase der Tiere bedingt (Hashimoto *et al.*, 1999; Kersten *et al.*, 1999; Leone *et al.*, 1999). Neben der TSH β -, TSH α - und Neuromedin B-mRNA-Konzentration wurden die relative mRNA-Konzentration des an der Regulation des TSH β beteiligten TRH-*degrading enzyme* (TRHDE), TR β 2 und der DIO2 in der Hypophyse sowie des TRH im Hypothalamus bestimmt. Zudem wurde die relative mRNA-Konzentration verschiedener unter der Kontrolle des TSH stehender und an der Schilddrüsenhormonsynthese beteiligter Schilddrüsen Gene sowie die Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma analysiert. Im Rahmen des 2. *in-vivo*-Versuchs sollte neben den Parametern des 1. *in-vivo*-Versuchs weitere Einflussfaktoren des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises untersucht werden. So wurden die relative mRNA-Konzentration von NPY und POMC im Hypothalamus sowie die

Leptinkonzentration im Plasma ermittelt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung des Einflusses von PPAR α und Fasten auf die relative mRNA-Konzentration der für den Schilddrüsenhormontransport relevanten MCTs sowie verschiedener an der Inaktivierung und Ausscheidung der Schilddrüsenhormone beteiligter Phase II-Enzyme der Leber. Im 3. *in-vivo*-Versuch sollte untersucht werden, ob eine PPAR α -Aktivierung über einen synthetischen PPAR α -Agonisten Einfluss auf die Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises nimmt. Dazu wurde männlichen WT- und PPAR α -KO-Mäusen 1x täglich über 4 Tage oral eine WY 14.643- oder eine Kontrolllösung mittels Schlundsonde verabreicht und anschließend verschiedene Parameter im Hypothalamus, in der Hypophyse und in der Schilddrüse analysiert.

Im zweiten Teil der Arbeit bestand ein Ziel darin herauszufinden, ob die PPAR α -Expression des Menschen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt und inwieweit das Geschlecht und die Nahrungsaufnahme darauf Einfluss nimmt. Am Nagermodell konnte bereits gezeigt werden, dass das Geschlecht die 24 h-mRNA-Expression von PPAR α beeinflusst. Daten aus Humanstudien fehlen dazu bislang völlig. Daraufhin wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen zweier Humanstudien das 24 h-mRNA-Expressionsprofil von PPAR α in den Monozyten männlicher und weiblicher Probanden bestimmt. Da PPAR α vor allem bei fehlender Energiezufuhr aktiv ist, sollte die 24 h-mRNA-Expression von PPAR α sowohl unter Fastenbedingungen als auch unter regulärer Nahrungsaufnahme untersucht werden. Aufgrund dessen erhielten die Probanden im ersten Versuch 4 geregelte Mahlzeiten, während die Probanden im zweiten Versuch über die 24-stündige Versuchsdauer fasteten.

Um herauszufinden, inwieweit sich beim Menschen, ähnlich dem Nager, die PPAR α -Expression am Tag von der in der Nacht unterscheidet, wurden die Tag/Nacht-mRNA-Expression sowie die Tag/Nacht-Proteinexpression von PPAR α in den Monozyten der fastenden und nicht-fastenden Probanden bestimmt. Die gewonnenen Daten geben Auskunft, zu welcher Tageszeit PPAR α am stärksten stimulierbar ist und bieten somit die Möglichkeit die medikamentöse Behandlung von Patienten mit hyperlipidämischen Erkrankungen anzupassen.

Aufgrund der wechselseitigen Interaktion von PPAR α und BMAL1, stellte sich im Rahmen dieser Arbeit zudem die Frage, ob BMAL1 ein ähnliches Expressionsmuster wie der PPAR α aufweist. Zur Beantwortung dieser Fragestellung, wurde das 24 h-mRNA-Expressionsprofil sowie die Tag/Nacht-mRNA-Expression von BMAL1 in den Monozyten der fastenden und nicht-fastenden Probanden ermittelt.

3. Material und Methoden

3.1 *In-vitro*-Untersuchungen

In ersten *in-vitro*-Untersuchungen sollte überprüft werden, inwieweit eine PPAR α -Aktivierung auf die TSH-Synthese Einfluss nimmt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden T α T1-Zellen mit synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten inkubiert. Bei den T α T1-Zellen handelt es sich um eine TSH-produzierende thyreotrope Adenohypophysen-tumorzelllinie transgener Mäuse (Yusta *et al.*, 1998). Diese wurde von der University of California, San Diego (Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob TSH möglicherweise ein direktes Zielgen von PPAR α darstellt. Für die dazu durchgeführten TSH β -Promotoraktivitätsanalysen wurde die humane Leberkarzinomzelllinie HepG2 verwendet. Die HepG2-Zellen wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.

3.1.1 Kultivierung der Zellen

Um sterile Bedingungen zu gewährleisten, wurde unter einer LaminarFlowBox (Herasafe, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) gearbeitet und für die Behandlung der Zellen ausschließlich autoklaviertes Material verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator (Heracell, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Für die Kultivierung der T α T1-Zellen wurde DMEM High Glucose (4,5g/l) mit Pyruvat und L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verwendet. Dem Medium wurde 10 % fetales Kälberserum (FKS; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland) zugesetzt. Im Abstand von 48 h wurde das Kulturmedium gewechselt.

Die Subkultivierung der T α T1-Zellen erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen, die Inkubationsversuche in 24-Well-Platten (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Um das konfluente Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurden vor der Aussaat der T α T1-Zellen die Zellkulturflaschen und die 24-Well-Platten mit Matrigel (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) beschichtet. Dazu wurde das Matrigel im Verhältnis 1:30 mit zusatzfreiem Kulturmedium verdünnt. Nach 1-stündiger Inkubation wurde das überschüssige Matrigel durch Zugabe von zusatzfreiem Kulturmedium von den beschichteten

Flächen entfernt. Die Zellpassage erfolgte bei 80-90 %iger Konfluenz der Zellen. Mit Hilfe von 0,02 % EDTA-haltigem PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) wurden hierbei die Zellen gelöst und anschließend in neuem Kulturmedium vereinzelt. Das Ermitteln der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) und einem Umkehrmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Deutschland). Für die Subkultivierung wurden 5×10^5 Zellen in eine neue Zellkulturflasche bzw. für die Inkubationsversuche 2×10^5 Zellen pro Well überführt.

Die HepG2-Zellen wurden in RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) kultiviert, das 10 % FKS enthielt. Alle 2 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt. Zur Subkultivierung wurden 75 cm²-Zellkulturflaschen und zur transienten Transfektion der Zellen 6-Well-Platten genutzt. Die Zellpassage erfolgte bei einer Konfluenz von 80-90 %. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, in neuem Kulturmedium vereinzelt und 5 min bei 1000 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in PBS-Puffer gewaschen und in neuem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden 5×10^5 Zellen in eine neue Zellkulturflasche bzw. 3×10^5 Zellen/Kavität einer 6-Well-Platte überführt. Im Rahmen der TSH β -Promotoraktivitätsanalysen (3.4.6) wurden die HepG2-Zellen für die transiente Transfektion genutzt.

3.1.2 MTT-Test

Der MTT-Test nach Mosmann (1983) und Vistica *et al.* (1991) dient der Überprüfung der Zellviabilität nach Behandlung mit potenziell zytotoxischen Substanzen. Das Prinzip beruht dabei auf der Umwandlung des wasserlöslichen, gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT; Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in wasserunlösliches, blau-violettes Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen intakter Zellen.

Um einen Einfluss von WY 14.643, Ciprofibrat, 9(S)-HODE, 8(S)-HETE und Ölsäure auf die Zellviabilität auszuschließen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen über verschiedene Zeiträume behandelt. Dazu wurden die T α T1- bzw. HepG2-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und gemäß der unter 3.1.3 bzw. 3.4.6.2 beschriebenen Versuche inkubiert. Danach wurde das Inkubationsmedium abgezogen, 200 μ l frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben und mit 20 μ l MTT-Lösung (5 mg MTT/ml DMEM bzw. PBS) versetzt. Die T α T1-Zellen wurden 5 min bei RT, die HepG2-Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen des MTT-Mediums wurde das von den Zellen gebildete

Formazansalz in 200 µl Isopropanol gelöst. Das gelöste Formazan konnte anschließend im Plattenreader (SpectraFluor Plus, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 595 nm spektralphotometrisch bestimmt und quantifiziert werden. Die Absorptionswerte der Kontrollen wurden 100 % gesetzt und die Absorptionswerte der Inkubationen darauf bezogen. Alle Untersuchungen wurden in vierfacher Bestimmung durchgeführt.

3.1.3 Inkubation der T α T1-Zellen

Die Inkubationsversuche wurden mit T α T1-Zellen der Passage 13-45 in vierfacher Bestimmung (n=4) durchgeführt. Dazu wurden die subkonfluenten Zellen 3 Tage nach Aussaat in 24-Well-Platten über 16 h mit 0,5 % FKS-haltigem Kulturmedium präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den synthetischen PPAR α -Agonisten WY 14.643 und Ciprofibrat (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) sowie mit den natürlichen PPAR α -Agonisten 9(S)-HODE, 8(S)-HETE (Cayman Chemicals Company, Ann Arbor USA) und Ölsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Dazu wurden WY 14.643 und Ciprofibrat in DMSO, 9(S)-HODE, 8(S)-HETE sowie Ölsäure in Ethanol gelöst. Vor der Inkubation der Zellen mit Ölsäure wurde das Lösungsmittel Ethanol abgedampft. Durch Zugabe von equimolaren Mengen Natriumhydroxidlösung wurde die Ölsäure in ihr Natriumsalz überführt. Abschließend wurde das Oleat in 0,5 % FKS-haltigem Kulturmedium gelöst. Die Zellen wurden 6 h mit 20 µM 9(S)-HODE, 2 µM 8(S)-HETE sowie 6 h und 24 h mit 200 µM und 400 µM Ölsäure, 25 µM und 50 µM WY 14.643 bzw. 25 µM und 50 µM Ciprofibrat inkubiert. Als Kontrolle diente 0,5 % FKS-haltiges Medium mit Zusatz entsprechender Mengen an Lösungsmittel (0,1 % DMSO bzw. 0,64 % Ethanol).

3.1.4 Analytik

Die T α T1-Zellen wurden nach Inkubationsende mit EDTA-haltigem PBS-Puffer von den 24-Well-Platten gelöst und in Tubes überführt. Dabei wurden je 2 Kavitäten gleichbehandelter Zellen gepoolt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 800 g und Raumtemperatur (RT) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 250 µl Trizol™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert. Anschließend wurde, wie unter 3.4.5.1 beschrieben, die RNA isoliert und die entsprechende cDNA synthetisiert (siehe 3.4.5.2). Im Folgenden wurden mRNA-Expressionsanalysen gemäß der Beschreibung unter 3.4.5.3 durchgeführt.

Die HepG2-Zellen wurden für die transiente Transfektion (siehe 3.4.6.2) genutzt.

3.2 Tierexperimentelle Studien

Die in dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Studien dienten der Aufklärung der Bedeutung des PPAR α für die Regulation der TSH-Synthese *in-vivo*. Zudem sollte überprüft werden, inwieweit eine PPAR α -Aktivierung infolge eines Nahrungsentzugs oder durch die orale Gabe des synthetischen PPAR α -Agonisten WY 14.643 auf weitere Parameter des Schilddrüsenstoffwechsels Einfluss nimmt. Die Untersuchungen wurden an WT- und PPAR α -KO-Mäusen durchgeführt.

3.2.1. Fastenversuche (*in-vivo*-Versuch 1 und 2)

Für die beiden Fastenversuche wurden jeweils 32 männliche WT-Mäuse des Stammes 129 S1/SvImJ sowie 32 männliche PPAR α -KO-Mäuse des Stammes 129S4/SvJae-PPAR α ^{tm1Gonz/J} vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Das mittlere Alter der Tiere betrug im *in-vivo*-Versuch 1 9 Monate und im *in-vivo*-Versuch 2 7 Monate. Die Tiere wurden unter Einhaltung der Richtlinien für den Umgang mit Labortieren (Weihe, 1987) einzeln in Makrolon-Käfigen gehalten. Der Versuchsterraum wies eine konstante Temperatur von 22 ± 2 °C, eine relative Luftfeuchte von 50-60 % und einen 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus auf. Alle Tiere erhielten vor Versuchsbeginn eine Standarddiät für Nager (Altromin 1324, Lage, Deutschland) und hatten freien Zugang zu Wasser.

Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere gewogen. Das mittlere Körpergewicht betrug im *in-vivo*-Versuch 1 $28,4 \pm 2,9$ g und im *in-vivo*-Versuch 2 $28,8 \pm 2,5$ g. Anschließend wurden sowohl die WT- als auch die PPAR α -KO-Mäuse in eine Kontroll- und Fastengruppe bestehend aus jeweils 16 Tieren eingeteilt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten über den 48-stündigen Versuchszeitraum weiterhin die Standarddiät *ad libitum*. Dagegen wurde den Tieren der Fastengruppe für 48 h das Futter entzogen. Allen Tieren stand Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Zu Versuchsende wurden alle Tiere gewogen und unter Diethylether-Narkose durch Dekapitieren getötet.

3.2.1.1 Probennahme

Nach Versuchsende wurde das Vollblut der Mäuse aus dem *in-vivo*-Versuch 1 und *in-vivo*-Versuch 2 in EDTA-Tubes aufgefangen und durch Zentrifugation (1.100 g, 20 min, 4 °C) das

Plasma gewonnen. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -20 °C. Weiterhin wurde der Hypothalamus, die Hypophyse, die Schilddrüse (*in-vivo*-Versuch 1 und 2) sowie die Leber (*in-vivo*-Versuch 2) der Tiere entnommen. Für die späteren Analysen wurden die Schilddrüsen und Hypophysen von jeweils 2 Tieren einer Gruppe gepoolt. Daraus ergab sich eine Endzahl von 8 Tieren pro Gruppe (n=8). Die Organproben wurden sofort nach der Entnahme in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2 Analytik

Für die nachfolgenden Analysen wurden die Plasmaproben von jeweils 2 Tieren einer Gruppe gepoolt. Im *in-vivo*-Versuch 1 wurde die Konzentration unveresterter Fettsäuren (siehe 3.4.1) sowie die Konzentrationen an T4, freiem T4 (fT4), T3, freiem T3 (fT3) (siehe 3.4.2.1) im Plasma ermittelt. Im *in-vivo*-Versuch 2 erfolgte die Bestimmung der Plasmakonzentration unveresterter Fettsäuren (NEFA) (siehe 3.4.1), des Leptins (siehe 3.4.3) sowie des fT4 (siehe 3.4.2.2). Weiterhin wurde aus allen Organproben der beiden Fastenversuche die RNA isoliert (siehe 3.4.5.1). Zu den Leberproben wurden 1000 µl Trizol™-Reagenz gegeben. Aufgrund ihres geringeren Gewichts wurden die Hypophysen- und Schilddrüsenproben mit 250 µl Trizol™-Reagenz versetzt. Nach erfolgreicher cDNA-Synthese (siehe 3.4.5.2) wurden, wie unter 3.4.5.3 beschrieben, mRNA-Expressionsanalysen mittels *realtime* RT-PCR durchgeführt.

3.2.2 Orale Applikation von WY 14.643 (*in-vivo*-Versuch 3)

Für die orale Applikation von WY 14.643 mittels Schlundsonde wurden 20 männliche, 10 Wochen alte WT-Mäuse (129 S1/SvImJ) sowie 20 männliche, gleichaltrige PPAR α -KO-Mäuse (129S4/SvJae-PPAR α ^{tm1Gonz/J}) vom Jackson Laboratory verwendet. Die Tiere wurden einzeln in Makrolon-Käfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten (siehe 3.2.1). Die Versuchsdurchführung folgte den Richtlinien für den Umgang mit Labortieren und wurde von der Tierschutzkommission des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt (Aktenzeichen: 42502-2-1161 MLU).

Zu Versuchsbeginn wiesen die Tiere ein mittleres Körpergewicht von $23,7 \pm 2,9$ g auf. Sowohl die WT- als auch die PPAR α -KO-Mäuse wurden einer Kontroll- und Behandlungsgruppe, bestehend aus jeweils 10 Tieren, zugeordnet. Die Tiere der Behandlungsgruppe erhielten 1 x täglich um 9 Uhr (2 Stunden nach Beginn der Tag-Phase)

40 mg WY 14.643 pro kg Körpergewicht über eine Versuchsdauer von 4 Tagen. Dazu wurde das WY 14.643 auf eine Konzentration von 8 mg/ml in DMSO und Wasser (50:50, v/v) gelöst. Den Tieren wurde die tägliche Dosis an WY 14.643 in einem Volumen von 120 µl über eine Schlundsonde verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 1 x täglich 120 µl einer Kontrolllösung (DMSO und Wasser) über die Schlundsonde. Am vierten Versuchstag wurden die Tiere 4 Stunden nach der letzten Gabe der Kontroll- bzw. WY 14.643-Lösung gewogen und unter CO₂-Betäubung durch Dekapitieren getötet.

3.2.2.1 Probennahme

Nach dem Dekapitieren wurde das Vollblut in Serumröhrchen aufgefangen und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Serum durch 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 g und RT gewonnen. Für die *in-situ*-Hybridisierung wurde von jeweils 5 Tieren pro Gruppe das komplette Gehirn entnommen und in 2-Methylbutan auf Trockeneis schockgefroren. Von den restlichen Tieren wurde der Hypothalamus aus dem Gehirn präpariert. Zudem wurden Hypophyse, Schilddrüse, Leber, Niere, Herz, Oberschenkelmuskulatur, Dünndarmmucosa und epididymales Fettgewebe der Tiere entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 Analytik

Im *in-vivo*-Versuch 3 wurde die Serumkonzentration des fT4 mittels ELISA-Kit gemäß 3.4.2.2 bestimmt. Dazu wurden von jeweils 2 Tieren der gleichen Gruppe die Serumproben gepoolt, sodass von jeder Gruppe jeweils 5 Proben zur Verfügung standen. Weiterhin wurde die RNA aus den gewonnenen Organen und Geweben isoliert (siehe 3.4.5.1). Dazu wurden die Hypophysen- und Schilddrüsenproben mit 250 µl Trizol™-Reagenz und die restlichen Gewebeproben mit 1000 µl Trizol™-Reagenz versetzt. Nach der cDNA-Synthese (siehe 3.4.5.2) erfolgten mRNA-Expressionsanalysen mittels *realtime* RT-PCR (siehe 3.4.5.3). Die Bestimmung der mRNA-Expression mittels *in-situ*-Hybridisierung (siehe 3.4.5.4) wurde von der Forschungsgruppe von Frau Dr. Heuer, Leibniz-Institut für Altersforschung (Fritz-Lipmann-Institut), in Jena durchgeführt.

3.3 Humanstudien

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Humanstudien sollte herausgefunden werden, ob PPAR α auch beim Menschen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt und inwieweit darauf möglicherweise das Geschlecht und die Nahrungsaufnahme Einfluss nimmt. Die Durchführung der Humanstudien erfolgte in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Kröllwitz in Halle (Saale).

3.3.1 Probandenauswahl

Für die erste Studie wurden 18 männliche und 12 weibliche gesunde Probanden mit einem mittleren Alter von $26,7 \pm 5,0$ Jahren rekrutiert. Der Body-Mass-Index der Probanden lag mit durchschnittlich $23,3 \pm 3,2$ kg/m² im Normbereich. Zu den Einschlusskriterien für die Probandenauswahl gehörten ein Mindestalter von 18 Jahren sowie eine wöchentliche sportliche Aktivität von maximal 4 h. Ausschlusskriterien waren chronisch entzündliche, endokrine, kardiovaskuläre und andere chronische Erkrankungen der Probanden. Weiterhin wurden Personen mit vorheriger starker Gewichtsreduktion, Schwangerschaft, Medikamenteneinnahme sowie Alkohol- und Drogenmissbrauch ausgeschlossen. Für die zweite Studie wurden 6 Männer und 4 Frauen aus dem ersten Probandenkollektiv rekrutiert. Alle Probanden gaben für die Teilnahme an den Studien ihr schriftliches Einverständnis. Die Studien wurden von der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg geprüft und genehmigt (NCT01303848).

3.3.2 Studiendesign

Beiden Studien wurden im Universitätsklinikum Kröllwitz Halle (Saale) durchgeführt. Die Studiendauer umfasste jeweils 24 Stunden und begann um 8.00 Uhr. Während der ersten Studie nahmen die Probanden 4 geregelte Mahlzeiten (9.00 Uhr Frühstück, 13.00 Uhr Mittagessen, 16.00 Uhr Kaffee und Kuchen sowie 19.00 Uhr Abendessen) nach Belieben zu sich. Dagegen haben die Probanden in Studie 2 über die gesamte Studiendauer gefastet. Den Probanden standen in beiden Studien uneingeschränkt ungesüßte Getränke zur Verfügung. Während des Studienzeitraums sollten die Probanden ihre physische Aktivität auf ein Minimum reduzieren. Die Probanden gaben an, zwischen 1.00 und 7.00 Uhr geschlafen zu haben. Dieser Zeitraum wurde als Nacht definiert. Eine Probandin aus Studie 1 konnte die

Studie aus persönlichen Gründen nicht beenden.

3.3.3 Probennahme

Während des 24-stündigen Studienzeitraums wurde allen Probanden im Abstand von 2 h 5 ml Blut über einen Venenkatheter entnommen. Die Blutprobenentnahme begann um 9.00 Uhr und endete 7.00 Uhr am Folgetag. Aus dem Vollblut wurden über Dichtegradientenzentrifugation mittels Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) mononukleäre Zellen gewonnen und im Anschluss daraus Monozyten isoliert. Dazu wurden 5 ml Histopaque mit 5 ml Vollblut überschichtet und 30 min bei 400 g und RT zentrifugiert. Von den dabei entstandenen 4 Schichten (siehe Abb. 3) wurde die opake Grenzschiicht der mononukleären Zellen abgenommen, in ein neues Tube überführt und durch Zugabe von 10 ml PBS (mit 2 mM EDTA) gewaschen. Nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation bei 300 g und RT wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde auf Eis mit 80 µl Monozytenpuffer (PBS pH 7,4, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA) und 20 µl *CD14 MicroBeats* (Miltenyi Biotech Inc., Auburn, CA, USA) resuspendiert und 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die mononukleären Zellen mit 1 ml Monozytenpuffer versetzt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Monozytenpuffer erneut resuspendiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der CD14 positiven Monozyten von den restlichen mononukleären Zellen mittels magnetischer Separationsmethode unter Verwendung von MiniMACS Trennsäulen im MACS Separator nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotech Inc.). In einem letzten Zentrifugationsschritt (10 min, 400 g, 4 °C) wurden die Monozyten pelletiert und der überschüssige Monozytenpuffer entfernt. Nach Zugabe von 250 µl Trizol™-Reagenz wurden die Monozyten bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

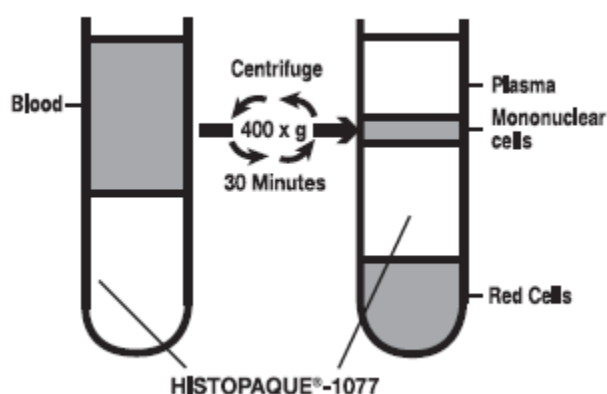


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zentrifugation zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus Vollblut mittels Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich).

3.3.4 Analytik

Aus den gewonnenen Monozyten wurden RNA und Proteine, wie unter 3.4.5.1 bzw. 3.4.4.1 beschrieben, isoliert. Nach reverser Transkription (3.4.5.2) erfolgten Analysen zur mRNA-Expression mittels *realtime* RT-PCR (siehe 3.4.5.3). Des Weiteren wurden Protein-Expressionsanalysen, wie unter 3.4.4.2 beschrieben, durchgeführt.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Konzentrationen von NEFA im Plasma

Die Bestimmung der Konzentration an NEFA im Plasma erfolgte unter Verwendung des NEFA C Kits (Wako Chemicals, Neuss, Deutschland). Das Prinzip basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Dabei erfolgt die Umsetzung der freien Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Synthetase und die anschließende Oxidation des entstehenden Acyl-CoAs mittels Acyl-CoA-Oxidase zu Hydrogenperoxiden. Diese Hydrogenperoxide bilden nach Zugabe von Peroxidase einen violetten Farbstoff, der spektralphotometrisch messbar ist. Die Intensität des violetten Farbstoffes verhält sich hierbei proportional zur NEFA-Konzentration im Plasma.

Die für die Durchführung verwendeten Reagenzien sind in der Tab. 1 aufgelistet. Zu Beginn wurden 10 µl Plasma, Standard oder destilliertes Wasser (für den Reagenzienleerwert) mit 250 µl Farbreagenzlösung A versetzt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl Farbreagenzlösung B und eine erneute 15-minütige Inkubation. Im letzten Schritt wurde die Extinktion der Plasmaproben und des Standards bei 550 nm gegen den Reagenzienleerwert im Spektralphotometer (Ultraspec 3300 pro, Amersham Bioscience Europe, Freiburg, Deutschland) bestimmt.

Tab. 1: Reagenzien des NEFA C Testkits

	Lösungsmittel	Farbreagenz
Farbreagenzlösung A	Phosphatpuffer, pH 6,9 (50 mM)	Acyl-CoA-Synthetase (0,3 kU/l)
	Magnesiumchlorid (3 mM)	Ascorbat-Oxidase (3 kU/l)
	Surfactant	CoenzymA (0,6 g/l)
	Stabilisatoren	Adenosin-Triphosphat (5 mM) 4-Aminophenanzon (1,5 mM) Natriumazid (1,4 %)
Farbreagenzlösung B	MEHA ¹ (1,2 mM)	Acyl-CoA-Oxidase (6,6 kU/l)
	Surfactant	Peroxidase (7,5 kU/l)
NEFA C Standard	Oleinsäure (28,2 mg/dl)	
	Surfactant	
	Stabilisatoren	

¹3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-hydroxyethyl)anilin

Zur Berechnung wurde folgende Formel genutzt:

$$\text{NEFA (mg/dl)} = \frac{E_p * C_{st}}{E_{st}}$$

E_p Extinktion der Probe

C_{st} Konzentration des Standards

E_{st} Extinktion des Standards

3.4.2 Analyse der Konzentrationen von Schilddrüsenhormonen im Plasma/Serum

3.4.2.1 Bestimmung von T4, T3, fT4 und fT3 mittels Radioimmunassay

Für die Bestimmung der freien und gebundenen Schilddrüsenhormone im Plasma mittels Radioimmunassay (RIA) wurden die RIA-Kits T4 Mab, freies T4, T3 und freies T3 (MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland) verwendet. Das Messprinzip beruht auf einer kompetitiven Hemmung der Bindung von Schilddrüsenhormonen der Plasmaproben und radioaktiv-markierten Hormon-Tracer des Kits an vorhandene Antigenbindungsstellen. Die

Konzentration an gebundenen radioaktiv-markierten Hormon-Tracern und die damit verbundene messbare Radioaktivität verhalten sich daher umgekehrt proportional zur Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma.

Zur Durchführung wurde der Standard oder das Plasma in Antikörper-beschichtete Tubes gegeben, mit dem entsprechenden Tracer versetzt und inkubiert. Die jeweilig verwendeten Volumina und Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Anschließend wurden die Tubes entleert, mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Nach Zugabe von 2,5 ml Szintillatormischung (Rotiszint eco plus; Carl Roth GmbH) erfolgte die Messung der Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2100 TR; Packard Instruments, Frankfurt, Deutschland). Die Berechnung der Schilddrüsenhormonkonzentration erfolgte anhand der logarithmierten Eichkurve.

Tab. 2: Reaktionsbedingungen des RIAs

	Plasma/Standard (μl)	Tracer (μl)	Inkubationszeit (min)	Inkubationstemperatur ($^{\circ}\text{C}$)
T4	25	1000	60	20
fT4	50	1000	90	37
T3	100	1000	60	37
fT3	100	1000	150	37

3.4.2.2 Bestimmung von fT4 mittels ELISA

Für die Bestimmung des fT4 im Plasma oder Serum mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde das *mouse free Thyroxine ELISA Kit* (Cusabio, Wuhan, China) genutzt. Das Prinzip beruht auf der Konkurrenz des freien T4 der Probe und des Biotin-konjugierten T4s des Kits um die Bindung an T4-spezifische Antikörper. Dementsprechend wird weniger Biotin-konjugiertes T4 gebunden, je mehr freies T4 in der Probe enthalten ist. Nach Zugabe einer Avidin-konjugierten *Horseradish Peroxidase* (HRP) und einer Substratlösung verhält sich die Substratumwandlung somit umgekehrt proportional zur fT4-Konzentration im Plasma/Serum.

Zur Durchführung wurden 50 μl des Standards oder der Probe in eine T4-spezifische Antikörper-beschichtete 96-Well-Platte gegeben, mit 50 μl Biotin-konjugiertem T4 versetzt, gut gemischt und 60 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit 200 μl 1 x

Waschpuffer wurden die Wells 30 min mit 50 µl Avidin-konjugierter HRP-Lösung bei 37 °C inkubiert und erneut gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 50 µl Substratlösung A sowie 50 µl Substratlösung B sowie eine 4-minütige Inkubation der Wells bei RT. Abschließend wurden die Wells mit 50 µl Stopplösung versetzt und die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration an fT4 erfolgte mit Hilfe der logarithmierten Eichkurve. Zur Abschätzung unspezifischer Bindungen wurde eine Probe T3/T4-depletiertes Plasma bzw. Serum im Assay mitgeführt. Die T3/T4-Depletion des Plasmas bzw. Serums erfolgte nach der Methode von Samuels *et al.* (1979).

3.4.3 Bestimmung der Leptinkonzentration im Plasma

Die Bestimmung der Leptinkonzentration im Plasma erfolgte mittels *Quantikine® Mouse Leptin ELISA* der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland). Dieser ELISA beruht auf dem sogenannten „Sandwichprinzip“. Dabei reagiert ein spezifischer Mikrotiterplatten-gebundener Leptin-Antikörper mit dem im Plasma enthaltenen Leptin. Die Zugabe und Bindung eines weiteren Enzym-konjugierten Leptin-Antikörpers bedingt den Umsatz einer Substratlösung. Die dabei hervorgerufene Farbreaktion gibt Aufschluss über die Leptinkonzentration im Plasma.

Zur Durchführung wurden 50 µl Assaypuffer in die 96-Well-Platte gegeben und mit 50 µl Probe (1:10 verdünnt) oder Standard bei RT für 2 h inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit 400 µl 1 x Waschpuffer wurden die Wells mit 100 µl Konjugat-Lösung (HRP-konjugierter Leptin-Antikörper) versetzt, 2 h bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Durch die anschließende 30-minütige Inkubation der Wells mit 100 µl Substratlösung wurde eine blaue Färbung erreicht. Nach Zugabe von 100 µl Stopplösung erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Gelbfärbung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm spektralphotometrisch bestimmt. Zur Berechnung der Leptinkonzentration im Plasma wurde die logarithmierte Eichkurve herangezogen.

3.4.4 Protein-Expressionsanalysen

3.4.4.1 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung wurde das Trizol™-Reagenz (Invitrogen) verwendet. Bis zum Schritt der Phasentrennung erfolgte die Probenaufbereitung analog zu 3.4.5.1. Um die proteinhaltige Phase von DNA zu befreien, wurden die Proben mit 75 µl 100 % Ethanol versetzt, 2-3 min bei RT inkubiert und 5 min bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und das DNA-Pellet verworfen. Durch Zugabe von 375 µl Isopropanol, 10-minütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4 °C) wurde die Präzipitation der Proteine erreicht. Die entstandenen Proteinpellets wurden 3-mal mit 500 µl 0,3 M Guanidinhydrochlorid-haltigem Ethanol (95 %) und 1-mal mit 500 µl 95 %igem Ethanol gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurden die Proteine 20 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Proteinpellets 2-3 min getrocknet, mit 1 %iger SDS-Lösung versetzt und in 50 µl Lysepuffer (42 % Urea, 15 % Thiourea, 4 % Chaps, 0,6 % DTT) resuspendiert.

Die Proteinkonzentration wurde in Doppelbestimmung nach Bradford (1976) ermittelt. Dazu wurden 50 µl Probe oder Standard (Rinderserumalbumin) mit 200 µl Bradford-Reagenz (Brilliant Blue G in Phosphorsäure und Methanol; Sigma Aldrich) versetzt und 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm im Plattenreader (Spectraflour Plus). Anhand der Standardreihegerade konnte im Folgenden die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

3.4.4.2 SDS-Page und Western Blot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Dazu wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 10 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben je nach Proteingröße im 8-15 % SDS-Gel bei 15-30 mA über 1 h aufgetrennt. Als Markerprotein diente der PAGE Ruler™ (Thermo Scientific).

Für den folgenden Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper wurden die aufgetrennten Proteine über das *Semi-Dry-Blot*-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) für 1 h bei 200 mA auf Nitrozellulose-Membranen (Whatman®, Dassel, Deutschland) transferiert. Zur

Überprüfung des vollständigen Proteintransfers wurde die Membranen mit PonceauS (Carl Roth GmbH) angefärbt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Membranen mit 3 % Milchpulver (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) oder BSA (Sigma Aldrich) in TBST über 30 min geblockt und anschließend 3 h bei RT mit den spezifischen primären Antikörpern anti-PPAR α (Cayman, Michigan, USA) und anti-Histone 3 (Cell Signaling, Danvers, USA) in Blockierlösung inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in 1 x TBST-Puffer erfolgte eine 1-stündige Inkubation der Membranen mit den HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern anti-*mouse* (7076S) und anti-*rabbit* (7074S) der Firma Cell Signaling. Im Anschluss daran wurden die Membranen erneut in 1 x TBST-Puffer gewaschen. Alle verwendeten Pufferlösungen sind der Tab. 3 zu entnehmen.

Zur Detektion der Zielproteine wurden die Membranen mit dem Amersham ECLTM Prime Western Blot Detektionsreagenz (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, England) behandelt und mit einer Chemilumineszenz-Imager-Kamera (F-ChemiBIS, BIOSTEP, Jahnsdorf, Deutschland) belichtet. Die relativen Proteinexpressionen wurden mit Hilfe des Programms Gel Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics) ermittelt und mit dem Referenzgen Histone H3 normalisiert.

Tab. 3: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die SDS-PAGE und den Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,8 M Tris
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,25 M Tris
Probenpuffer	40 µl Glycerin 23 mg SDS 125 µl Sammelgelpuffer 5 µl β-Mercaptoethanol 50 µl Bromphenolblau auf 1 ml Wasser auffüllen
Laufpuffer für SDS-PAGE (pH 8,3)	25 mM Tris 200 mM Glycin 3 mM SDS
Transferpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % Methanol
TBST-Puffer (pH 7,5)	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,2 % Tween 20

3.4.5 Genexpressionsanalysen mittels *realtime* RT-PCR und *in-situ*-Hybridisierung

3.4.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des Trizol™-Reagenz der Firma Invitrogen. Dazu wurden die Zell- bzw. Gewebeproben mit entsprechenden Mengen an Trizol™-Reagenz versetzt. Um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten, wurden die Gewebeproben anschließend im Tissue Lyser (QIAGEN, Hilden, Deutschland) 2-3 min bei

15 Hz homogenisiert. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform/1000 µl Trizol™-Reagenz und 15-minütiger Zentrifugation der Proben (14.500 g, 4 °C) wurde eine Phasentrennung erreicht. Die obere, wässrige Phase, die RNA enthielt, wurde in ein neues Tube überführt und zur RNA-Präzipitation mit 500 µl Isopropanol/1000µl Trizol™-Reagenz versetzt. Danach wurden die Proben für 10 min inkubiert und erneut zentrifugiert (14.500 g, 4 °C, 10 min). Die dabei entstandenen Zellpellets wurden mit 1000 µl 75 %igem Ethanol/1000 µl Trizol™-Reagenz gewaschen und einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation bei 14.500 g und 4 °C unterzogen. Nach Entfernen des Überstandes wurden die RNA-Pellets 10-20 min getrocknet und anschließend durch Zugabe von 20 µl - 100 µl DEPC-Wasser je nach Größe des Pellets 10 min, bei 900 U/min und 60 °C im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte über Extinktionsmessungen bei 260 nm und 280 nm unter Verwendung eines UV-Spektralphotometers der Firma Pharmacia Biotech. Die RNA-Proben wurden dazu im Verhältnis 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die Gesamt-RNA-Konzentration berechnete sich nach folgender Formel:

$$C_{\text{RNA}} = (A_{260} - A_{\text{LW}}) * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

C_{RNA} RNA-Konzentration in µg/ml A_{260} Absorption der Probe bei 260 nm
40.... Multiplikationsfaktor für RNA A_{LW} Absorption des Leerwertes bei 260 nm

Die Integrität der gewonnenen RNA wurde im Folgenden über eine denaturierende Formaldehyd (FA)-Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Hierfür wurde 0,6 g Agarose in 45 ml DEPC-Wasser sowie 5 ml 10 x FA-Gellaufpuffer gelöst und circa 3 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde 10 µl Ethidiumbromid (Sigma Aldrich, Taufkirchen) und 1 ml Formaldehyd zugegeben. Das Gel wurde sofort in eine Gelkammer gegossen und zum Aushärten etwa 30 min bei RT stehen gelassen. Im Rahmen der Probenvorbereitung wurde 4 µg der RNA auf ein Volumen von 10 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und mit 2 µl 5 x RNA-Ladepuffer versetzt. Nach 3-minütigem Erhitzen bei 65 °C wurde die RNA auf das Gel aufgetragen, 1 h aufgetrennt und anschließend in einer Fotokammer (Syngene, GeneGenius, Synoptics Inc., USA) unter UV-Licht visualisiert. Die für die FA-Agarose-Gel-Elektrophorese verwendeten Reagenzien sind in der Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Reagenzien für die FA-Agarose-Gel-Elektrophorese

Reagenzien	Zusammensetzung
10 x FA Gelpuffer (pH 7,0)	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
1 x FA Gellaufpuffer	100 ml 10 x FA Gelpuffer 20 ml 37 % Formaldehyd (FA) 880 ml RNase freies Wasser
5 x RNA Ladepuffer	20 mg Bromphenolblau 80 µl 500 mM EDTA (pH 8,0) 720 µl 37 % Formaldehyd 2,0 ml Glycerol 3,1 ml Formamid 4,0 ml 10 x FA Gelpuffer

3.4.5.2 cDNA-Synthese

Der Prozess der cDNA-Synthese dient dem reversen Umschreiben von einsträngiger mRNA in doppelsträngige, komplementäre DNA. Dazu wurden 1,2 µg der zuvor isolierten Gesamt-RNA in 5 µl DEPC-Wasser vorgelegt und mit 20 µl Mastermix versetzt. Die verwendeten Mastermixkomponenten sind in Tab. 5 dargelegt. Die Synthese der cDNA erfolgte im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) bei 42 °C für die Dauer einer Stunde. Anschließend wurde, durch 10-minütiges Erhitzen der Proben auf 72 °C, die für das Umschreiben verantwortliche Reverse Transkriptase inaktiviert und somit die Reaktion gestoppt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Tab. 5: Mastermixkomponenten für cDNA-Synthese je Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen (μl)
DEPC-Wasser	12,45
5 x RevertAid™ M-MuLV Puffer (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland)	5,00
dNTP-Mix (10 mM each dNTP; GeneCraft, Lüdinghausen, Deutschland)	1,00
Oligo-dT-Primer (Operon, Köln, Deutschland)	1,25
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas)	0,30

3.4.5.3 *Realtime* RT-PCR

Die Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) ist eine Methode zur Ermittlung der mRNA-Expression relevanter Gene. Bei der *realtime* RT-PCR kann die Amplifizierung einer doppelsträngigen DNA durch unspezifische Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffs in Echtzeit verfolgt werden. Zudem wird die Quantifizierung der DNA durch das Fluoreszenzsignal am Ende der Elongationsphase ermöglicht. Weiterhin gibt die an die finale Elongation anschließende Schmelzkurve Auskunft über die Bildung der spezifischen Produkte.

Zur Durchführung wurden 2 μl cDNA mit 18 μl Mastermix versetzt und gemischt. Der Mastermix enthielt 0,5 mM dNTP (GeneCraft), 26,7 pmol spezifische Primer (Operon), 1 x SYBER®Green (Sigma Aldrich, Taufkirchen), 3,5 mM MgCl_2 , 1 x Colorless GoTaq® Flexi Puffer, 1,25 U GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) sowie DEPC-Wasser. In Tab. 7 sind die verwendeten Primer aufgelistet. Der Ablauf der Reaktion erfolgte im Rotor-Gene 2000 Cycler (Corbett Research, Mortlake, Australien). Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Tab. 6 aufgelistet.

Im Anschluss wurden anhand der Amplifikationskurven mit Hilfe der Analysesoftware Rotor-Gene 4.6 (Corbett Research) der *cycle threshold* (c_t -Wert) und die Amplifikationseffizienz der Proben ermittelt. Die Berechnung der relativen mRNA-Konzentrationen erfolgte nach der Methode von Pfaffl (2001). Für die Normalisierung der mRNA-Expressionsdaten wurden verschiedene Referenzgene genutzt.

Tab. 6: Bedingungen der *realtime* RT-PCR

Schritte	Temperatur (°C)	Dauer (sec)	
Initiale Denaturierung	95	120	
Denaturierung	95	20	} n Zyklen
Annealing	55-65 ¹	30	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	300	
Schmelzkurve	50-95	780	

¹Temperatur ist abhängig vom jeweiligen Primerpaar (siehe Tab. 7)

Zur Überprüfung der Qualität und Größe der PCR-Produkte wurde eine DNA-Agarose-Gel-Elektrophorese angeschlossen. Dazu wurden 0,8 g Agarose in 80 ml 1 x TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,02 M Eisessig, 1 mM Na₂EDTA*2H₂O, pH 8,0) gelöst und für 3 min erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 65 °C wurden 20 µl Ethidiumbromid (Sigma Aldrich, Taufkirchen) zugegeben und das Gel sofort gegossen. Das Gel wurde zum Aushärten bei RT stehen gelassen und anschließend im 1 x TAE-Laufpuffer 20 min equilibriert. Die PCR-Proben wurden mit 1 x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega) versetzt, neben 3 µl eines 100 bp DNA-Marker (GeneCraft) auf das Gel aufgetragen und 1 h bei 100 V aufgetrennt. Abschließend erfolgte die Visualisierung der DNA-Banden in einer Fotokammer (Syngene) unter UV-Licht.

Tab. 7: Primersequenzen der *realtime* RT-PCR

Gen	Forward Primer (5` zu 3`)	Reverse Primer (5` zu 3`)	Annealing Temperatur (°C)	Produktgröße (bp)
mouse:				
β-Aktin	ACGGCCAGGTCATCACTATTG	CACAGGATTCCATACCCAAGAAG	66	87
CACT	TGGACACTGTTGCTGAGAGG	TTGGCCAAAGGTATCGAGTC	60	225
CAR	CAGGCTCCAGTACGAGTTTTTG	AGGCTCCTGGAGTATGCAGTC	60	76
CPT1a	CCAGGCTACAGTGGGACATT	GAACTTGCCCATGTCCTTGT	60	209
Cyclophilin A	GTGGTCTTTGGGAAGGTGAA	TTACAGGACATTGCGAGCAG	60	210
DIO2	TCACAAGGTCTTGGGGTAGG	ATGCAGAAAGGCAGACTCGT	60	210
FGF21	CTCTATGGATCGCCTCAC	GTACACATTGTAACCGTCC	55	78
HMGCS2	GGTGTCCCGTCTAATGGAGA	ACACCCAGGATTCACAGAGG	62	178
LCAD	TCCGCCCGATGTTCTCATTG	TTTCTCTGCGATGTTGATGC	62	249
MCT8	TGCCCTTGGTTACTTCGTCC	GGGACACCCGCAAAGTAGAA	59	465
MCT10	TGTTCCGGCTGCCGGAACA	TGACCAGTGACGGCTGGTAG	60	156
Ncor1	CTGACAGGCTCAAGAAAGG	GGCAGCGAGTGAATAAAGG	60	166
Neuromedin B	CATCCAGGGAAGCTGACAAT	TGACCCAACCAGAAATCACA	60	214
NIS	CGCCCTGAAGTCCCTGTGTCC	CAATCCTTGGGGCTCTGTGTTCTG	60	384
NPY	TGGCCAGATACTACTCCGCT	TGAAATCAGTGTCTCAGGGCT	59	92
PAX-8	CCCCATGCTGCCTCCGTGTATG	GTGGTGCGCTTGGCCTTGATGTAG	62	236
POMC	GGGTCCCTCCAATCTTGTTT	GCACCAGCTCCACACATCTA	60	137
PPARα	AGGCAGATGACCTGGAAAGTC	ATGCGTGAACTCCGTAGTGG	60	312
Rev-erbα	CTTCCGTGACCTTTCTCAGC	CAGCTCCTCCTCGGTAAGTG	60	235
RPLP0	GAAACTGCTGCCTCACATCCG	CTGGCACAGTGACCTCACACG	60	146
RXRα	CTCACTGGGACATTGTGGTG	CTCCCCAACACAGGACAGAT	57	150

SMRT	GCATCCTGCCTGTCTAAAGC	GAGTGCGACTGACACACGAT	60	169
Sult1A1	CCCGTCTATGCCCGGATAC	GGGCTGGTGTCTCTTTCAGAGT	60	85
TPO	GCTCTCTTTGGCAACCTGTC	GCCAGCATCTAGGTGGAGAG	60	174
TR β 2	GCTCTTCCC GCCTCTGTTCTTAG	GCTGTTTGGCTTGCTTGAGTCTG	56	367
TRH	GTGCCAACCAAGACAAGGAT	CAGGATGCTGACGTTTCTCA	60	276
TRHDE	TCTACCCACAAACGCAGGTC	CCAAGGAATCTTCTCTCCCCG	57	160
TSH α	GGCCACAGTAATGGGAAATG	GTAGGGAGGAGGTGGTGACA	58	161
TSH β	TCAACACCAACCATCTGTGCT	TCTGACAGCCTGGTGTATTGC	58	239
TSHR	GGGTCCCATCTACCAGGAAT	CACACCATGTCCTCGTTGTC	60	237
UGT1A1	TGAACTTCCTACAGCGACTGAAGA	GGGAATAAACCACTCTGCACATAA	60	75
human:				
BMAL1	GTAACCTCAGCTGCCTCGTC	TAGCTGTTGCCCTCTGGTCT	60	153
hPPAR α	AGGCAGATGACCTGGAAAGTC	ATGCGTGAACCTCCGTAGTGG	60	312
hRPLP0	TCGACAATGGCAGCATCTAC	GCCTTGACCTTTTCAGCAAG	60	223

CACT: Carnitin-Acylcarnitintranslokase; **CAR:** konstitutiver Androstan-Rezeptor; **CPT1a:** Carnitin-Palmitoyltransferase 1a; **DIO2:** Typ II 5' Deiodase; **FGF21:** *fibroblast growth factor 21*; **HMGCS2:** Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2; **LCAD:** langkettige Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase; **MCT8 und 10:** Monocarboxylat-Transporter 8 und 10; **Ncor 1:** *nuclear corepressor 1*; **NIS:** Natrium-Iodid-Symporter; **NPY:** Neuropeptid Y; **PAX-8:** *paired-domain/homeo box transcription factor 8*; **POMC:** Proopiomelanocortin; **PPAR α :** Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor α ; **Rev-erba:** *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1*; **RPLP0:** *ribosomal protein, large, P0*; **RXR α :** 9-cis Retinoid-X-Rezeptor α ; **SMRT:** *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors*; **Sult1A1:** Sulfotransferase 1A1; **TPO:** Thyreoperoxidase; **TR β 2:** Schilddrüsenhormonrezeptor β 2; **TRH:** Thyreoliberin; **TRHDE:** *TRH-degrading enzyme*; **TSH α und β :** Thyreotropin α und β ; **TSHR:** TSH-Rezeptor; **UGT1A1:** UDP-Glucuronosyltransferase 1A1; **BMAL1:** *brain and muscle Arnt-like protein-1*; **hRPLP0:** humanes RPLP0

3.4.5.4 *In-situ*-Hybridisierung

Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden die präparierten Gehirne sofort in eisgekühltem 2-Methylbutan eingefroren und bis zum Anfertigen der Gefrierschnitte bei -80 °C gelagert. Zu Beginn wurden 20 µm dicke Gefrierschnitte (CM3050S Mikrotom, Leica, Wetzlar, Deutschland) vom PVN des Hypothalamus angefertigt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Für die Fixierung wurden die Schnitte an der Luft getrocknet und 1 h bei RT mit 4 %iger Phosphat-gepufferter Paraformaldehydlösung (pH 7,4) behandelt. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen, in 0,4 %igem Phosphat-gepuffertem Triton X-100 für 10 min permeabilisiert und erneut in PBS gewaschen. Die Acetylierung der Schnitte erfolgte über eine 10-minütige Inkubation in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) supplementiert mit 0,25 % Essigsäureanhydrid (v/v). Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS und Wasser gewaschen, in 70 % Ethanol entwässert und luftgetrocknet.

Die für die Hybridisierung benötigte ³⁵S-markierte RNA-Sonde wurde über *in-vitro*-Transkription gewonnen. Als Template wurden Plasmide mit der entsprechenden cDNA des Zielgens genutzt. Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonden wurde ein Reaktionsansatz mit 1 µg linearisiertem cDNA-Template, 1 x RNA Polymerase Reaktionspuffer mit DTT (NEB, Beverly, USA), 5,55 MBq ³⁵S-UTP (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland), 1 mM rNTPs (ohne UTP), 20 U RNase Inhibitor (Promega) und 20-50 U RNA-Polymerase (Sp6, T3 oder T7; NEB) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1,5 h bei 40 °C (Sp6) bzw. bei 37 °C (T3, T7). Nach einer 15-minütigen Inkubation mit 10 U RNase-freier DNase (Roche, Mannheim, Deutschland) bei 37 °C wurden die RNA-Sonden mit Hilfe einer Säulen-Chromatographie (GE Healthcare Life Science) aufgereinigt. Anschließend wurden die RNA-Sonden im Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 0,6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 x Denhardt's Lösung, 100 µg/ml im Ultraschallbad gelöster Lachssperma-DNA, 1 mM EDTA und 0,5 mg/ml t-RNA) gelöst und auf eine finale Konzentration von 5×10^4 cpm/µl eingestellt.

Die Hybridisierung der Gehirnschnitte mit der ³⁵S- markierten TRH-RNA-Sonde erfolgte bei 58 °C über Nacht. Danach wurden die Schnitte mit 2 x Standard-Saline-Citrat-Puffer (SSC) bestehend aus 0,3 M NaCl und 0,03 M Natriumcitrat (pH 7,0) gespült und im Folgenden mit 10 µg/ml RNase A (Sigma Aldrich, Steinheim) sowie mit 0,5 U/ml RNase T1 (Roche) für 30 min bei 37 °C behandelt. Nach 20-minütigem Waschen der Schnitte in 1 x SSC, 0,5 x SSC und 0,2 x SSC, erfolgte eine 1-stündige Inkubation in 0,2 x SSC bei 65 °C.

Für die Detektion der radioaktiv-markierten Sonden mittels Röntgenfilm wurden die Schnitte

nochmals in 0,2 x SSC gewaschen, getrocknet und für 24 h mit einem Biomax MR Film (Kodak) exponiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte in NTB2 autoradiographischen Emulsion (Kodak) getaucht und bei 4 °C für 3 Tage inkubiert. Danach wurden die Schnitte entsprechend der Signalstärke der Autoradiogramme 5 min in der Fotoemulsion D-19 (Kodak) entwickelt und in Rapid Fix (Kodak) 10 min fixiert. Nach Bedarf wurden die Schnitte 5 min mit 1 % (w/v) Cresylviolett-Acetat-Lösung (Sigma) gegengefärbt und unter dem Mikroskop (Olympus BH-2) mit Hilfe einer Kamera (Polaroid DMC2) fotografiert. Die Auswertung der Signalintensitäten der Dunkelfeldaufnahmen erfolgte mit Hilfe des ImageJ-Bildbearbeitungsprogramms.

3.4.6 TSH β -Promotoraktivitätsanalyse

Der TSH β -Promotor der Maus (NCBI GeneBank NC000069.5) wurde mit Hilfe der NUBIScan Software (Podvinec *et al.*, 2002) analysiert. Dabei wurden 3 putative PPREs in der Sequenz -944 bis +480 relativ zum Transkriptionsstart identifiziert.

3.4.6.1 Gewinnung des TSH β -Promotor-Reportergenkonstrukts

Um das gewünschte Promotor-Reportergenkonstrukt zu generieren, wurde unter Verwendung des QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH) genomische DNA aus T α T1-Zellen gewonnen. Dazu wurden 5 x 10⁶ Zellen wie unter 3.1.1 beschrieben von der Zellkulturflasche gelöst, pelletiert und in 200 μ l PBS aufgenommen. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der genomischen DNA wurde mit Hilfe des Nano Drop Fluorospektrometer der Firma peqLab (Erlangen, Deutschland) bestimmt.

Danach wurde das gewünschte TSH β -Promotorkonstrukt mit den putativen PPREs mittels PCR amplifiziert. Der PCR-Ansatz enthielt 450 ng genomische DNA, 0,5 mM dNTPs (NEB), 0,4 μ M *forward* und *reverse* Primer (Operon), 1 x ThermoPol Reaktionspuffer, 1,25 U Taq DNA Polymerase (NEB) und Wasser. Folgende spezifische Primer, mit eingefügten Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme, wurden verwendet: *mouse*TSH β _KpnI_for 5'-ATGGTACCAAACATTGGTATAAAGACT-3', *mouse*TSH β _NheI_rev 5'- ATGCTAGCCGTGCACATACTCAA-3' (Operon). Die Reaktion fand in einem Thermocycler (Biometra®, Berlin, Deutschland) statt. Die entsprechenden PCR-Bedingungen sind in der Tab. 8 dargelegt.

Tab. 8: PCR-Bedingungen der TSH β -Promotoranalyse

Zyklen	Schritte	Temperatur (°C)	Dauer (sek.)
1	Initiale Denaturierung	95	60
35	Denaturierung	95	30
	Annealing-Temperatur	56	30
	Elongation	72	180
1	Finale Elongation	72	420
kühlen auf 4 °C			

Bei der anschließenden Restriktion wurde das TSH β -Promotorkonstrukt (Insert) und der pGL3 Basisvektor (enthält Firefly Luciferase-Reportergen; Promega) unter Einsatz der Restriktionsnukleasen Kpn1 und Nhe1 (NEB) geschnitten. Dazu wurde die Insert-beziehungsweise die Plasmid-DNA (Vektor) mit 2 U der beiden Enzyme unter Verwendung von BSA und einem geeigneten Puffer für 3 h bei 37 °C verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJet™ Gelextraktionskits (Fermentas) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Die darauffolgende Ligation diente dem Verknüpfen des geschnittenen Inserts und Plasmids. Hierbei wurde 100 ng Plasmid- und 500 ng Insert-DNA mit Ligationspuffer sowie 1 U T4 Ligase (NEB) versetzt, 1,5 h bei RT inkubiert und anschließend in kompetente E.coli DH5 α (Invitrogen) transformiert.

Für die Transformation wurden 3 μ l des Ligationsansatzes zu 50 μ l auf Eis angetauter DH5 α gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien einem 1-minütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, erneut für 2 min auf Eis inkubiert und in 300 μ l LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) aufgenommen. Danach erfolgte eine 45-minütige Inkubation im Thermoschüttler (Eppendorf) bei 37 °C. Abschließend wurden die Bakterien zur Selektion auf eine LB-Platte (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar) mit 100 μ g/ml des Antibiotikums Carbenicillin (Invitrogen) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Von den auf der Platte gewachsenen positiven Bakterienkolonien wurden Übernachtskulturen in 2 ml LB-Medium mit 2 μ l Carbenicillin angesetzt. Um zu überprüfen, welche der positiven Bakterienkolonien ein Plasmid mit der insertierten DNA enthielt, wurden am Folgetag jeweils 10 μ l Wasser mit den Übernachtskulturen angeimpft. Diese Lösungen dienen in der folgenden

Kolonie-PCR als Template. Die restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes sowie die PCR-Bedingungen entsprachen denen der PCR zur Amplifizierung des Inserts. Anschließend wurden alle Proben im Agarosegel analysiert. Nach erfolgreicher Kolonie-PCR wurden aus den verbliebenen Übernachtskulturen die Plasmide mittels Plasmid Miniprep Kit I (peqLab) nach Angaben des Herstellers präpariert und durch die Firma Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert.

3.4.6.2 Transiente Transfektion und Dualer Luciferase-Assay

Für die TSH β -Promotoraktivitätsstudien wurden HepG2-Zellen unter Verwendung von LipofectaminTM2000 (Invitrogen) mit dem generierten TSH β -Promotor-Reportergenkonstrukt, einem negativem pGL3-Kontrollplasmid oder einem positiven 3 x ACO-PPRE Kontrollplasmid (zur Verfügung gestellt von Dr. Kersten Sander (Nutrigenomics Consortium, Top Institute Food and Nutrition, Wageningen, The Netherlands)) transient transfiziert. Zur Normalisierung möglicher Unterschiede in den Transfektionseffizienzen wurden die Zellen mit pGL4 Renilla-Luciferase-Plasmid (Promega) als interne Kontrolle cotransfiziert. Weiterhin erfolgten Co-Transfektionen mit dem PPAR α -Expressionsplasmid pCMX-mPPAR α und dem RXR α -Expressionsplasmid pCMX-mRXR α (beide zur Verfügung gestellt von R.M. Evans, Salk Institute for Biological Studies, San Diego, CA, USA). Zur Vorbereitung wurden die HepG2-Zellen, wie unter 3.1.1 beschrieben, in 6-Well-Platten ausgesät. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von 70 % wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Opti-MEM[®] (Invitrogen) versetzt. Für die Transfektion wurden 4 μ g Plasmid-DNA und 2 μ l LipofectaminTM2000 mit 200 μ l Opti-MEM[®] gemischt, 20 min bei RT inkubiert und für 24 h auf die Zellen gegeben.

Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen 5 h mit 0,5 % FKS-haltigem Kulturmedium präinkubiert, gefolgt von einer 24-stündigen Inkubation mit 100 μ M WY 14.643 oder mit der Kontrolllösung (0,1 % DMSO). Nach Inkubationsende wurden die Zellen mit PBS gespült und durch Zugabe des Reporterlysepuffers der Firma Promega lysiert. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten erfolgte im 1450 MicroBeta Liquid Scintillation and Luminescence Counter (PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) nach Angaben des Herstellers.

Zur Auswertung wurde die gemessene Firefly-Luciferaseaktivität auf die entsprechende Renilla-Luciferaseaktivität bezogen und daraus der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung der Proben berechnet.

3.5 Statistik

Die statistische Datenauswertung der *in-vitro*- und tierexperimentellen Versuche erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Minitab, Version 13 (Minitab Inc., PA, USA). Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($P < 0,05$) zu Grunde gelegt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hochbuchstaben und Sternen gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente wurden über die einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) ausgewertet. Dazu wurden die Mittelwerte über den Fisher-*Least Significant Difference* (LSD)-Test verglichen.

Die Ergebnisse der Tierexperimente wurden über die zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) ausgewertet. Die Einflussfaktoren waren dabei der Genotyp (WT versus PPAR α -KO), die Behandlung (Kontrolle versus Fasten beziehungsweise Kontrolle versus WY 14.643) und die Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung. Mittels Levene's Test wurden die Daten auf Homogenität der Varianzen überprüft. Um eine Varianzhomogenität zu erhalten, erfolgte bei ungleichen Varianzen die logarithmische Transformation der Daten. Bei signifikanten Effekten der Einflussfaktoren ($P < 0,05$) wurden die Mittelwerte der 4 Gruppen über den LSD-Test verglichen.

Die bioinformatische und statistische Auswertung der Humanstudien übernahmen Prof. I. Große vom Institut für Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Diplom-Bioinformatiker M. Bönn vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ. Die Ergebnisse der Heatmap wurden über einen Permutationstest ausgewertet. Dieser Test wurde aufgrund der unterschiedlichen Gruppengrößen gewählt. Im ersten Schritt wurde von jeder Gruppe (nicht-fastende und fastende Männer sowie nicht-fastende und fastende Frauen) die kleinste gemeinsame Anzahl an Probanden zufällig ausgewählt. Dieses Minimum entsprach der Probandenanzahl der Gruppe der fastenden Frauen. Im zweiten Schritt wurden die Korrelationskoeffizienten der ausgewählten Probanden 1000-fach permutiert, um den euklidischen Abstand zwischen den gemittelten Korrelationskoeffizienten einer Gruppe mit denen der 3 anderen Gruppen nach jeder Wiederholung zu ermitteln. Die Verteilung der daraus resultierenden euklidischen Abstände wurde an eine Gamma-Dichte angepasst. Die sich ergebenden P-Werte dienen der Beurteilung der Signifikanzen der beobachteten Abstände, die vor der Permutation bestimmt wurden. Schritt 1 und 2 wurden 100-mal wiederholt. Der finale P-Wert wurde über die Berechnung des Medians der erhaltenen 100 P-Werte ermittelt. Auch die Ergebnisse der Tag/Nacht-mRNA-Expressionsprofile der Probanden der einzelnen Gruppen wurden über diese Methode ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der *in-vitro*-Untersuchungen

4.1.1 Relative mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen nach Inkubation der T α T1-Zellen mit synthetischen PPAR α -Agonisten

Um zu überprüfen, ob synthetische PPAR α -Agonisten eine PPAR α -Aktivierung in den T α T1-Zellen bewirken, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen der PPAR α -Zielgene Carnitin-Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) und Carnitin-Acylcarnitintranslokase (CACT) nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643 sowie mit 25 μ M und 50 μ M Ciprofibrat bestimmt. In Abb. 4 A und B wird deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643 über 6 h und 24 h eine signifikante Zunahme der CPT1a- und CACT-mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollzellen bedingt ($P < 0,05$). Dabei konnte jedoch kein konzentrationsabhängiger Effekt von WY 14.643 auf die relativen mRNA-Konzentrationen beider Gene beobachtet werden.

Weder die 6 h- noch die 24 h- Inkubation der T α T1-Zellen mit 25 μ M und 50 μ M Ciprofibrat führte zu einer Änderung der CPT1a-mRNA-Konzentration gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 4 A). Dagegen war die relative mRNA-Konzentration von CACT bei den mit 25 μ M und 50 μ M Ciprofibrat behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nach 6 h und 24 h signifikant erhöht ($P < 0,05$). Unterschiede in der CACT-mRNA-Konzentration zwischen der Inkubation mit 25 μ M und 50 μ M Ciprofibrat wurden nicht beobachtet (Abb. 4 B).

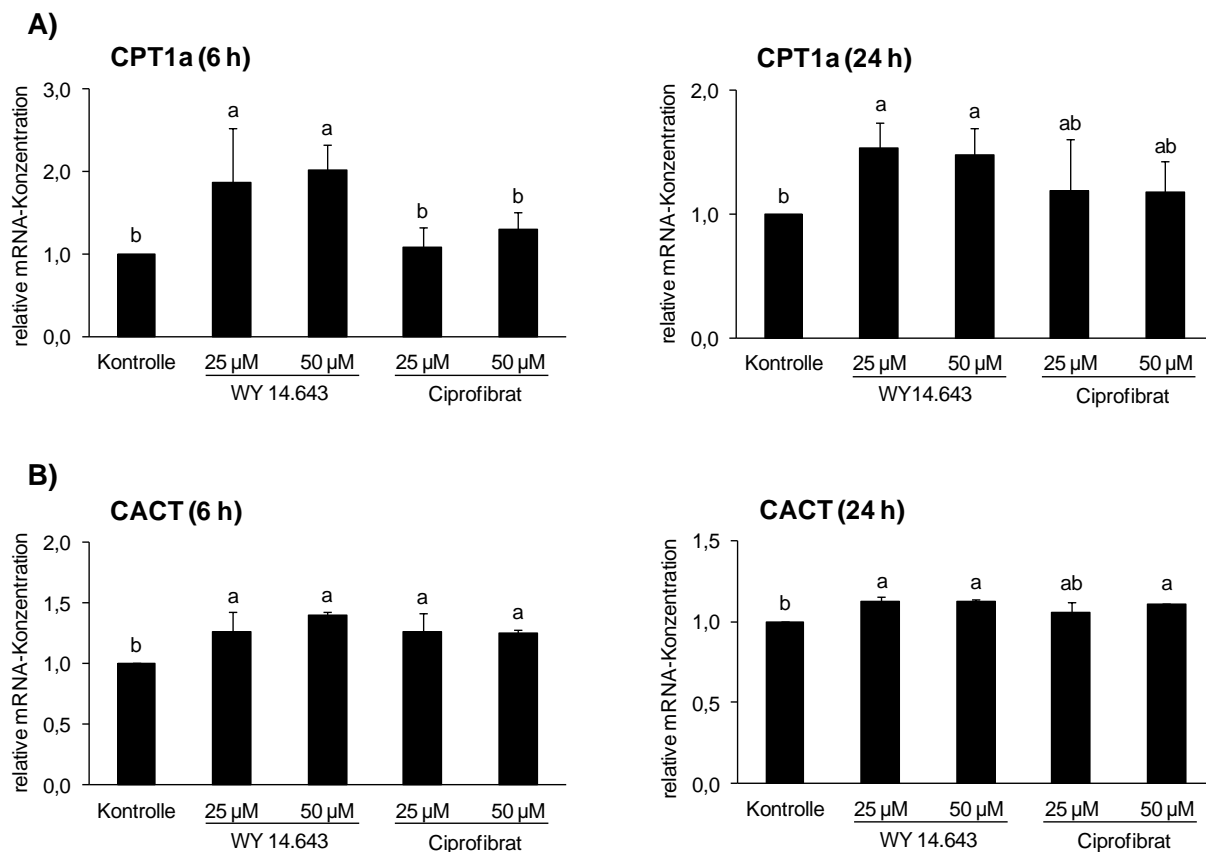


Abb. 4: Relative mRNA-Konzentrationen der A) Carnitin-Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) und B) Carnitin-Acylcarnitintranslokase (CACT) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen mit 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643, Ciprofibrat oder 0,01 % DMSO (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4).

^{ab} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

4.1.2 Relative mRNA-Konzentration von TSH β nach Inkubation der T α T1-Zellen mit synthetischen PPAR α -Agonisten

Wie in Abb. 5 zu erkennen, führte die 6-stündige Inkubation der T α T1-Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643 zu einer etwa 15 %igen Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration gegenüber den Kontrollzellen ($P < 0,05$). Dabei war jedoch zwischen beiden WY 14.643-Konzentrationen kein Unterschied hinsichtlich der relativen mRNA-Konzentration von TSH β zu erkennen.

Auch nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit 50 μ M Ciprofibrat zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen eine signifikant niedrigere TSH β -mRNA-Konzentration (17 %, $P < 0,05$). Dagegen hatte die Inkubation der Zellen mit 25 μ M Ciprofibrat über 6 h keinen Einfluss auf die TSH β -mRNA-Konzentration (Abb. 5).

Auch nach 24-stündiger Inkubation der T α T1-Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643 bzw. 25 μ M und 50 μ M Ciprofibrat konnte eine signifikante Abnahme der relativen mRNA-

Konzentration von TSH β gegenüber den Kontrollzellen beobachtet werden ($P < 0,05$). Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Konzentration beider synthetischer PPAR α -Agonisten (Abb. 5).

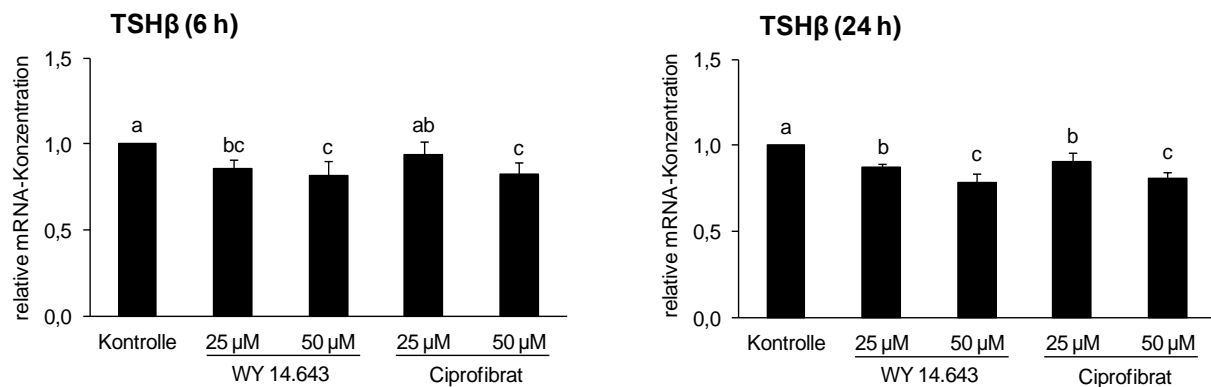


Abb. 5: Relative mRNA-Konzentration der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen in 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643, Ciprofibrat oder 0,01 % DMSO (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=4$).

^{abc} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

4.1.3 Relative mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Zielgenen nach Inkubation der T α T1-Zellen mit natürlichen PPAR α -Agonisten

Um herauszufinden, ob die T α T1-Zellen auch nach Stimulierung mit natürlichen PPAR α -Agonisten mit einer PPAR α -Aktivierung reagieren, wurden die Zellen mit 9(S)-HODE, 8(S)-HETE bzw. Ölsäure behandelt. Wie in Abb. 6 A und B ersichtlich, wurde durch Inkubation der Zellen mit 20 μ M 9(S)-HODE und 2 μ M 8(S)-HETE über 6 h eine signifikante Zunahme der relativen mRNA-Konzentrationen der langkettigen Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase (LCAD) und CACT gegenüber den Kontrollzellen erreicht ($P < 0,05$).

Zudem konnte nach 6- und 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 200 μ M und 400 μ M Ölsäure im Vergleich zu den Kontrollzellen ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Konzentrationen von CPT1a und CACT beobachtet werden ($P < 0,05$; Abb. 7 A und B). Dabei waren keine unterschiedlichen CPT1a- und CACT-mRNA-Konzentrationen zwischen den mit 200 μ M bzw. 400 μ M Ölsäure behandelten Zellen zu erkennen.

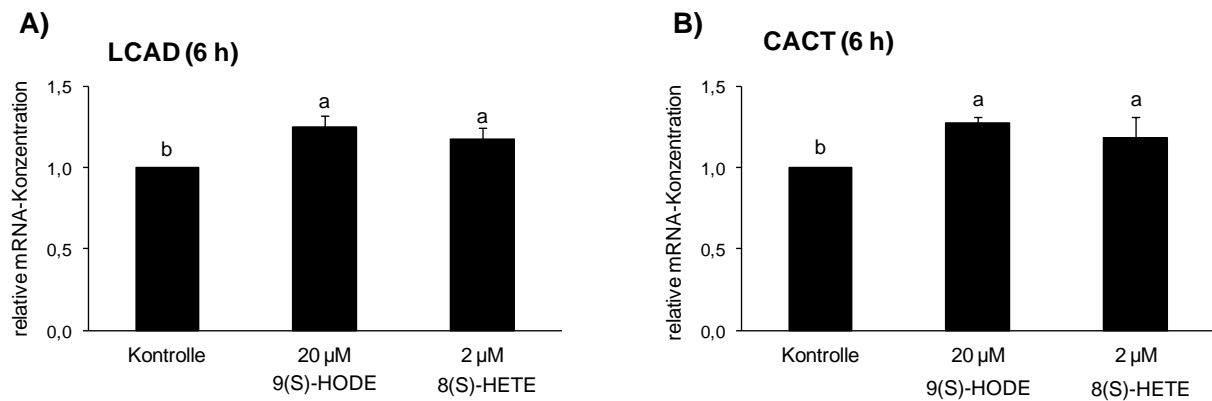


Abb. 6: Relative mRNA-Konzentrationen der A) langkettigen Acyl-CoenzymA-Dehydrogenase (LCAD) und B) Carnitin-Acylcarnitintranslokase (CACT) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen in 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h-Inkubation der Zellen mit 20 μ M 9(S)-HODE, 2 μ M 8(S)-HETE oder 0,64 % Ethanol (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4).

^{ab} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05, Fisher-LSD-Test). Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

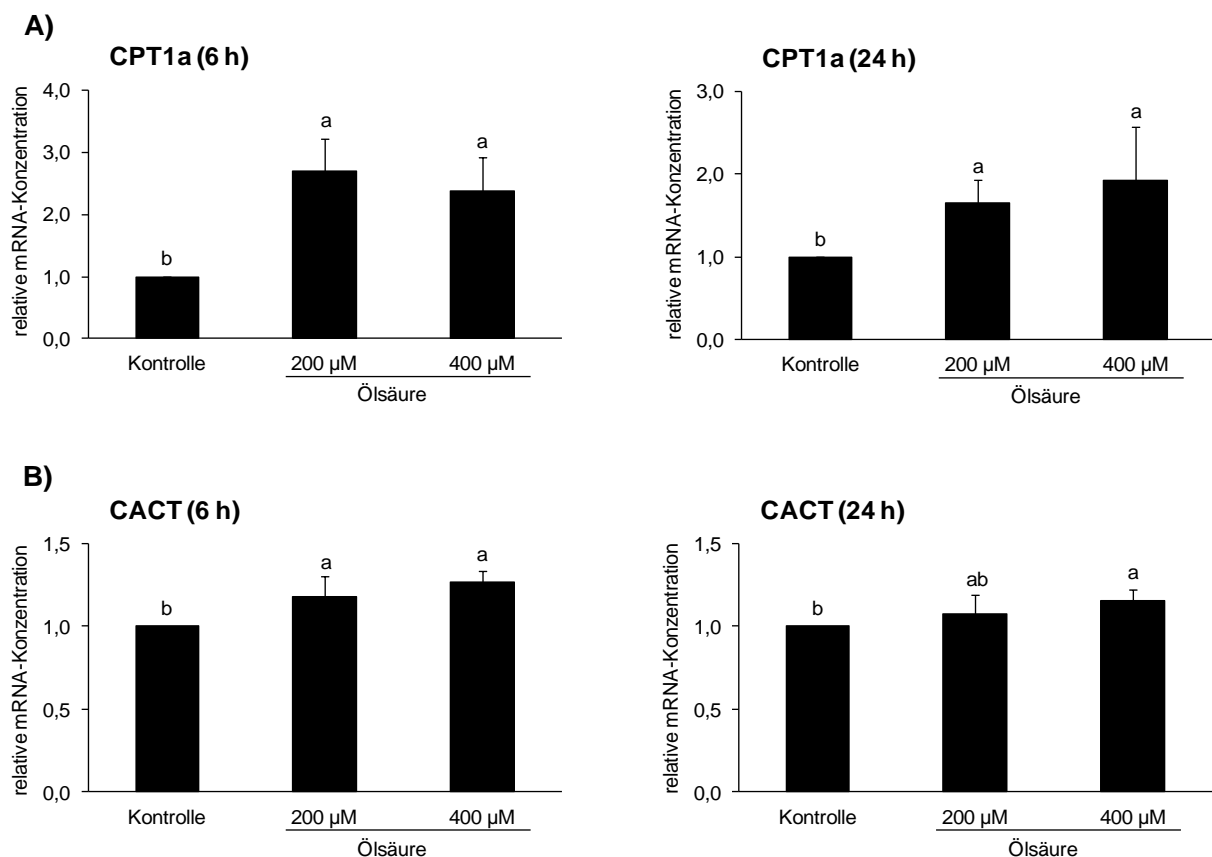


Abb. 7: Relative mRNA-Konzentrationen der A) Carnitin-Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) und B) Carnitin-Acylcarnitintranslokase (CACT) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen mit 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 200 μ M und 400 μ M Ölsäure oder mit 0,5 % FKS-haltigem Medium allein (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4).

^{ab} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05, Fisher-LSD-Test). Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

4.1.4 Relative mRNA-Konzentration von TSH β nach Inkubation der T α T1-Zellen mit natürlichen PPAR α -Agonisten

In Abb. 8 wird ersichtlich, dass nach 6-stündiger Inkubation der T α T1-Zellen mit 20 μ M 9(S)-HODE und 2 μ M 8(S)-HETE eine signifikante Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration um 28 % bzw. 26 % erfolgte ($P < 0,05$).

Dagegen hatte die 6-stündige Behandlung der Zellen mit 200 μ M und 400 μ M Ölsäure keinen Einfluss auf die TSH β -mRNA-Konzentration (Abb. 9). Auch nach Inkubation der Zellen mit 200 μ M Ölsäure über 24 h blieb die relative mRNA-Konzentration von TSH β gegenüber der Kontrollzellen unverändert. Eine Reduktion der TSH β -mRNA-Konzentration (-24%) wurde erst nach 24-stündiger Inkubation mit 400 μ M Ölsäure im Vergleich zur Kontrolle erreicht ($P < 0,05$; Abb. 9).

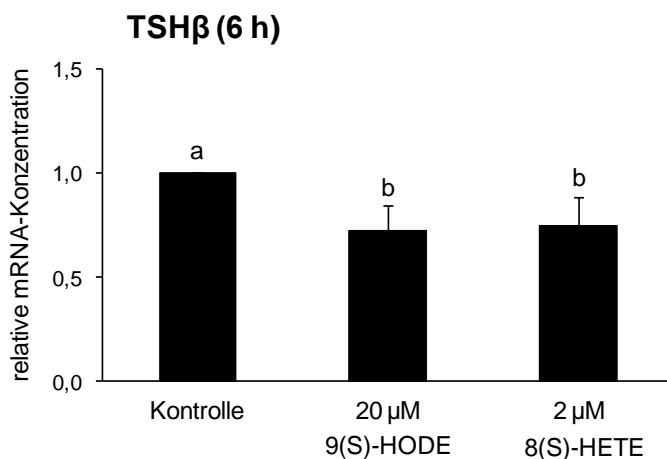


Abb. 8: Relative mRNA-Konzentration der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen in 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h-Inkubation der Zellen mit 20 μ M 9(S)-HODE, 2 μ M 8(S)-HETE oder 0,64 % Ethanol (Kontrolle) in 0,5 % FKS-haltigem Medium.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=4$).

^{ab} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

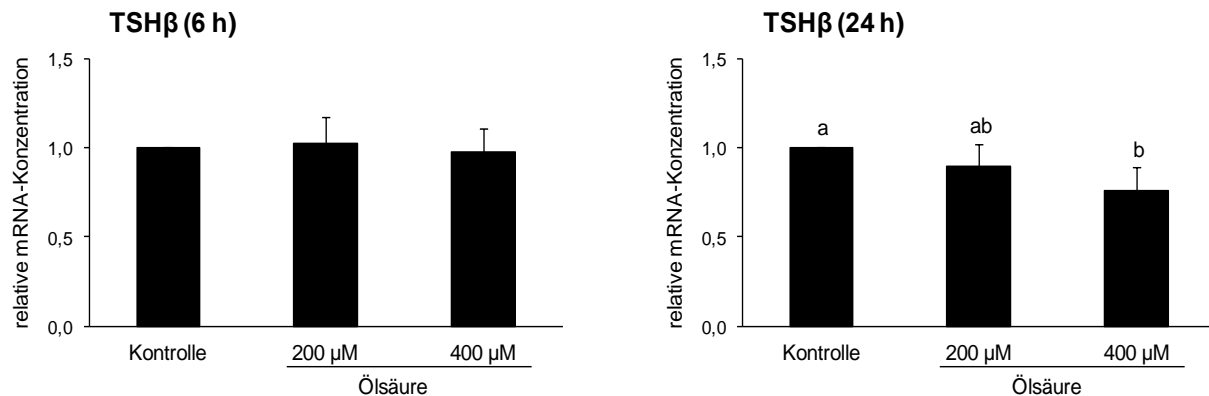


Abb. 9: Relative mRNA-Konzentration der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) nach 16 h-Präinkubation der T α T1-Zellen mit 0,5 % FKS-haltigem Medium und anschließender 6 h- und 24 h-Inkubation der Zellen mit 200 μ M und 400 μ M Ölsäure oder mit 0,5 % FKS-haltigem Medium allein (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4).

^{ab} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05, Fisher-LSD-Test). Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

4.1.5 Relative mRNA-Konzentrationen von TR β 2, RXR α und Neuromedin B nach Inkubation der T α T1-Zellen mit PPAR α -Agonisten

In Tab. 9 sind die relativen mRNA-Konzentrationen von TR β 2, RXR α und Neuromedin B nach Behandlung der T α T1-Zellen mit WY 14.643, Ciprofibrat sowie Ölsäure dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Inkubation der Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643 und Ciprofibrat über 6 und 24 h keinen Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen von TR β 2, RXR α und Neuromedin B im Vergleich zu den Kontrollzellen hatte. Auch nach 6- und 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 200 μ M und 400 μ M Ölsäure blieben die relativen mRNA-Konzentrationen von TR β 2, RXR α und Neuromedin B gegenüber den Kontrollzellen unverändert.

4.1.6 Relative mRNA-Konzentrationen von PPAR α -Corepressoren nach Inkubation der T α T1-Zellen mit PPAR α -Agonisten

In Tab. 10 sind die relativen mRNA-Konzentrationen der PPAR α -Corepressoren *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1* (Rev-erb α), *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors* (SMRT) sowie der *nuclear receptor corepressor 1* (Ncor1) nach Inkubation der T α T1-Zellen mit den PPAR α -Agonisten WY 14.643 sowie Ciprofibrat dargelegt. Nach 6- und 24-stündiger Inkubation der Zellen mit 25 μ M und 50 μ M WY 14.643 sowie Ciprofibrat waren keine unterschiedlichen relativen mRNA-Konzentrationen der drei Corepressoren im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten.

Tab. 9: Relative mRNA-Konzentrationen von Schilddrüsenhormonrezeptor $\beta 2$ (TR $\beta 2$), 9-cis Retinoid-X-Rezeptor α (RXR α) und Neuromedin B der T α T1-Zellen nach 6 h- und 24 h-Inkubation mit synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten

	6 h			24 h		
	TR $\beta 2$	RXR α	Neuromedin B	TR $\beta 2$	RXR α	Neuromedin B
Kontrolle	1,00 \pm 0,00 ^{ab}	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
25 μ M WY 14.643	1,02 \pm 0,09 ^{ab}	1,10 \pm 0,08	1,08 \pm 0,12	1,05 \pm 0,24	0,94 \pm 0,12	1,03 \pm 0,10
50 μ M WY 14.643	1,02 \pm 0,08 ^a	1,03 \pm 0,18	1,05 \pm 0,03	1,12 \pm 0,19	0,86 \pm 0,12	0,96 \pm 0,09
25 μ M Ciprofibrat	0,91 \pm 0,06 ^b	1,24 \pm 0,08	0,98 \pm 0,14	0,97 \pm 0,19	0,90 \pm 0,11	0,96 \pm 0,09
50 μ M Ciprofibrat	1,07 \pm 0,08 ^a	1,07 \pm 0,29	1,03 \pm 0,09	1,02 \pm 0,22	0,93 \pm 0,06	0,98 \pm 0,10
Kontrolle	n.a.	n.a.	1,00 \pm 0,00	n.a.	n.a.	n.a.
20 μ M 9(S)-HODE	n.a.	n.a.	0,96 \pm 0,05	n.a.	n.a.	n.a.
2 μ M 8(S)-HETE	n.a.	n.a.	0,85 \pm 0,20	n.a.	n.a.	n.a.
Kontrolle	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
200 μ M Ölsäure	1,15 \pm 0,18	0,98 \pm 0,15	0,88 \pm 0,10	0,94 \pm 0,13	0,87 \pm 0,16	1,06 \pm 0,13
400 μ M Ölsäure	1,03 \pm 0,06	1,05 \pm 0,20	0,99 \pm 0,09	0,92 \pm 0,12	0,97 \pm 0,17	1,09 \pm 0,15

Nach 16 h-Präinkubation mit 0,5 % FKS-haltigem Medium wurden die Zellen mit WY 14.643 (25 μ M, 50 μ M), Ciprofibrat (25 μ M, 50 μ M); 9(S)-HODE (20 μ M) und 8(S)-HETE (2 μ M) bzw. Ölsäure (200 μ M, 400 μ M) inkubiert. Die Kontrollzellen wurden mit 0,01 % DMSO; 0,64 % Ethanol bzw. mit 0,5 % FKS-haltigem Medium allein behandelt.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4).

n.a.= nicht analysiert.

ab Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

Tab. 10: Relative mRNA-Konzentrationen von *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1* (Rev-erb α), *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors* (SMRT) und *nuclear receptor corepressor 1* (Ncor1) der TaT1-Zellen nach 6 h- und 24 h-Inkubation mit synthetischen PPAR α -Agonisten

	6 h			24 h		
	Rev-erb α	SMRT	Ncor1	Rev-erb α	SMRT	Ncor1
Kontrolle	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00 ^{ab}	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
25 μ M WY 14.643	1,04 \pm 0,21	1,04 \pm 0,25	1,07 \pm 0,11	0,97 \pm 0,09 ^{ab}	1,02 \pm 0,06	0,98 \pm 0,07
50 μ M WY 14.643	1,01 \pm 0,12	1,05 \pm 0,13	1,05 \pm 0,14	0,88 \pm 0,04 ^b	0,94 \pm 0,03	0,94 \pm 0,07
25 μ M Ciprofibrat	1,01 \pm 0,18	0,96 \pm 0,15	1,08 \pm 0,14	1,01 \pm 0,16 ^a	0,91 \pm 0,19	0,95 \pm 0,08
50 μ M Ciprofibrat	1,16 \pm 0,18	1,06 \pm 0,20	1,09 \pm 0,11	1,03 \pm 0,03 ^a	0,96 \pm 0,12	0,99 \pm 0,05

Nach 16 h-Präinkubation mit 0,5 % FKS-haltigem Medium wurden die Zellen mit WY 14.643 (25 μ M, 50 μ M), Ciprofibrat (25 μ M, 50 μ M) oder DMSO (0,01 %) als Kontrolle in 0,5 % FKS-haltigen Medium inkubiert.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=4).

ab Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Die Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin.

4.1.7 Ergebnisse der TSH β -Promotoraktivitätsanalysen

Die Sequenzanalysen der 5'-flankierenden Region des TSH β -Gens der Maus mittels NUBIScan Software (Podvinec *et al.*, 2002) ergaben 3 putative PPREs in den Positionen -553 bis -565, -4 bis -16 sowie +381 bis +393 relativ zum Transkriptionsstart (Tab. 11). Um zu überprüfen, ob der TSH β -Promotor einer negativen Regulation durch PPAR α unterliegt, wurde die 5'-regulatorische Region des TSH β -Gens der Maus (Sequenz -944 bis +480 relativ zum Transkriptionsstart) in ein Luciferase-Reporterplasmid (pGL3) kloniert und anschließend über transiente Transfektion in HepG2-Zellen eingebracht. HepG2-Zellen mit diesem TSH β -Reportergenkonstrukt (pGL3_TSH β) wiesen insgesamt eine sehr geringe Luciferase-Aktivität auf, die auch nach Inkubation mit 100 μ M WY 14.643 unverändert blieb (Abb. 10). Bei den HepG2-Zellen, die mit dem PPAR α -Expressionsplasmid pCMX-PPAR α und dem RXR α -Expressionsplasmid pCMX-RXR α co-transfiziert wurden, war ebenfalls keine Änderung der relativen Luciferaseaktivität des pGL3-TSH β -Reporterkonstrukts nach Stimulation mit WY 14.643 zu beobachten. Dagegen zeigte sich bei den mit dem positiven Kontrollplasmid 3 x ACO-PPRE transfizierten und mit pCMX-PPAR α und pCMX-RXR α co-transfizierten HepG2-Zellen infolge der Inkubation mit WY 14.643 ein starker Anstieg der relativen Luciferaseaktivität gegenüber den mit DMSO behandelten Kontrollzellen (Abb. 10).

Tab. 11: Ergebnisse der NUBIScan-Analyse

Direct-Repeat 1	Position (Strang)	P-Value	Site sequence
PPRE-929	-4 bis -16 (+)	0.0501004	AGATCAgAGGGGA
PPRE-389	-553 bis -565 (+)	0.0690179	TGATCTcAGGTCA
PPRE-1337	+381 bis +393 (-)	0.0248866	AGCACAcAGGTTA
Konsensussequenz			AGGTCA _n AGGTCA

PPRE: PPAR *response element*

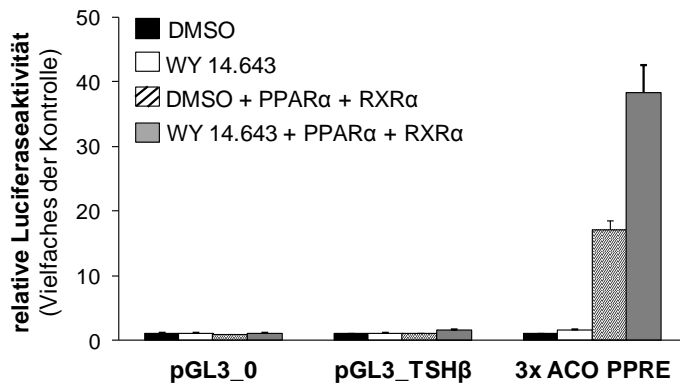


Abb. 10: Effekt des PPAR α -Agonisten WY 14.643 auf die Promotoraktivität der β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β) in HepG2-Zellen. Die HepG2-Zellen wurden entweder mit dem pGL3-TSH β -Konstrukt (pGL3_TSH β), dem Kontrollplasmid pGL3_0 oder dem positiven Kontrollplasmid 3 x ACO PPRE sowie mit dem internen Kontrollplasmid pGL4 transient transfiziert. Zudem wurden die Zellen mit dem PPAR α -Expressionsplasmid pCMX-mPPAR α und dem RXR α -Expressionsplasmid pCMX-mRXR α co-transfiziert. Anschließend erfolgte eine 24 stündige-Inkubation der Zellen mit WY 14.643 oder DMSO (Kontrolle). Nach Zelllyse wurde die Luciferaseaktivität ermittelt. Die relative Luciferaseaktivität entspricht dem Verhältnis Firefly-/Renilla-Luciferase. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=2). Die DMSO-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

4.2 Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen

4.2.1 Fastenversuch (*in-vivo*-Versuch 1)

4.2.1.1 Körper- und relatives Lebergewicht

Im Rahmen des Versuchs wurden das Anfangs- und die Endgewicht sowie das relative Lebergewicht der Mäuse erfasst. Zu Versuchsbeginn konnte kein Körpergewichtsunterschied zwischen den einzelnen Gruppen (WT Kontrolle $28,5 \pm 3,6$ g; KO Kontrolle $28,4 \pm 2,3$ g; WT Fasten $28,5 \pm 3,6$ g; KO Fasten $28,4 \pm 2,3$ g) beobachtet werden. In Abb. 11 A ist das Körpergewicht der Tiere zu Versuchsende dargestellt. Zu erkennen ist, dass die über die Dauer von 48 h gefasteten Tiere unabhängig vom Genotyp ein etwa 13% niedrigeres Körpergewicht gegenüber den Kontrolltieren aufwiesen ($P < 0,001$).

Zudem zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Fastens, des Genotyps sowie der Interaktion beider Faktoren auf das relative Lebergewicht der Tiere (Abb. 11 B). So wiesen die gefasteten Tiere ein signifikant höheres relatives Lebergewicht als die Kontrolltiere auf ($P < 0,001$). Weiterhin konnte bei den PPAR α -KO-Mäusen ein signifikant höheres Lebergewicht im Vergleich zu den WT-Tieren beobachtet werden ($P < 0,001$). Bei den gefasteten PPAR α -KO-Tieren kam es gegenüber den PPAR α -KO-Kontrolltieren zu einer etwa 30 %igen Zunahme des Lebergewichtes, während bei den WT-Tieren infolge des Fastens keine Lebergewichtsveränderung erkennbar war ($P < 0,001$; Abb. 11).

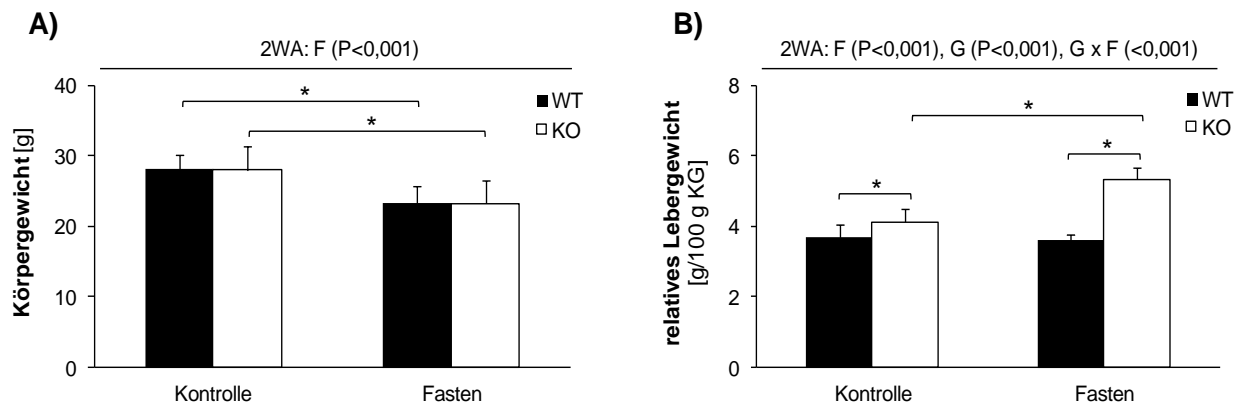


Abb. 11: A) Körpergewicht (g) und B) relatives Lebergewicht (g/100g KG) von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8); KG= Körpergewicht.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.1.2 Konzentrationen von NEFA im Plasma

Wie in Abb. 12 zu erkennen, hatte das Fasten, der Genotyp sowie die Interaktion beider Faktoren einen Einfluss auf die Konzentrationen an NEFA im Plasma der Mäuse. Sowohl bei den WT- als auch bei den PPAR α -KO-Mäusen konnte infolge des Fastens ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration an NEFA im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden (P<0,001). Dabei waren bei den gefasteten PPAR α -KO-Tieren gegenüber den gefasteten WT-Tieren die NEFA-Konzentrationen im Plasma um 28 % erhöht (P<0,05). Die *ad libitum* gefütterten Kontrolltiere wiesen dagegen keine unterschiedliche Konzentration an NEFA im Plasma auf (Abb. 12).

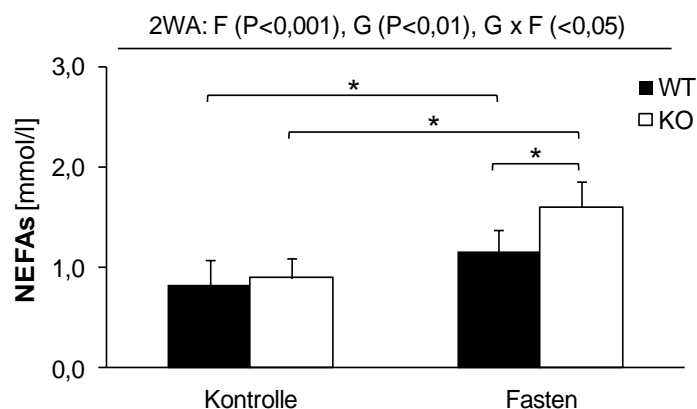


Abb. 12: Konzentrationen unveresterter Fettsäuren (NEFA) (mmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Plasmaproben zweier Tiere einer Gruppe wurden gepoolt.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8).

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.1.3 Konzentrationen von T4, T3, fT4 und fT3 im Plasma

In Abb. 13 A-D sind die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T4, T3, fT4 und fT3 im Plasma der Mäuse dargestellt. Zu erkennen ist, dass unter Fastenbedingungen sowohl bei den WT- als auch bei den PPAR α -KO-Tieren die Schilddrüsenhormone im Plasma im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verringert waren ($P < 0,001$). Auch der Genotyp beeinflusste die Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma der Tiere. So wiesen die WT-Tiere signifikant höhere T4- ($P < 0,01$; Abb. 13 A), fT4- ($P < 0,001$; Abb. 13 C) und fT3- ($P < 0,05$; Abb. 13 D) Konzentrationen im Plasma als die PPAR α -KO-Tiere auf. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Interaktion von Genotyp und Fasten auf die Plasmakonzentration an T3 ($P < 0,01$; Abb. 13 B), fT4 ($P < 0,001$; Abb. 13 C) sowie fT3 ($P < 0,05$; Abb. 13 D). Ein tendenzieller Effekt der Interaktion beider Einflussfaktoren ($P < 0,1$; Abb. 13 A) war auf die T4-Konzentration im Plasma der Tiere zu erkennen. Zudem konnte im Plasma der gefasteten PPAR α -KO-Tiere ein deutlich stärkerer Konzentrationsabfall von T4, T3, fT4 und fT3 gegenüber der gefasteten Kontrolltiere beobachtet werden, während sich die Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma der WT- und PPAR α -KO-Kontrolltiere nicht unterschieden (Abb. 13)

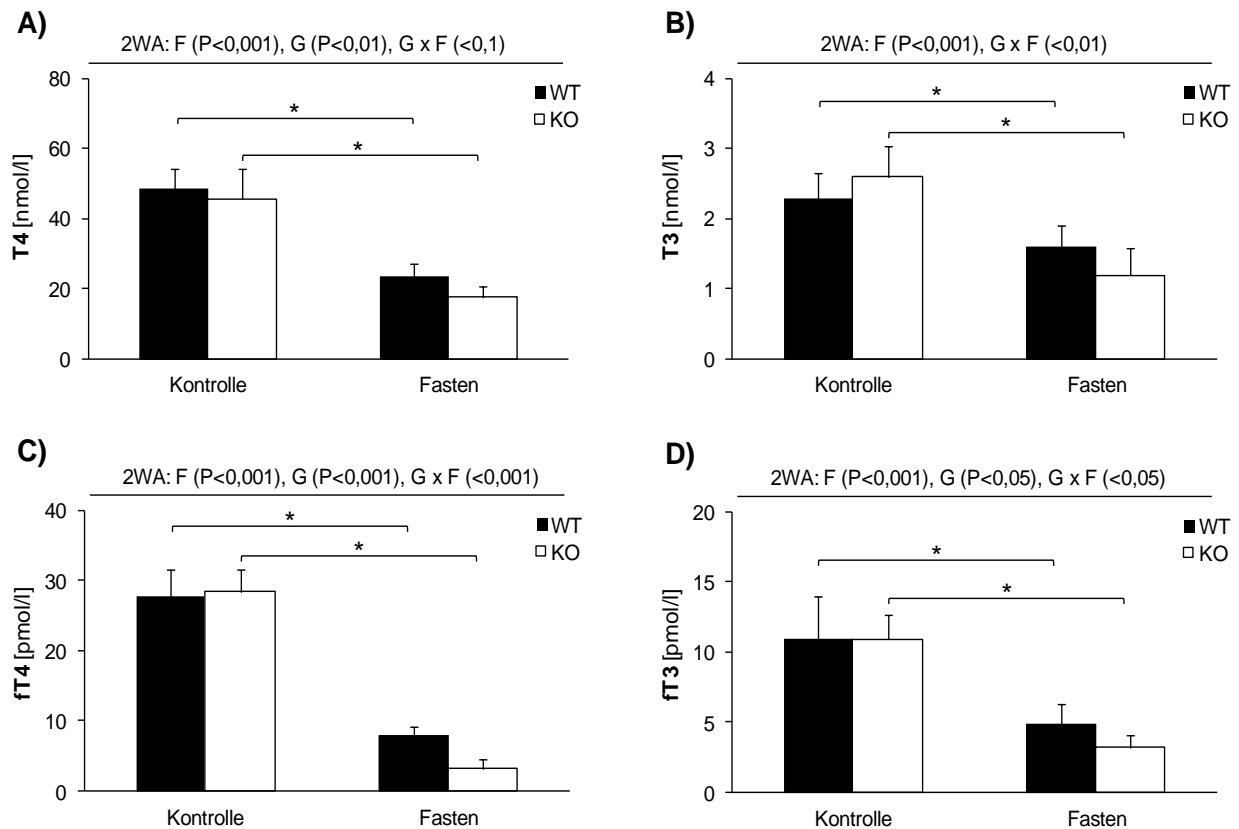


Abb. 13: Konzentrationen von A) Thyroxin (T4) (nmol/l), B) Triiodthyronin (T3) (nmol/l), C) freiem T4 (ft4) (pmol/l) und D) freiem T3 (ft3) (pmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Plasmaproben zweier Tiere einer Gruppe wurden gepoolt.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8).

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.1.4 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen im Hypothalamus

In Abb. 14 ist die relative mRNA-Konzentration von TRH im Hypothalamus der Mäuse dargestellt. Es konnte weder ein Einfluss des Fastens, des Genotyp noch einer Interaktion beider Faktoren auf die TRH-mRNA-Konzentration beobachtet werden.

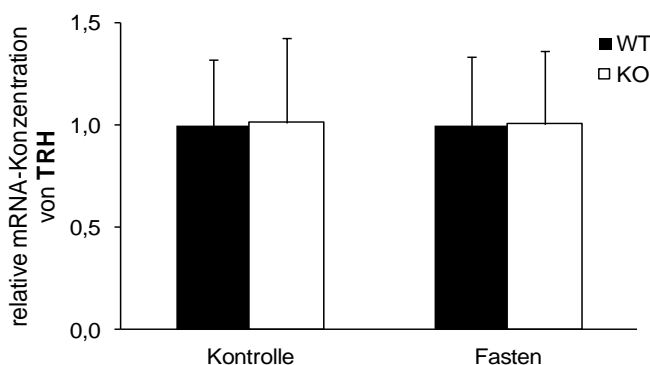


Abb. 14: Relative mRNA-Konzentration von Thyreoliberin (TRH) im Hypothalamus von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=16).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin und Cyclophilin A.

4.2.1.5 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen in der Hypophyse

Um eine PPAR α -Aktivierung in der Hypophyse der Mäuse zu belegen, wurde die relative mRNA-Konzentration des PPAR α -Zielgens Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2 (HMGCS2) bestimmt. Dabei zeigte sich ein Einfluss des Fastens, des Genotyps sowie eine Interaktion beider Faktoren (Abb. 15 A). Infolge des Fastens kam es zu einem signifikanten Anstieg der HMGCS2-mRNA-Konzentration in der Hypophyse der Tiere ($P < 0,001$). Dieser war bei den gefasteten WT-Tieren im Vergleich zu den gefasteten PPAR α -KO-Tieren deutlich stärker ausgeprägt ($P < 0,01$). Insgesamt wiesen die WT-Tiere unabhängig von der Futteraufnahme eine signifikant höhere mRNA-Konzentration an HMGCS2 in der Hypophyse als die PPAR α -KO-Tiere auf ($P < 0,001$; Abb. 15 A).

In Abb. 15 B und C wird deutlich, dass die relativen mRNA-Konzentrationen von TSH β und TSH α in der Hypophyse der Tiere dem Einfluss des Fastens, des Genotyps sowie der Interaktion von Genotyp und Fasten unterlagen. So wiesen die gefasteten Tiere signifikant niedrigere hypophysäre TSH β - und TSH α -mRNA-Konzentrationen als die Kontrolltiere auf ($P < 0,001$). Infolge des Fastens konnten bei den WT-Tieren gegenüber den PPAR α -KO-Tieren höhere mRNA-Konzentrationen an TSH β (2,6 fach) und TSH α (1,4 fach) in der Hypophyse beobachtet werden ($P < 0,01$). Dagegen unterschieden sich die hypophysären TSH β - und TSH α -mRNA-Konzentrationen der PPAR α -KO- und WT-Kontrolltiere nicht (Abb. 15 B, C).

Die relative mRNA-Konzentration von Neuromedin B in der Hypophyse der Mäuse wurde nur durch den Genotyp beeinflusst. So zeigte sich, dass die PPAR α -KO-Mäuse sowohl unter Fasten- als auch unter Fütterungsbedingungen eine signifikant höhere Neuromedin B-mRNA-Konzentration als die WT-Tieren aufwiesen ($P < 0,001$) (Abb. 15 D).

Bei den relativen mRNA-Konzentrationen von TRHDE und DIO2 in der Hypophyse der Mäuse konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden (Abb. 15 E, G). Es zeigte sich ausschließlich ein tendenzieller Effekt des Genotyps auf die hypophysäre DIO2-mRNA-Konzentration ($P < 0,1$). Dabei war bei den WT-Tieren gegenüber den PPAR α -KO-Tieren eine höhere relative mRNA-Konzentration der DIO2 zu beobachten.

Die hypophysäre TR β 2-mRNA-Konzentration wurde durch den Genotyp der Tiere signifikant beeinflusst ($P < 0,05$). So wiesen die WT-Tiere unabhängig von der Futteraufnahme eine höhere mRNA-Konzentration an TR β 2 als die PPAR α -KO-Tiere auf (Abb. 15 F).

Weiterhin konnte eine Änderung der relativen RXR α -mRNA-Konzentration in der Hypophyse der Tiere in Abhängigkeit vom Fasten und vom Genotyp beobachtet werden. In

der Hypophyse der Tiere kam es infolge des Fastens zu einem signifikanten Anstieg der relativen mRNA-Konzentration von RXR α im Vergleich zu den Kontrolltieren ($P < 0,01$). Zudem zeigte sich bei den WT- gegenüber den PPAR α -KO-Tieren eine signifikant geringere hypophysäre RXR α -mRNA-Konzentration ($P < 0,05$) (Abb. 15 H).

4.2.1.6 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen in der Schilddrüse

Um zu untersuchen, ob sich der Unterschied der TSH β -mRNA-Konzentration zwischen den gefasteten WT- und den gefasteten PPAR α -KO-Mäusen auch in der mRNA-Expression verschiedener Schilddrüsen Gene widerspiegelt, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von TSHR, NIS, TPO sowie PAX-8 bestimmt und in Abb. 16 A-D dargelegt. Dabei zeigte sich, dass Fasten unabhängig vom Genotyp der Tiere eine signifikante Abnahme der relativen mRNA-Konzentrationen von TSHR ($P < 0,01$), NIS ($P < 0,001$) und TPO ($P < 0,001$) in der Schilddrüse bedingt. Dagegen blieb die PAX-8-mRNA-Konzentration unbeeinflusst.

Zudem konnte eine Genotyp-spezifische Veränderung der relativen mRNA-Konzentration von NIS und ein Einfluss der Interaktion von Genotyp und Fasten auf die TPO-mRNA-Konzentration beobachtet werden. So wiesen die WT-Tiere eine signifikant höhere NIS-mRNA-Konzentration in der Schilddrüse als die PPAR α -KO-Tiere auf ($P < 0,001$; Abb. 16 C). Ebenso zeigte sich bei den WT-Tieren gegenüber den PPAR α -KO-Tieren eine signifikant höhere thyreoidale TPO-mRNA-Konzentration. Dieser Effekt blieb jedoch ausschließlich auf die gefasteten Tiere beschränkt ($P < 0,05$; Abb. 16 D).

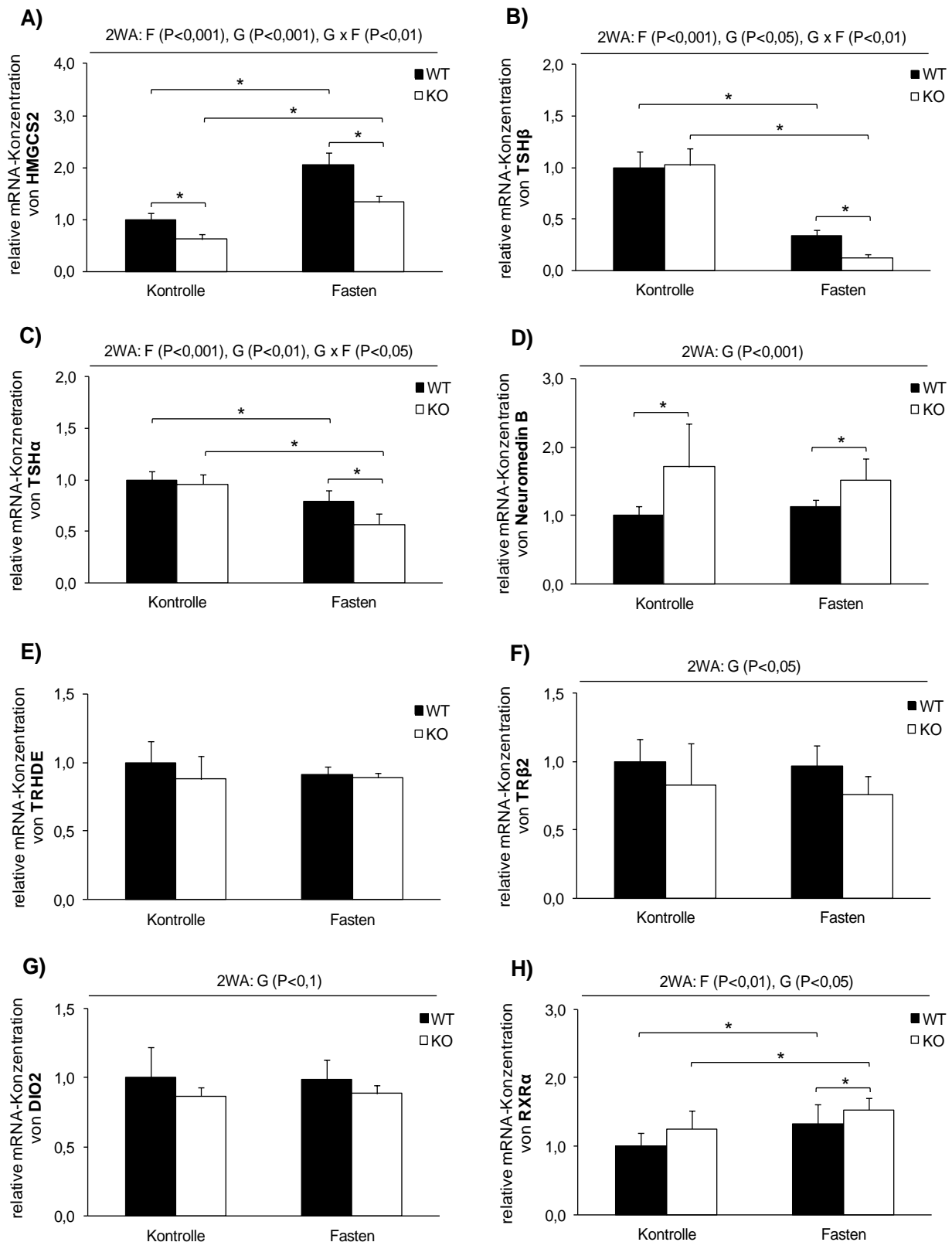


Abb. 15: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2 (HMGCS2), B) β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β), C) α -Untereinheit des Thyreotropins (TSH α), D) Neuromedin B, E) TRH-degrading enzyme (TRHDE), F) Schilddrüsenhormonrezeptor (TR β 2), G) Typ II 5' Deiodase (DIO2) und H) 9-cis Retinoid-X-Rezeptor α (RXR α) in der Hypophyse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin und Cyclophilin A.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

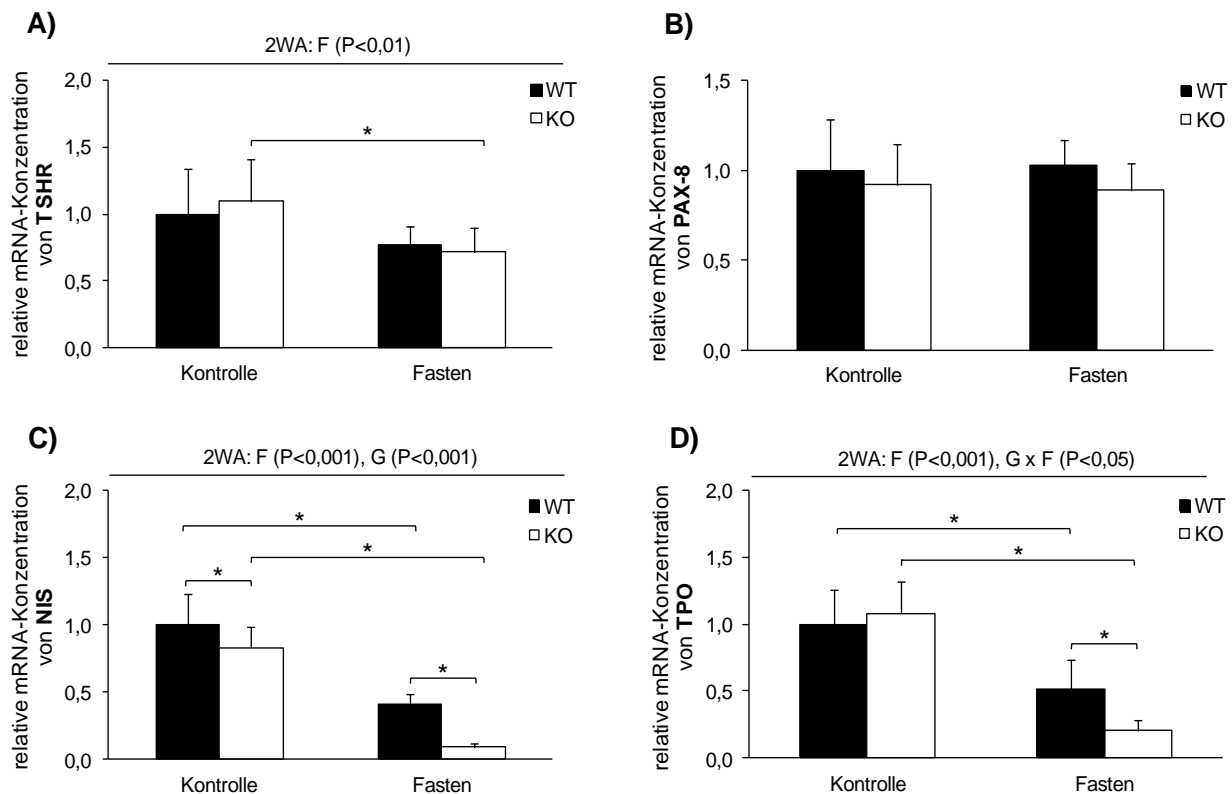


Abb. 16: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Thyreotropin-Rezeptor (TSHR), B) *paired-domain/homeo box transcription factor 8* (PAX-8), C) Natrium-Iodid-Symporter (NIS) und D) Thyreoperoxidase (TPO) in der Schilddrüse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin und Cyclophilin A.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.2 Fastenversuch (*in-vivo*-Versuch 2)

4.2.2.1 Körper- und relatives Lebergewicht

Auch im zweiten Fastenversuch wurde zu Beginn und zum Ende das Körpergewicht der Mäuse erfasst. Zu Versuchsbeginn unterschied sich das Körpergewicht der Tiere zwischen den einzelnen Gruppen nicht. Wie in Abb. 17 A zu erkennen, war sowohl bei den WT- als auch bei den PPAR α -KO-Tieren ein niedrigeres Körpergewicht gegenüber den Kontrolltieren zu beobachten (P<0,001). Auf das zu Versuchsende bestimmte relative Lebergewicht der Tiere nahm das Fasten (P<0,001), der Genotyp (P<0,001) sowie die Interaktion beider Faktoren (P<0,001) Einfluss (Abb. 17 B). So wiesen die WT-Tiere ein signifikant geringeres Lebergewicht als die PPAR α -KO-Tiere auf. Zudem kam es bei den gefasteten WT-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer Abnahme des Lebergewichts. Dagegen war das Lebergewicht der gefasteten PPAR α -KO-Tiere gegenüber der Kontrolltiere um etwa 23 %

erhöht (Abb. 17 B).

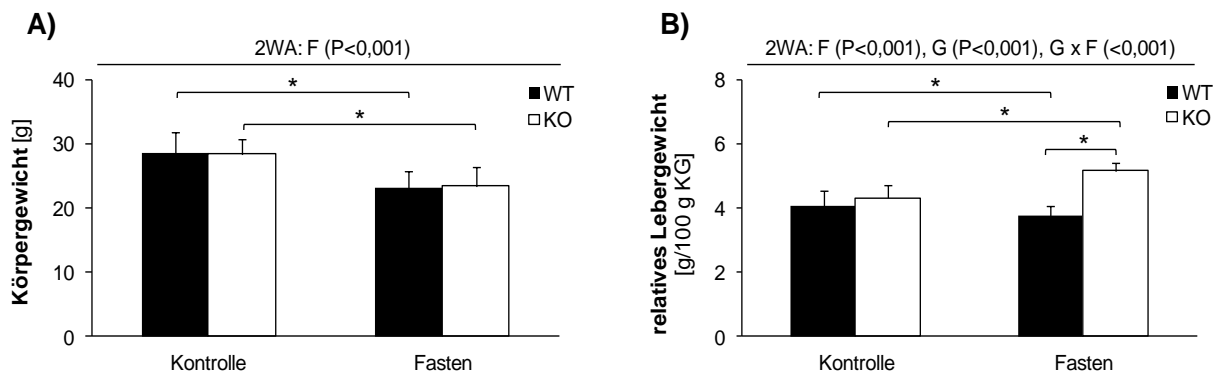


Abb. 17: A) Körpergewicht (g) und B) relatives Lebergewicht (g/100g KG) von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8); KG= Körpergewicht.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.2.2 Konzentrationen von NEFA im Plasma

Die Konzentrationen an NEFA im Plasma der Mäuse wurden durch das Fasten und den Genotyp beeinflusst (Abb. 18). Es zeigte sich, dass die gefasteten Tiere gegenüber den Kontrolltieren signifikant höhere Plasmakonzentrationen an NEFA aufwiesen (P<0,001). Bei den gefasteten PPAR α -KO-Tieren konnte dabei ein 30 % stärkerer Anstieg der NEFA-Konzentrationen im Plasma im Vergleich zu den gefasteten WT-Tieren beobachtet werden. Dagegen unterschieden sich die WT- und PPAR α -KO-Kontrolltiere hinsichtlich der Konzentrationen an NEFA im Plasma nicht. Insgesamt wiesen die PPAR α -KO-Tiere 73 % höhere NEFA-Konzentrationen als die WT-Tiere auf (P<0,01; Abb. 18).

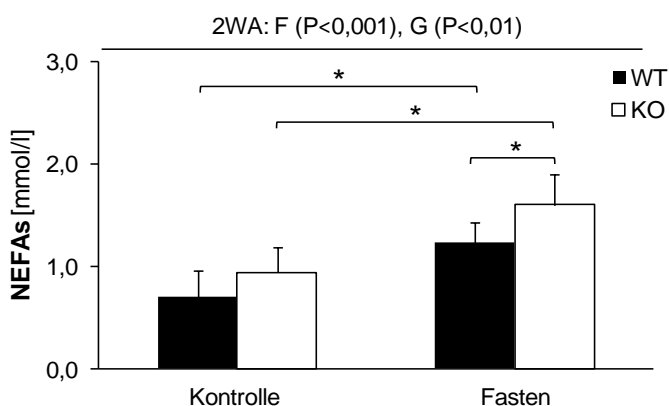


Abb. 18: Konzentrationen unveresterter Fettsäuren (NEFA) (mmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Plasmaproben zweier Tiere einer Gruppe wurden gepoolt.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8).

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G).

4.2.2.3 Konzentration von fT4 im Plasma

In Abb. 19 ist die Konzentration des fT4 im Plasma der Mäuse dargestellt. Es wird deutlich, dass Fasten die Konzentration an fT4 im Plasma der Tiere signifikant beeinflusst ($P < 0,001$). Die fT4-Konzentration im Plasma der gefasteten WT-Tiere nahm gegenüber der WT-Kontrolltiere um etwa 28 % ab. Auch bei den gefasteten PPAR α -KO-Tieren konnte im Vergleich zu den PPAR α -KO-Kontrolltieren eine 37 %ige Abnahme der Plasma-fT4-Konzentration beobachtet werden. Zudem war bei den WT-Tieren unabhängig von der Futteraufnahme eine signifikant höhere Plasmakonzentration an fT4 als bei den PPAR α -KO-Tieren zu erkennen ($P < 0,01$; Abb. 19).

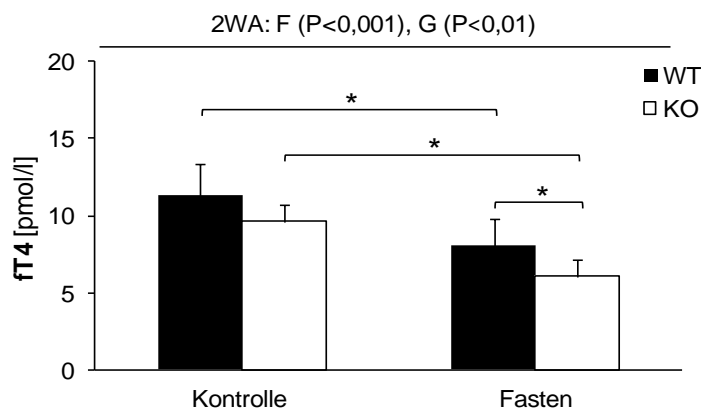


Abb. 19: Konzentration an freiem Triiodthyronin fT4 (pmol/l) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Plasmaproben zweier Tiere einer Gruppe wurden gepoolt.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=8$).

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G).

4.2.2.4 Konzentration von Leptin im Plasma

In Abb. 20 wird ersichtlich, dass auch die Leptinkonzentration im Plasma der Mäuse durch das Fasten beeinflusst wird ($P < 0,05$). Dabei war bei den gefasteten WT-Tieren die Plasma-Leptinkonzentration gegenüber den WT-Kontrolltieren um 40 % vermindert, während sich die der gefasteten PPAR α -KO-Tiere nicht von denen der PPAR α -KO-Kontrolltiere unterschied (Abb. 20).

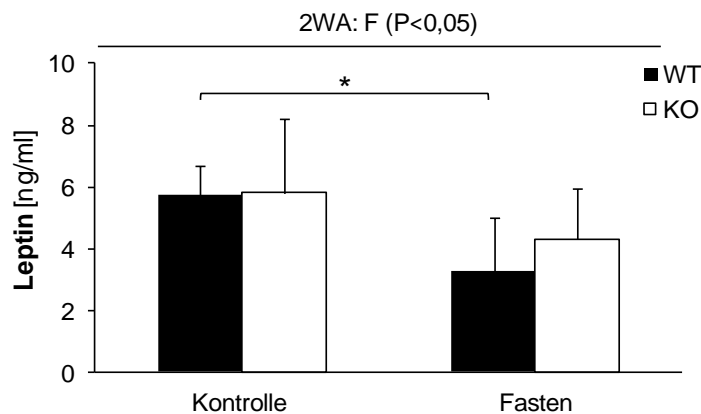


Abb. 20: Konzentration an Leptin (ng/ml) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Plasmaproben zweier Tiere einer Gruppe wurden gepoolt.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=8).

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F).

4.2.2.5 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen im Hypothalamus

In Abb. 21 A ist zu erkennen, dass die relative TRH-mRNA-Konzentration im Hypothalamus der Mäuse nicht durch den Genotyp, das Fasten oder die Interaktion beider Faktoren beeinflusst wurde.

Bei der relativen mRNA-Konzentration von POMC im Hypothalamus der Mäuse konnten fastenbedingte Veränderungen beobachtet werden (Abb. 21 B). So wiesen sowohl die WT- als auch die PPAR α -KO-Tiere nach 48-stündigem Fasten eine signifikant niedrigere POMC-mRNA-Konzentration als die Kontrolltiere auf (P<0,001).

Auch die DIO2- und NPY-mRNA-Konzentrationen im Hypothalamus der Tiere wurden durch das Fasten beeinflusst (Abb. 21 C, D). So konnte bei den gefasteten Tieren ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Konzentrationen von DIO2 und NPY im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden (P<0,001). Zudem wiesen die WT-Tiere eine signifikant höhere NPY-mRNA-Konzentration gegenüber den PPAR α -KO-Tieren auf (P<0,05; Abb. 21 D).

Wie in Abb. 21 E und F zu erkennen ist, kam es infolge des Fastens zu Veränderungen der relativen mRNA-Konzentrationen von MCT8 und MCT10 im Hypothalamus der Tiere. Bei gefasteten Tieren zeigte sich verglichen mit den Kontrolltieren eine signifikant verminderte hypothalamische MCT8-mRNA-Konzentration (P<0,001; Abb. 21 E). Dagegen war die relative mRNA-Konzentration von MCT10 der gefasteten Tieren gegenüber den Kontrolltieren erhöht (P<0,001). Zudem wurde die relative mRNA-Konzentration von MCT8

durch die Interaktion von Genotyp und Fasten beeinflusst ($P < 0,05$). So konnte bei den WT- verglichen mit den PPAR α -KO-Tieren eine geringere Abnahme der hypothalamische MCT8- mRNA-Konzentration infolge des Fastens beobachtet werden (Abb. 21 F).

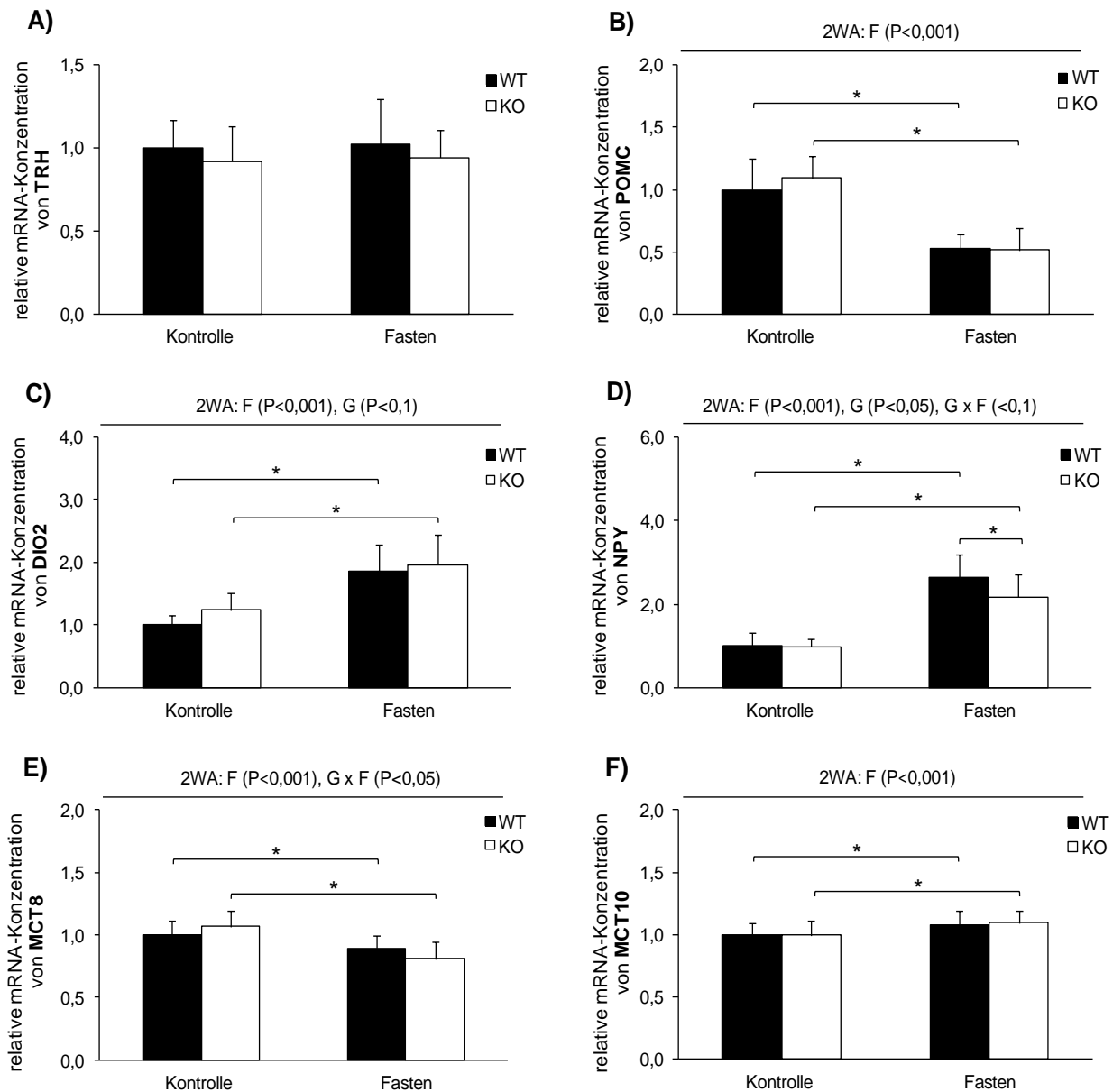


Abb. 21: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Thyreoliberin (TRH), B) Proopiomelanocortin (POMC), C) Typ II 5' Deiodase (DIO2), D) Neuropeptid Y (NPY), E) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und F) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) im Hypothalamus von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=16$).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin und RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.2.6 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen in der Hypophyse

Die relative mRNA-Konzentration von TSH β in der Hypophyse der Mäuse wurde durch das

Fasten und den Genotyp beeinflusst. Wie in Abb. 22 A ersichtlich ist, kam es bei den gefasteten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer signifikanten Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration ($P < 0,001$). Weiterhin zeigte sich bei den WT-Tieren unabhängig von der Futteraufnahme eine signifikant höhere TSH β -mRNA-Konzentration als bei den PPAR α -KO-Tieren ($P < 0,05$).

Bei den relativen mRNA-Konzentrationen von POMC und MCT8 in der Hypophyse der Tiere konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden (Abb. 22 B, C). Die relative mRNA-Konzentration von MCT10 in der Hypophyse der Mäuse unterlag dem Einfluss des Fastens (Abb. 22 D). So kam es bei den gefasteten PPAR α -KO-Tieren verglichen mit den PPAR α -KO-Kontrolltieren zu einem signifikanten Anstieg der MCT10-mRNA-Konzentration ($P < 0,05$). Zudem wiesen die PPAR α -KO-Tiere nach 48 h Fasten eine signifikant höhere MCT10-mRNA-Konzentration als die WT-Tiere auf ($P < 0,05$; Abb. 22 D).

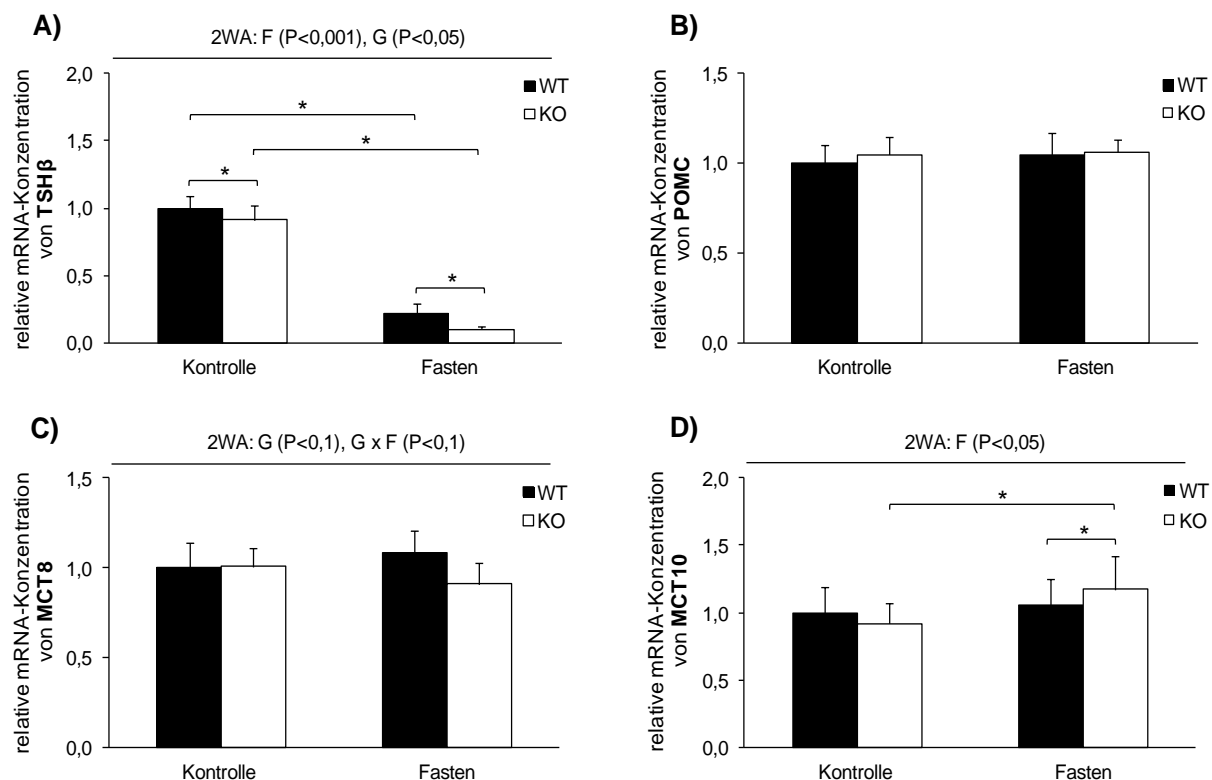


Abb. 22: Relative mRNA-Konzentrationen von A) β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β), B) Proopiomelanocortin (POMC), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Hypophyse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=8$).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin und RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.2.7 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen in der Schilddrüse

In Abb. 23 sind die relativen mRNA-Konzentrationen von NIS, TPO, MCT8 und MCT10 in der Schilddrüse der Mäuse dargestellt. Zu erkennen ist, dass die relativen mRNA-Konzentrationen von NIS und TPO fasten- und genotypbedingten Änderungen unterlagen. So nahmen die mRNA-Konzentrationen von NIS und TPO bei den gefasteten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren ab ($P < 0,001$). Zudem wiesen die WT-Tiere signifikant höhere relative mRNA-Konzentrationen von NIS ($P < 0,01$) und TPO ($P < 0,05$) als die PPAR α -KO-Tiere auf (Abb. 23 A und B).

Auch die relativen mRNA-Konzentrationen von MCT8 und MCT10 in der Schilddrüse der Tiere wurde durch das Fasten und den Genotyp beeinflusst (Abb. 23 C und D). Infolge des Fastens war eine signifikante Abnahme der thyreoidalen MCT8- und MCT10-mRNA-Konzentrationen zu beobachten. Weiterhin zeigte sich bei den WT-Tieren gegenüber den PPAR α -KO-Tieren signifikant höhere relative mRNA-Konzentrationen von MCT8 ($P < 0,05$) und MCT10 ($P < 0,001$). Der Effekt des Genotyps auf die relative mRNA-Konzentration von MCT10 wurde durch das Fasten noch verstärkt ($P < 0,05$; Abb. 23 D).

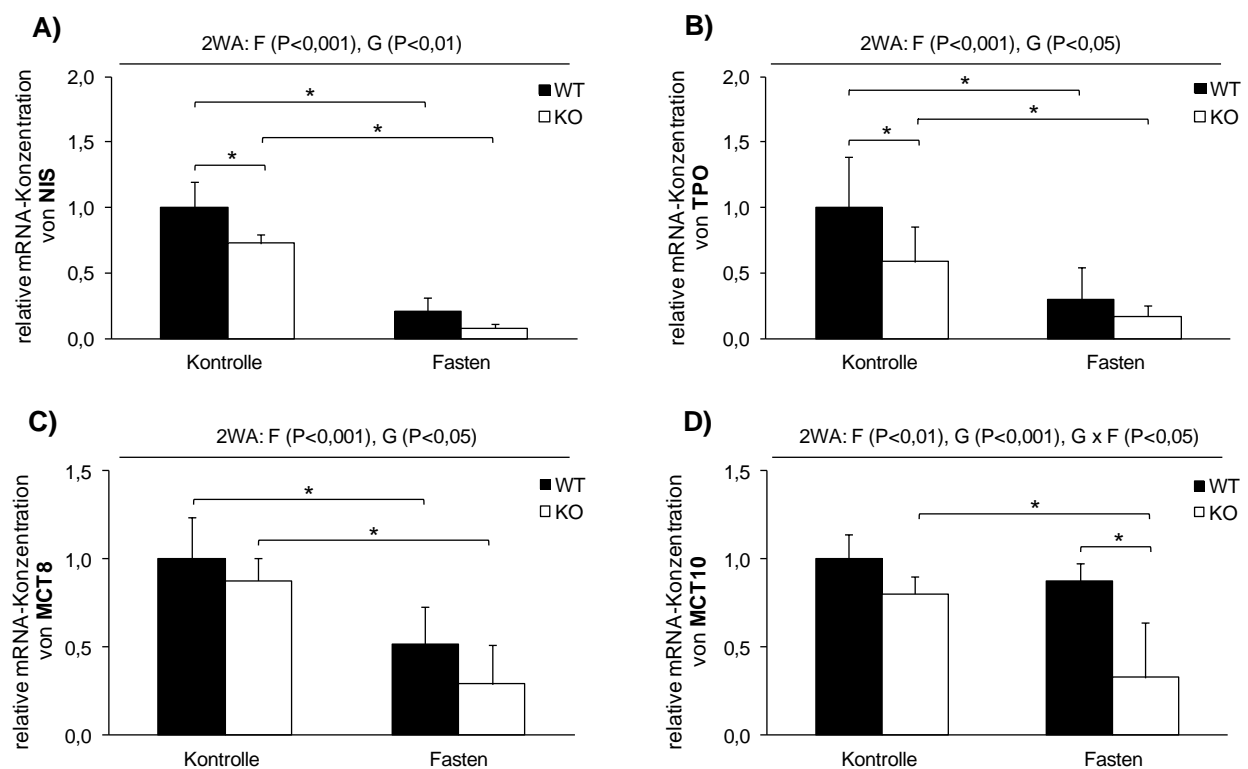


Abb. 23: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Natrium-Iodid-Symporter (NIS), B) Thyreoperoxidase (TPO), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Schilddrüse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=8$).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung diente β -Aktin und Cyclophilin A.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.2.8 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen in der Leber

In der Leber der Mäuse konnte ein Einfluss des Fastens, des Genotyps sowie der Interaktion von Genotyp und Fasten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von FGF21, CAR, UGT1A1, Sult1A1, MCT8 sowie MCT10 beobachtet werden (Abb. 24 A-F).

So zeigte sich infolge des Fastens ein signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Konzentrationen von FGF21 und CAR in der Leber ($P < 0,001$), der bei den WT-Tieren gegenüber den PPAR α -KO-Tieren deutlich stärker ausfiel ($P < 0,001$; Abb. 24 A, B). Zudem waren bei den WT-Tieren signifikant höhere FGF21- und CAR-mRNA-Konzentrationen als bei den PPAR α -KO-Tieren zu erkennen ($P < 0,001$; Abb. 24 A).

Auch bei den relativen mRNA-Konzentrationen von UGT1A1 und Sult1A1 (Abb. 24 C, D) konnte eine fastenbedingte Zunahme in der Leber der Tiere beobachtet werden ($P < 0,001$). Dabei kam es bei den PPAR α -KO-Tieren gegenüber den WT-Tieren infolge des Fastens zu einer stärkeren hepatischen Zunahme der UGT1A1-mRNA-Konzentration ($P < 0,05$; Abb. 24 C). Dagegen zeigte sich bei den gefasteten WT-Tieren ein deutlich stärkerer Anstieg der relativen mRNA-Konzentration von Sult1A1 im Vergleich zu den PPAR α -KO-Tieren ($P < 0,05$; Abb. 24 D). Weiterhin wiesen die WT-Tiere eine signifikant höhere UGT1A1-mRNA-Konzentration in der Leber als die PPAR α -KO-Tiere auf ($P < 0,05$; Abb. 24 C). Gleiches war auch bei der relativen mRNA-Konzentration von Sult1A1 zu beobachten ($P < 0,01$; Abb. 24 D).

Die relativen mRNA-Konzentrationen von MCT8 und MCT10 in der Leber der Mäuse wurden unterschiedlich durch das Fasten beeinflusst (Abb. 24 E, F). So kam es bei den gefasteten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer signifikanten Abnahme der MCT8-mRNA-Konzentration, während die mRNA-Konzentration des MCT10 signifikant anstieg ($P < 0,001$). Dieser Fasteneffekt war bei den PPAR α -KO- gegenüber den WT-Tieren hinsichtlich der relativen mRNA-Konzentrationen von MCT8 ($P < 0,001$) und MCT10 ($P < 0,05$) deutlich stärker ausgeprägt. Weiterhin wiesen die WT-Tiere eine signifikant höhere MCT8-mRNA-Konzentration als die PPAR α -KO-Tiere auf ($P < 0,001$; Abb. 24 E). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den PPAR α -KO-Tieren gegenüber den WT-Tieren eine signifikant höhere MCT10-mRNA-Konzentration ($P < 0,001$; Abb. 24 F).

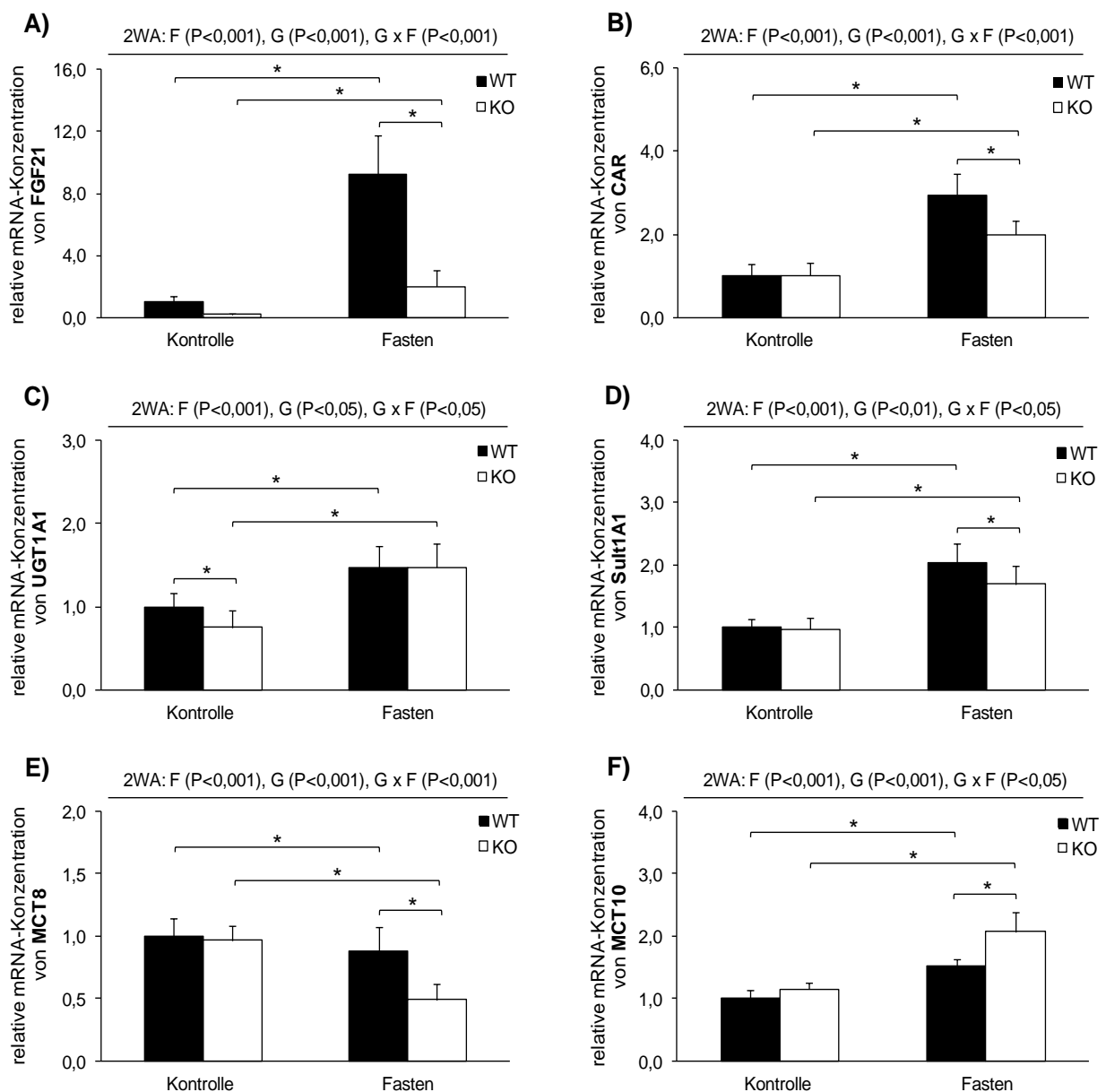


Abb. 24: Relative mRNA-Konzentrationen von A) *fibroblast growth factor* (FGF21), B) konstitutiver Androstan-Rezeptor (CAR), C) UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1), D) Sulfotransferase 1A1 (Sult1A1), E) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und F) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Leber von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 48 h Fasten oder *ad libitum* Fütterung (Kontrolle).

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=16).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung dienten β -Aktin und RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte (P<0,05, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Fasten (F), Genotyp (G), Genotyp x Fasten (G x F).

4.2.3 Orale Applikation von WY 14.643 (*in-vivo*-Versuch 3)

4.2.3.1 Körpergewichtsentwicklung und relatives Lebergewicht

In Abb. 25 ist das über den Behandlungszeitraum erfasste Körpergewicht sowie das zur Probenentnahme ermittelte relative Lebergewicht der Tiere dargestellt. Zu erkennen ist, dass das Körpergewicht der Tiere während der 4-tägigen Versuchsdauer unverändert blieb. Die Gewichtsentwicklung vom ersten bis zum vierten Versuchstag wurde weder durch den Genotyp noch durch die Behandlung beeinflusst (Abb. 25 A).

Bei dem relativen Lebergewicht der Tiere zeigte sich dagegen ein signifikanter Einfluss des Genotyps ($P < 0,01$), der Behandlung ($P < 0,001$) sowie der Interaktion beider Faktoren ($P < 0,001$; Abb. 25 B). So wiesen die WT-Tiere bei *ad libitum* Fütterung ein geringeres relatives Lebergewicht als die PPAR α -KO-Tiere auf. Während die Behandlung der WT-Tiere mit WY 14.643 mit einer Lebergewichtszunahme einherging, blieben die Lebergewichte der PPAR α -KO-Tiere gegenüber denen der Kontrolltiere unverändert. Folglich war bei den WY 14.643-behandelten WT-Tieren im Vergleich zu den WY 14.643-behandelten PPAR α -KO-Tieren ein höheres Lebergewicht zu beobachten (Abb. 25 B).

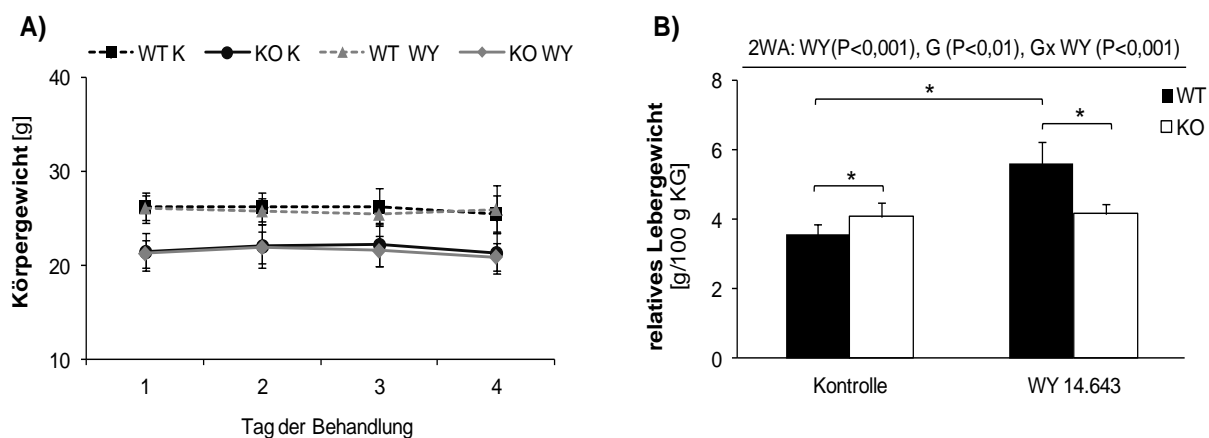


Abb. 25: A) Körpergewichtsentwicklung über die 4-tägige Behandlung der Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäuse mit WY 14.643 (WY)- oder Kontroll (K)-lösung sowie B) das relative Lebergewicht (g/100 g KG) der Tiere zum Ende der Behandlung.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=10$), KG= Körpergewicht.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): WY 14.643 (WY), Genotyp (G), Genotyp x WY 14.643 (G x WY).

4.2.3.2 Konzentration von fT4 im Plasma

In Abb. 26 wird deutlich, dass die WT-Mäuse eine signifikant höhere Konzentration an fT4 im Plasma als die PPAR α -KO-Mäuse aufwiesen ($P < 0,05$). Weiterhin konnte bei den PPAR α -KO-Tieren nach WY 14.643-Behandlung eine signifikant niedrigere Plasma-fT4-Konzentration gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden ($P < 0,05$; Abb. 26).

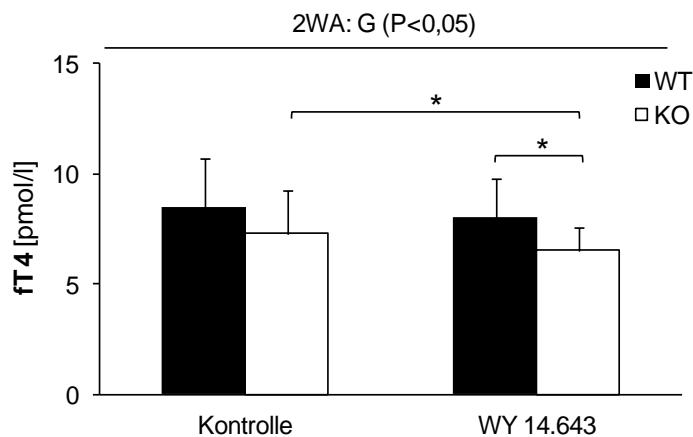


Abb. 26: Konzentration an freiem Thyroxin (fT4) im Plasma von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=10).

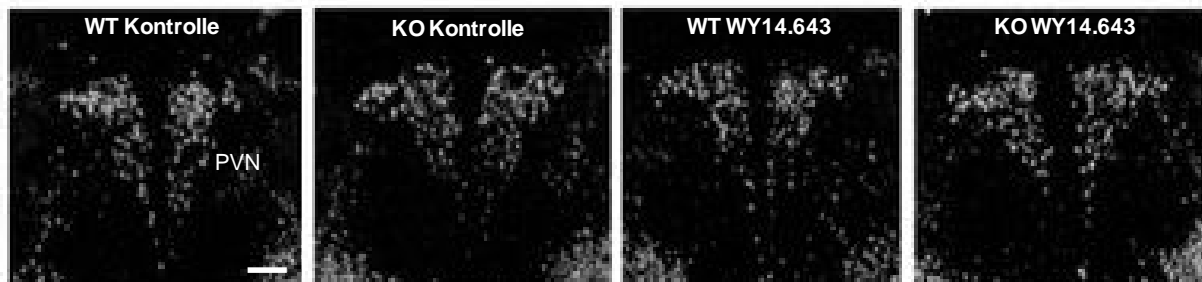
* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Genotyp (G).

4.2.3.3 Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung

In Abb. 27 A und B sind die Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung des PVN des Hypothalamus der Mäuse mit einer radioaktiv markierten TRH-RNA-Sonde dargestellt. Die hellen Bereiche der Dunkelfeldaufnahmen der *in-situ*-Hybridisierung der Gehirnschnitte repräsentieren je nach Intensität und Fläche die TRH-mRNA-Expression (Abb. 27 A). Dabei wurde ausschließlich die TRH-Expression im PVN zur Auswertung genutzt. Der PVN ist der Bereich des Hypothalamus, in dem die TRH-Expression auf Schwankungen des T3 und T4-Spiegels reagiert. Bereits visuell ist zu erkennen, dass die TRH-mRNA-Expression im PVN des Hypothalamus der Tiere weder durch den Genotyp, noch durch die Behandlung mit WY 14.643 beeinflusst wurde. Die Auswertung mit Hilfe des ImageJ-Bildbearbeitungsprogramms bestätigte den visuellen Eindruck. Auch darüber konnte keine unterschiedliche TRH-mRNA-Expression zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden (Abb. 27 B).

A)



B)

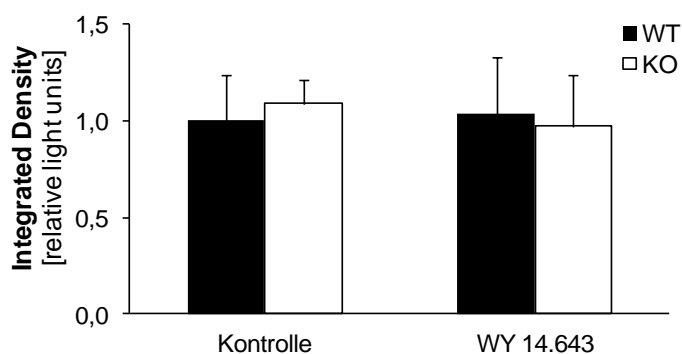


Abb. 27: Relative mRNA-Expression von Thyreoliberin (TRH) im paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus nach 4-tägiger Behandlung von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.

A) Repräsentative Dunkelfeldaufnahmen von Gefrierschnitten des Gehirns (20 μ m) nach *in-situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten TRH-RNA-Sonden. Dargestellt sind die Ausschnitte des Gehirns in dem der PVN liegt (Maßstabsbalken entspricht 200 μ m).

B) Bestimmung der Integrated Density (relative light units) nach Auswertung der Dunkelfeldaufnahmen der *in-situ*-Hybridisierung mittels ImageJ-Bildbearbeitungsprogramms.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=5). Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

4.2.3.4 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen im Hypothalamus

Um die Aktivität des PPAR α im Hypothalamus der Mäuse nach 4-tägiger Behandlung mit dem synthetischen PPAR α -Agonisten WY 14.643 zu überprüfen, wurde die relative mRNA-Konzentration des PPAR α -Zielgens HMGCS2 ermittelt (Abb. 28 A). Dabei wird deutlich, dass die WT-Tiere eine signifikant höhere hypothalamische HMGCS2-mRNA-Konzentration als die PPAR α -KO-Tiere aufwiesen (P<0,001). Zudem kam es bei den gefasteten WT-Tieren gegenüber den WT-Kontrolltieren zu einem 45 %igen Anstieg der HMGCS2-mRNA-Konzentration (P<0,05).

Wie bereits über die *in-situ*-Hybridisierung gezeigt, konnte auch via *realtime* RT-PCR-Analyse kein Unterschied in der relativen TRH-mRNA-Konzentration zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden (Abb. 28 B).

Die relative mRNA-Konzentration von MCT8 im Hypothalamus der Mäuse wurde durch den

Genotyp signifikant beeinflusst ($P < 0,001$). So wiesen die WT-Tiere eine höhere MCT8-mRNA-Konzentration als die PPAR α -KO-Tiere auf (Abb. 28 C).

Dagegen war weder ein Einfluss der WY 14.643-Behandlung, des Genotyps noch der Interaktion beider Faktoren auf die relative mRNA-Konzentration von MCT10 im Hypothalamus der Tiere erkennbar (Abb. 28 D).

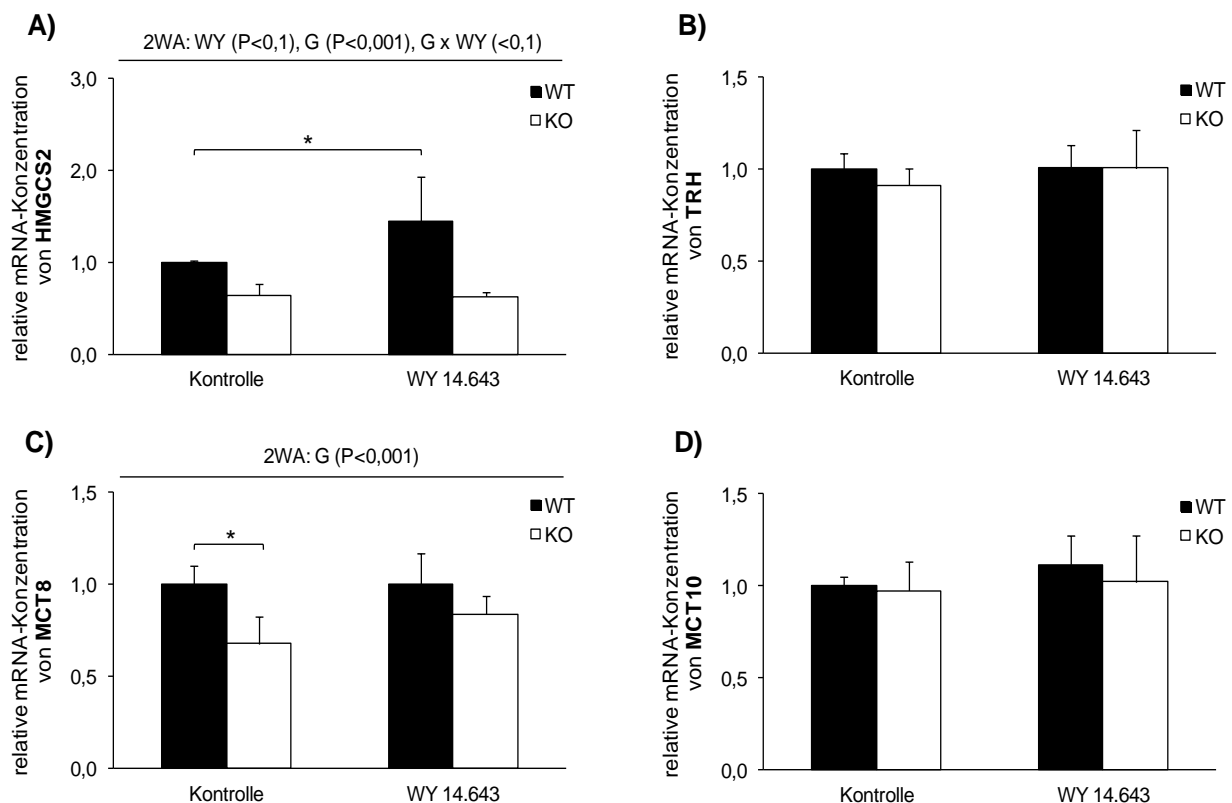


Abb. 28: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2 (HMGCS2), B) Thyreoliberin (TRH), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) im Hypothalamus von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n=5).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung dienten β -Aktin und RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): WY 14.643 (WY), Genotyp (G), Genotyp x WY 14.643 (G x WY).

4.2.3.5 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen in der Hypophyse

Die relative mRNA-Konzentration der HMGCS2 unterlag in der Hypophyse der Mäuse dem Einfluss des Genotyps, der Behandlung sowie der Interaktion beider Faktoren (Abb. 29 A). So wiesen die WT-Tiere eine signifikant höhere HMGCS2-mRNA-Konzentration in der Hypophyse als die PPAR α -KO-Tiere auf ($P < 0,001$). Infolge der WY 14.643-Behandlung konnte bei den WT-Tieren ein etwa 20 %iger Anstieg der HMGCS2-mRNA-Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden ($P < 0,05$). Dagegen blieb die relative

mRNA-Konzentration der HMGCS2 der WY 14.643-behandelten PPAR α -KO-Tiere gegenüber der PPAR α -KO-Kontrolltiere unverändert (Abb. 29 A).

In Abb. 29 B ist zu erkennen, dass die relative mRNA-Konzentration von TSH β durch den Genotyp beeinflusst wurde. Dabei war bei den WT- gegenüber den PPAR α -KO-Tieren infolge der Behandlung mit WY 14.643 eine signifikant höhere TSH β -mRNA-Konzentration erkennbar ($P < 0,05$). Zudem wiesen die WY 14.643-behandelten PPAR α -KO-Tiere eine geringere TSH β -mRNA-Konzentration als die entsprechenden Kontrolltiere auf ($P < 0,05$; Abb. 29 B).

Bei den relativen mRNA-Konzentrationen von MCT8 und MCT10 in der Hypophyse der Tiere konnten dagegen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden (Abb. 29 C, D).

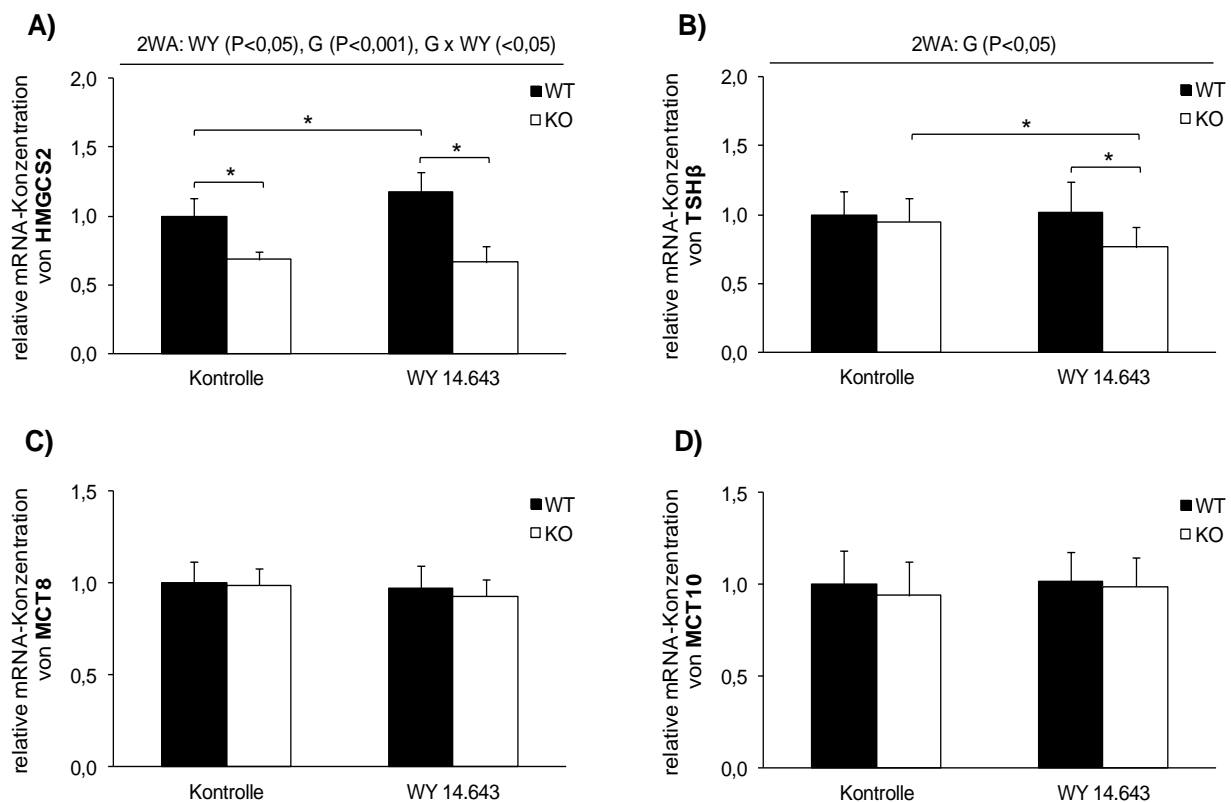


Abb. 29: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Hydroxy-methyl-glutaryl-CoenzymA-Synthase 2 (HMGCS2), B) β -Untereinheit des Thyreotropins (TSH β), C) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und D) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Hypophyse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=10$).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung dienten β -Aktin und RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): WY 14.643 (WY), Genotyp (G), Genotyp x WY 14.643 (G x WY).

4.2.3.6 Ergebnisse der *realtime* RT-PCR-Analysen in der Schilddrüse

Wie in Abb. 30 A-C ersichtlich ist, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen des NIS und der beiden Monocarboxylat-Transporter MCT8 und MCT10 in der Schilddrüse der Mäuse durch den Genotyp beeinflusst. Die NIS-mRNA-Konzentration war bei den WT-Tieren im Vergleich zu den PPAR α -KO-Tieren erhöht ($P < 0,05$). Zudem kam es in der Schilddrüse der WY 14.643-behandelten PPAR α -KO- gegenüber den Kontrolltieren zu einer signifikanten Abnahme der relativen NIS-mRNA-Konzentration ($P < 0,05$; Abb. 30 A). Dagegen wiesen die WT-Tiere unabhängig von der Behandlung signifikant geringere thyreoidale mRNA-Konzentrationen an MCT8 und MCT10 als die PPAR α -KO-Tiere auf ($P < 0,001$; Abb. 30 B, C).

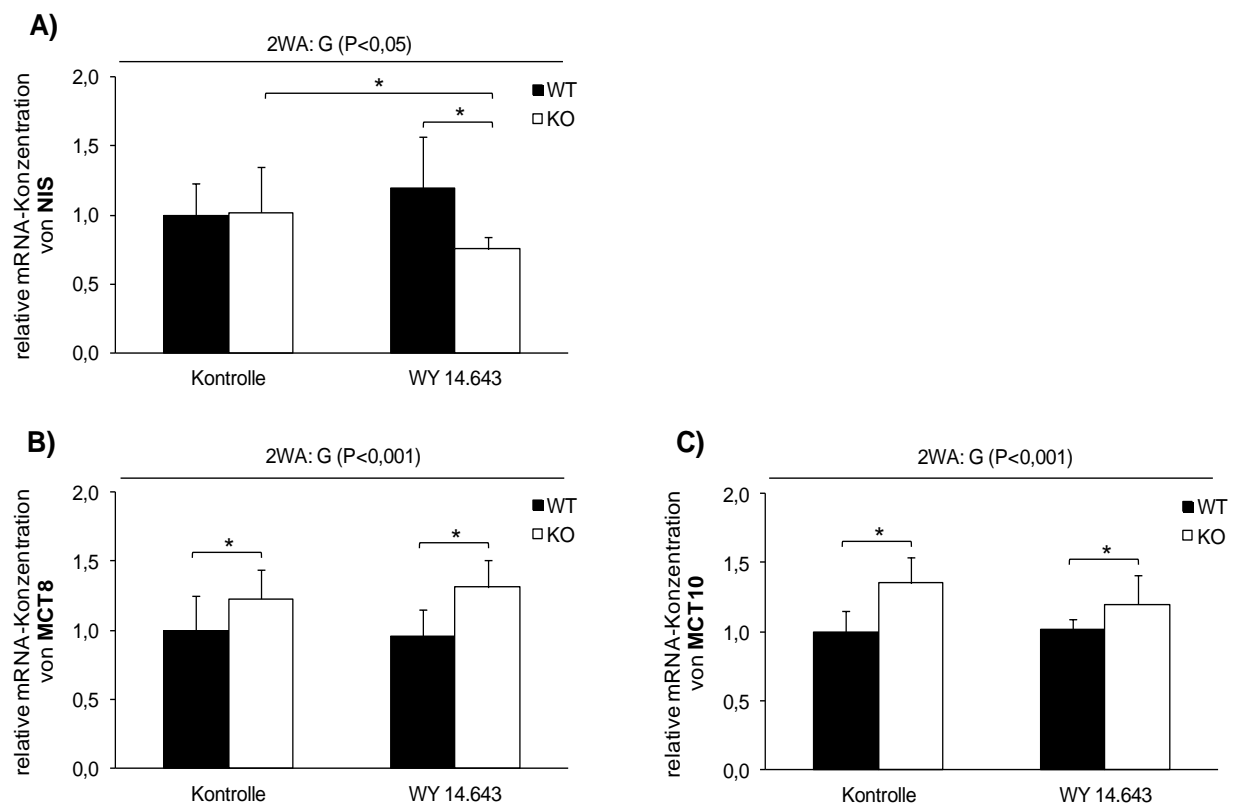


Abb. 30: Relative mRNA-Konzentrationen von A) Natrium-Iodid-Symporter (NIS), B) Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) und C) Monocarboxylat-Transporter 10 (MCT10) in der Schilddrüse von Wildtyp (WT)- und PPAR α -knockout (KO)-Mäusen nach 4-tägiger Behandlung mit WY 14.643- oder Kontrolllösung.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n=10$).

Die WT-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung dienten Cyclophilin A und RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$, Fisher-LSD-Test).

Two-way ANOVA (2WA): Genotyp (G).

4.3 Ergebnisse der Humanstudien

4.3.1 24 h-mRNA-Expressionsprofile von PPAR α und BMAL1 in Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen

Für die in Abb. 31 dargestellte Heatmap wurden die 24 h-mRNA-Expressionsprofile von PPAR α und BMAL1 der Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen auf Korrelationen geprüft. Die sich daraus ergebenden Korrelationskoeffizienten sind als farbliche Felder dargelegt. Die Farbintensitäten reichen von rot (Korrelationskoeffizient -1) bis weiß (Korrelationskoeffizient +1).

Zu erkennen ist, dass sich nicht-fastende Frauen in ihrem 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil von nicht-fastenden und fastenden Männern unterscheiden. Weiterhin zeigte sich, dass Fasten eine Veränderung im 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil der Frauen bedingt. Demzufolge wiesen die fastenden Frauen ein ähnliches Tages-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil wie die nicht-fastenden und fastenden Männer auf. Im Gegensatz zu den Frauen blieb das 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil der Männer infolge des Fastens unverändert.

Das Tages-mRNA-Expressionsprofil von BMAL1 in Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen glich dem des PPAR α (Abb. 31). So konnte bei den nicht-fastenden Frauen gegenüber den fasten Frauen und den Männern ein unterschiedliches BMAL1-mRNA-Expressionprofil beobachtet werden.

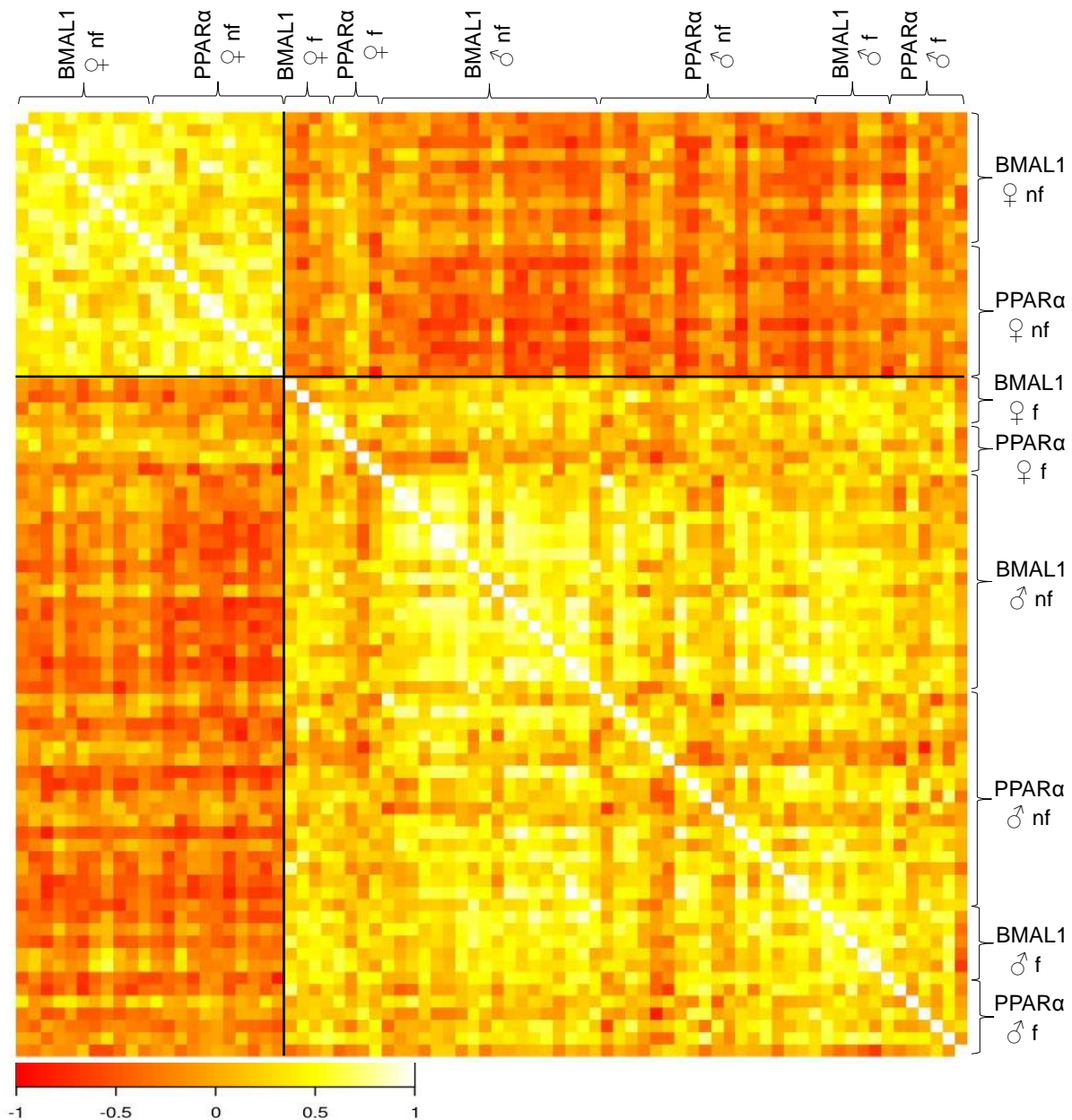


Abb. 31: In der Heatmap sind die Spearman-Korrelationskoeffizienten der 24 h-mRNA-Expressionsprofile von BMAL1 und PPAR α in Monozyten nicht-fastender (nf) und fastender (f) Männer (♂) und Frauen (♀) dargestellt. Die PPAR α - und BMAL1-mRNA-Expressionen wurden über *realtime* RT-PCR bestimmt. Das mRNA-Expressionsprofil jedes Gens von jedem Probanden besteht aus 12 Werten pro Tag. Zur Normalisierung diente RPLP0. Jedes Heatmap-Feld stellt farblich die Korrelationskoeffizienten des paarweisen Vergleichs der mRNA-Expressionsprofile dar. Die Farbintensitäten reichen von rot (Korrelationskoeffizient -1) bis weiß (Korrelationskoeffizient +1). Permutationstest: PPAR α : ♀ nf vs. ♂ nf ($P < 0,01$), ♀ nf vs. ♂ f ($P < 0,01$), ♀ nf vs. ♀ f ($P < 0,05$); BMAL1: ♀ nf vs. ♂ nf ($P < 0,01$), ♀ nf vs. ♂ f ($P < 0,01$), ♀ nf vs. ♀ f ($P < 0,01$).

4.3.2 Unterschiede in den Nacht/Tag-mRNA-Expressionen von PPAR α und BMAL1 in Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen

Um Aussagen über Veränderungen der Tag- und Nacht-mRNA-Expressionen von PPAR α und BMAL1 in den Monozyten der Probanden treffen zu können, wurden die mRNA-Expressionsprofile beider Gene von 1 bis 7 Uhr (definiert als Nacht) sowie von 9 bis 23 Uhr

(definiert als Tag) bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Unterschiede in den 24 h-mRNA-Expressionsprofilen von PPAR α und BMAL1 zwischen den nicht-fastenden Frauen und den fastenden Frauen und Männern auch in der Veränderung der Tag- und Nacht-mRNA-Expressionen der beiden Gene widerspiegelt (Abb. 32 A, B). So waren die mRNA-Expressionen von PPAR α (Abb. 32 A) und BMAL1 (Abb. 32 B) der nicht-fastenden Frauen in der Nacht im Vergleich zum Tag erhöht, während die der fastenden Frauen sowie der nicht-fastenden und fastenden Männer in der Nacht abnahm ($P < 0,05$).

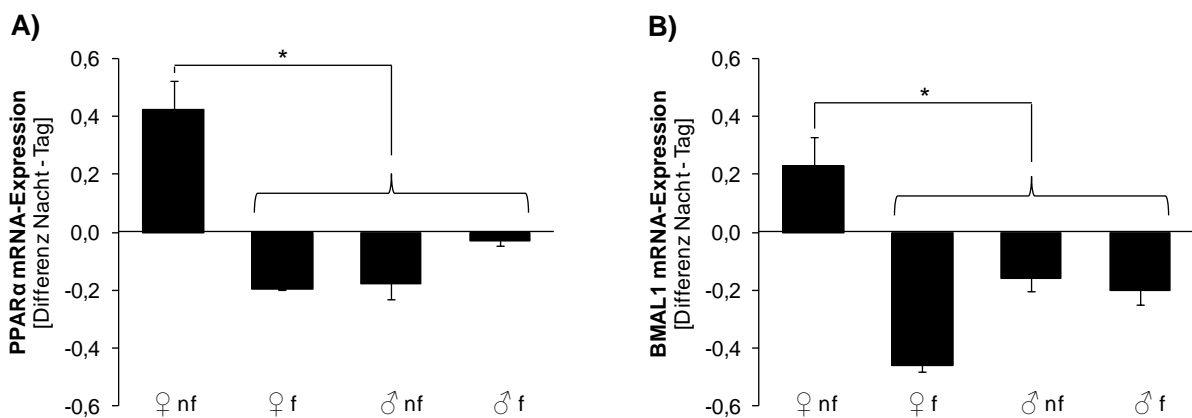


Abb. 32: Veränderung der Nacht-mRNA-Expressionsprofile (1.00-7.00 Uhr) von A) PPAR α und B) BMAL1 relativ zu den Tages-mRNA-Expressionsprofilen (9.00-23.00 Uhr) nicht-fastender (nf) und fastender (f) Männer (♂) und Frauen (♀).

Die Tages-mRNA-Expressionsprofile wurden 0 gesetzt. Die Nacht-mRNA-Expressionsprofile sind als Balken dargestellt, die relativ zur Nulllinie positiv oder negativ verändert sein können.

Zur Normalisierung diente RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$; Permutationstest).

4.3.3 Unterschiede in der Nacht/Tag-Protein-Expression von PPAR α in Monozyten nicht-fastender und fastender Männer und Frauen

In Abb. 33 ist die Tag- und Nacht-Veränderung des Protein-Expressionsprofils von PPAR α dargestellt. Dazu wurde das PPAR α -Protein-Expressionsprofil der Probanden von 1 bis 7 Uhr (Nacht) beziehungsweise von 9 bis 23 Uhr (Tag) verglichen. Es zeigte sich, dass sich das PPAR α -Protein-Expressionsprofil der nicht-fastenden Frauen, ebenso wie das PPAR α -mRNA-Expressionsprofil, von den 3 anderen Gruppen signifikant unterscheidet ($P < 0,05$). So war bei den nicht-fastenden Frauen in der Nacht eine Zunahme, bei den fastenden Frauen und den Männern dagegen eine Abnahme der PPAR α -Protein-Expression im Vergleich zum Tag zu beobachten (Abb. 33).

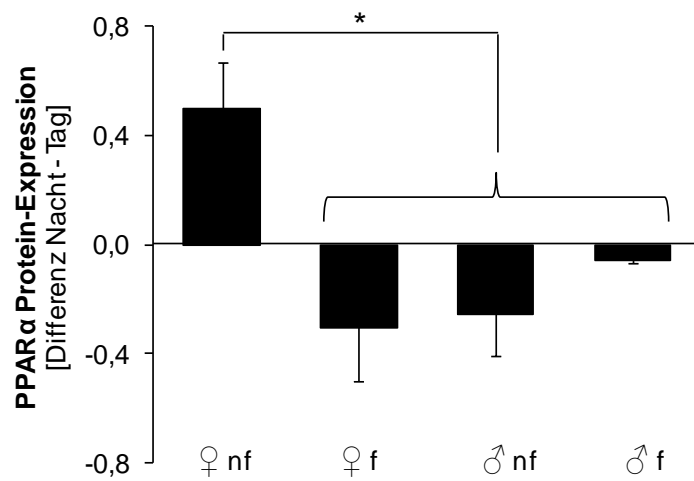


Abb. 33: Veränderung des Nacht-Protein-Expressionsprofils (1.00-7.00 Uhr) von PPAR α relativ zum Tages-mRNA-Expressionsprofil (9.00-23.00 Uhr) nicht-fastender (nf) und fastender (f) Männer (♂) und Frauen (♀).

Die Tages-Protein-Expressionsprofile wurden 0 gesetzt. Die Nacht-Protein-Expressionsprofile sind als Balken dargestellt, die relativ zur Nulllinie positiv oder negativ verändert sein können.

Zur Normalisierung diente RPLP0.

* kennzeichnet signifikant unterschiedliche Werte ($P < 0,05$; Permutationstest).

5. Diskussion

5.1 Bedeutung des PPAR α für die fastenbedingten Veränderungen des Schilddrüsenhormonstoffwechsels

PPAR α ist bekannt für seine Rolle in der Anpassung des Stoffwechsels an das Fasten. Fasten geht mit einer Herunterregulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises einher, die in eine Abnahme der Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma resultiert und einen Energiesparmechanismus darstellt (Boelen *et al.*, 2008). Eine Studie von König *et al.* (2009) konnte anhand klassischer PPAR α -Zielgene die Stimulierbarkeit von PPAR α in der Hypophyse und anderen Bereichen des Gehirns infolge des Fastens belegen. Inwieweit jedoch diese PPAR α -Aktivierung an den zahlreichen fastenbedingten Veränderungen des Schilddrüsenhormonstoffwechsels beteiligt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuche geklärt werden.

5.1.1 Einfluss einer PPAR α -Aktivierung durch synthetische und natürliche PPAR α -Agonisten auf die TSH-mRNA-Expression

Eine Studie von Boelen *et al.* (2006) belegte, dass die mRNA-Expression von TSH β während des Fastens unabhängig vom TRH sinkt. Um herauszufinden, ob dabei möglicherweise PPAR α eine Rolle spielt, wurden im Rahmen dieser Arbeit erste *in-vitro*-Versuche mit T α T1-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine thyreotrope Zelllinie des Pars distalis der Adenohypophyse, die aus Hypophysentumoren transgener Mäuse etabliert wurde (Yusta *et al.*, 1998). Neben dem für die TSH β -Expression bedeutsamen *pituitary transcription factor 1* (Pit-1) (Miyai *et al.*, 2005) exprimieren die T α T1-Zellen die Schilddrüsenhormonrezeptoren TR β 1 und TR β 2. Bei der Behandlung mit T3 reagieren die T α T1-Zellen mit einer zeit- und dosisabhängigen Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration. Zudem wurde in dieser Zelllinie DIO2 sowie RXR, ein Heterodimerisierungspartner von PPAR α und den Schilddrüsenhormonrezeptoren, nachgewiesen (Yusta *et al.*, 1998; Christoffolete *et al.*, 2006). Diese charakteristischen Merkmale machen die T α T1-Zellen zu einem geeigneten thyreotropen Zellmodell, um den Effekt einer PPAR α -Aktivierung auf die relative mRNA-Konzentration von TSH β und auf verschiedene Einflussfaktoren der TSH-Synthese und -Sekretion zu untersuchen.

Nach Inkubation der Zellen mit den synthetischen PPAR α -Agonisten Ciprofibrat und WY 14.643 sowie mit den natürlichen PPAR α -Agonisten 9(S)-HODE, 8(S)-HETE und

Ölsäure wurden die mRNA-Konzentrationen klassischer PPAR α -Zielgene CPT1, CACT und LCAD bestimmt. Die LCAD ist ein Enzym der mitochondrialen β -Oxidation, während CPT1 und CACT am Transport aktivierter FS zur β -Oxidation in die Mitochondrien beteiligt sind. CPT1 und CACT weisen im Promotor beziehungsweise im 5' untranslatierten Bereich funktionelle PPREs auf (Mandard *et al.*, 2004; Gutgesell *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010). Der beobachtete Anstieg der mRNA-Konzentrationen von CPT1, CACT und LCAD nach Behandlung der Zellen mit den PPAR α -Agonisten diente als indirekter Nachweis, dass sich PPAR α in der T α T1-Zelllinie aktivieren lässt. Gleichzeitig war in den Zellen eine signifikante Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration infolge der Inkubation mit den synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PPAR α an der Regulation der TSH β -mRNA-Expression beteiligt ist.

Die TSH β -Expression und -Sekretion wird von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel dem TR β 2, dem RXR α sowie dem Neuromedin B beeinflusst. Der Schilddrüsenhormonrezeptor TR β 2 wird hauptsächlich in den thyreotropen Zellen der Hypophyse und in TRH-Neuronen des PVN des Hypothalamus exprimiert (Hodin *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1991; Lechan *et al.*, 1994) und ist an der negativen Feedbackregulation des T3 auf die TRH- und TSH-Expression beteiligt (Abel *et al.*, 2001; Nakagano *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011). RXR α vermittelt die Bindung des PPAR α und der TRs an die *response elements* der DNA und führt so zur Hemmung oder Stimulation der Transkription entsprechender Zielgene. Sharma *et al.* (2006) konnten bereits anhand von T α T1-Zellen zeigen, dass eine Stimulierung von RXR eine Abnahme der TSH β -mRNA-Expression bedingt. In der vorliegenden Arbeit blieb die relative mRNA-Konzentration des TR β 2 sowie des RXR α nach Inkubation der T α T1-Zellen mit synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten unverändert. Somit scheint der beobachtete Effekt der PPAR α -Agonisten auf die TSH-mRNA-Konzentration nicht auf Veränderungen der TR β 2- und RXR α -Expression zu beruhen. Auch hinsichtlich der relativen mRNA-Konzentration von Neuromedin B, einem autokrinen und parakrinen Inhibitor der TSH-Sekretion (Oliveira *et al.*, 2006), waren keine Unterschiede zwischen den mit PPAR α -Agonisten behandelten T α T1-Zellen und den Kontrollzellen feststellbar.

Anhand der T α T1-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass eine PPAR α -Aktivierung mit einer Hemmung der TSH β -mRNA-Expression einhergeht. Daraufhin sollte untersucht werden, ob TSH β möglicherweise ein direktes Zielgen von PPAR α darstellt. Die transkriptionelle Kontrolle von Genen durch PPAR α erfolgt über die Bindung des aktivierten PPAR α /RXR α -Rezeptorkomplexes an PPRE-Motive in der proximalen oder distalen Promotorregion der PPAR α -Zielgene (Qui *et al.*, 2000; Tan *et al.* 2005). Das ideale PPRE-Motiv besteht aus einer

direkten Wiederholung der Konsensussequenz AGGTCA, welche durch ein einzelnes Nukleotid getrennt ist (Palmer *et al.*, 1995). Mit Hilfe der NUBIScan Software können solche putativen PPREs in der Promotorregion genomischer Sequenzen identifiziert werden (Podvinec *et al.*, 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NUBIScan-Analysen der 5'-flankierenden Region des TSH β -Gens der Maus ergaben 3 putative PPREs in der Position -553 bis -565, -4 bis -16 sowie +381 bis +393 relativ zum Transkriptionsstart des TSH β -Gens (NCBI GenBank: NC000069.5). Die anschließenden TSH β -Promotoraktivitätsstudien erfolgten an HepG2-Zellen, da diese Zelllinie üblicherweise für transiente Transfektionsassays genutzt wird (Kast-Woelberg *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse der TSH β -Promotoraktivitätsanalysen weisen jedoch darauf hin, dass die in den T α T1-Zellen beobachtete Verminderung der TSH β -mRNA-Konzentration infolge einer PPAR α -Aktivierung nicht auf der transkriptionellen Kontrolle der ausgewählten 5'-flankierenden Region des murinen TSH β -Gens durch PPAR α beruht. Lefterova *et al.* (2008) konnten belegen, dass etwa 7 % aller PPAR γ *response elements* in proximalen Regionen weit über 1 kb vom Transkriptionsstart entfernt liegen. Auch Rakhshandehroo *et al.* (2007) identifizierten PPREs in Regionen bis zu 10 kb vom Transkriptionsstartpunkt entfernt. Daher besteht die Möglichkeit, dass auch im TSH-Gen funktionelle PPREs distal von der für die Reporterexperimente in dieser Arbeit gewählten Regionen lokalisiert sind. Die NUBIScan-Analyse gab bereits Hinweise auf weitere proximale PPREs im TSH β -Promotor.

Eine weitere mögliche Ursache für die ausbleibenden Effekte der TSH β -Promotoraktivitätsstudien könnte die für die transiente Transfektion verwendete HepG2-Zelllinie darstellen. Aus der Literatur ist bekannt, dass an der Transkriptionsregulation von TSH β verschiedene Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel der Pit-1 und GATA-2 beteiligt sind (Gordon *et al.*, 1997). Pit-1 kommt ausschließlich in somatotropen, laktotropen und thyreotropen Zellen der Adenohypophyse vor (Bodner *et al.*, 1988; Ingraham *et al.*, 1988). Yusta *et al.* (1998) konnten nachweisen, dass T α T1-Zellen Pit-1 exprimieren. Allerdings ist bislang noch unbekannt, ob T α T1-Zellen aufgrund ihrer spezifischen Kultivierungsanforderungen für die Transfektion geeignet sind. Daher sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um herauszufinden, ob eine Transfektion in T α T1-Zellen möglich ist.

Die Stimulierung der Transkription von PPAR α -Zielgenen über die Bindung des PPAR α an PPRE-Sequenzen wurde hinreichend untersucht (Schoonjans *et al.*, 1996b). Über die negative Regulation der Genexpression durch den PPAR α ist bis dato jedoch nur sehr wenig bekannt. Einige Studien konnten bereits eine verminderte Expression von Genen infolge einer PPAR α -Aktivierung belegen (Edgar *et al.*, 1998; Delerive *et al.*, 1999; Marrapodi und Chiang, 2000).

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden bislang jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass bei der negativen transkriptionellen Regulation der PPAR α -Zielgene Corepressoren eine Rolle spielen. Zu den bekannten PPAR α -Corepressoren gehören Rev-erb α , Ncor und SMRT (Vu-Dac *et al.*, 1998; Dowell *et al.*, 1999; Hu und Lazar, 1999). Vu-Dac *et al.* (1998) zeigten anhand von Ratten, dass der PPAR α -Agonist Ciprofibrat eine gesteigerte Transkription des Corepressors Rev-erb α bedingt, was wiederum in einer Abnahme der ApoAI-Expression resultiert. Um eine mögliche Beteiligung von Corepressoren an der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration aufzuklären, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen vom Rev-erb α , Ncor1 und SMRT nach Behandlung von T α T1-Zellen mit synthetischen PPAR α -Agonisten bestimmt. Die mRNA-Konzentration aller untersuchten Corepressoren wurde jedoch weder durch die WY 14.643- noch durch die Ciprofibrat-Inkubationen beeinflusst. Demzufolge lässt sich die PPAR α -vermittelte Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration nicht direkt auf eine Hochregulation der PPAR α -Corepressoren zurückführen.

Ergebnisse aus Zellkultur-Versuchen sind nur bedingt auf einen gesamten Organismus übertragbar, da es sich dabei um isolierte Systeme handelt. Inwieweit sich der *in-vitro* beobachtete Effekt des PPAR α auf die TSH β -mRNA-Expression auch *in-vivo* widerspiegelt, sollte anhand von WT- und PPAR α -KO-Mäusen überprüft werden. Dazu wurden die Tiere in Versuch 1 und Versuch 2 über einen Zeitraum von 48 h gefastet. In beiden Versuchen nahm das Körpergewicht der Tiere infolge des Fastens ab, was sich auf eine Mobilisierung von Glykogen- und Fettdepots zurückführen lässt (Yang *et al.*, 1990). Trotz Abnahme des Körpergewichts war bei den PPAR α -KO-Tieren unter Fastenbedingungen eine signifikante Zunahme des relativen Lebergewichts zu beobachten. Ursächlich dafür ist die gestörte β -Oxidation der PPAR α -KO-Tiere und die damit verbundene verstärkte Akkumulation von Fett in der Leber dieser Tiere (Kersten *et al.*, 1999; Leone *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000). Der beobachtete Anstieg des Lebergewichts der gefasteten PPAR α -KO-Tiere gegenüber der PPAR α -KO-Kontrolltiere macht deutlich, dass sich der PPAR α -Mangel erst während des Fastens manifestiert. Dies macht die PPAR α -KO-Maus zu einem geeigneten *in-vivo*-Modell, um eine mögliche Beteiligung des PPAR α an der fastenbedingten Abnahme der mRNA-Expression von TSH β zu untersuchen.

In den *in-vitro*-Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine PPAR α -Stimulierung mit natürlichen PPAR α -Agonisten, wie zum Beispiel der Ölsäure, in einer Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration resultiert. Fasten geht mit einer gesteigerten Lipolyse im Fettgewebe

einher, die mit einer Zunahme an freien Fettsäuren im Plasma verbunden ist (Kersten *et al.*, 1999). Auch in den beiden Fastenversuchen konnte ein Konzentrationsanstieg an freien Fettsäuren im Plasma der gefasteten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Um herauszufinden, inwieweit die erhöhten Konzentrationen an freien Fettsäuren im Plasma eine PPAR α -Aktivierung in der Hypophyse bedingen, wurde die relative mRNA-Konzentration des PPAR α -Zielgens HMGCS2 in der Hypophyse der Tiere ermittelt (*in-vivo*-Versuch 1). Infolge des Fastens war eine Zunahme der relativen mRNA-Konzentration der HMGCS2 in der Hypophyse der Tiere zu beobachten. Dabei wiesen die gefasteten PPAR α -KO-Tiere eine deutlich geringere hypophysäre HMGCS2-mRNA-Konzentration als die gefasteten WT-Tiere auf. Gleiches zeigte sich auch in einer Studie von König *et al.* (2009). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass PPAR α während des Fastens in der Hypophyse der WT-Tiere aktiv ist. Demzufolge eignet sich das gewählte Versuchsdesign, um die Bedeutung des PPAR α für die Regulation der TSH-Synthese *in-vivo* zu untersuchen.

Im *in-vivo*-Versuch 1 und 2 der vorliegenden Arbeit hatte das Fasten, wie bereits in der Literatur beschrieben, eine signifikante Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration in der Hypophyse der Tiere zur Folge. Da PPAR α einen Masterregulator während des Fastens darstellt und nachweislich in der Hypophyse stimulierbar ist, wurde angenommen, dass PPAR α bei der fastenbedingten Herunterregulation der TSH β -Expression eine wesentliche Rolle spielt. Die Daten der durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen bekräftigten diese Hypothese. Jedoch war, entgegen der Hypothese und der Ergebnisse der Zellkulturstudien, unter Fastenbedingungen bei den PPAR α -KO-Tieren gegenüber den WT-Tieren eine deutlich stärkere Abnahme der hypophysären TSH β -mRNA-Konzentration zu beobachten (*in-vivo*-Versuch 1). Die relative mRNA-Konzentration der TSH α -Untereinheit wies dieselben Veränderungen hinsichtlich des Fastens und des Genotyps wie die der TSH β -Untereinheit auf. Während die β -Untereinheit spezifisch für das TSH ist, fungiert die α -Untereinheit als gemeinsamer Heterodimerisierungspartner von TSH, LH und FSH (Wood *et al.*, 1999). Somit könnte auch die mRNA-Expression anderer Glykoprotein hormone der Hypophyse auf ähnliche Weise wie das TSH durch den Genotyp und das Fasten beeinflusst worden sein. Im *in-vivo*-Versuch 2 wiesen die PPAR α -KO-Tiere nicht nur unter Fasten-, sondern auch unter Kontrollbedingungen eine signifikant geringere TSH β -mRNA-Konzentration in der Hypophyse als die WT-Tiere auf. Gleiches konnte in der Studie von König *et al.* (2009) beobachtet werden. PPAR α wird neben den im Fastenzustand lipolytisch freigesetzten Fettsäuren ebenso durch Fettsäuren aus der Nahrung aktiviert (Kersten *et al.*, 1999; Kersten *et al.*, 2000; Jump *et al.*, 2005). Somit scheint eine Fettsäure-induzierte PPAR α -Aktivierung

direkt oder indirekt Einfluss auf die TSH β -Expression zu nehmen. Allerdings deuten die *in-vivo*- im Gegensatz zu den *in-vitro*-Daten eher darauf hin, dass PPAR α der fastenbedingten Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration entgegenwirkt.

Um den kontroversen Ergebnissen der Zellkultur- und Mausstudien (*in-vivo*-Versuch 1 und 2) auf den Grund zu gehen, wurde im *in-vivo*-Versuch 3 die TSH β -mRNA-Konzentration in der Hypophyse der WT- und PPAR α -KO-Mäuse nach 4-tägiger oraler Verabreichung des synthetischen PPAR α -Agonisten WY 14.643 via Schlundsonde bestimmt. Über die gesamte Versuchsdauer traten keine Veränderungen des Körpergewichts der Tiere auf. Dagegen konnte infolge der oralen Gabe von WY 14.643 eine Erhöhung des relativen Lebergewichts der WT-Tiere, nicht jedoch der PPAR α -KO-Tiere, beobachtet werden, was sich auf eine PPAR α -Aktivierung zurückführen lässt. Als Folge einer Liganden-induzierten PPAR α -Aktivierung kommt es zu einer Peroxisomenproliferation in der Leber, die in einer Hyperplasie und Hypertrophie der Hepatozyten resultiert und damit eine Erhöhung des relativen Lebergewichts der WT-Tiere bedingt (Rao und Reddy, 1987; Takagi *et al.*, 1992; Bentley *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995). Dass die orale Applikation von WY 14.643 auch zu einer PPAR α -Aktivierung in der Hypophyse führt, konnte anhand des PPAR α -Zielgens HMGCS2 nachgewiesen werden. So kam es ausschließlich bei den mit WY 14.643 behandelten WT-Tieren gegenüber den Kontrolltieren zu einem Anstieg der HMGCS2 in der Hypophyse. Auch Cullingford *et al.* (2002) konnten anhand klassischer PPAR α -Zielgene zeigen, dass eine Behandlung von Ratten mit synthetischen PPAR α -Agonisten eine Stimulierung des PPAR α im Gehirn bewirkt. Hinsichtlich der hypophysären TSH β -mRNA-Konzentration war im Rahmen dieser Arbeit nach oraler Applikation von WY 14.643 bei den PPAR α -KO-Tieren eine Abnahme, bei den WT-Tieren dagegen keine Veränderung feststellbar. Diese Daten deuten gegenüber den Zellkultur-Studien eher darauf hin, dass PPAR α keinen direkten Einfluss auf die TSH β -mRNA-Expression nimmt. Im lebenden Organismus sind allerdings im Gegensatz zur Zellkultur als isoliertes System zahlreiche neuronale und periphere Einflussfaktoren an der Regulation der TSH-Synthese beteiligt, welche die eklatanten Unterschiede zwischen den *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten erklären könnten.

5.1.2 Bedeutung des PPAR α für die Expression neuronaler und peripherer Einflussfaktoren der TSH-Synthese und-Sekretion

Das im PVN des Hypothalamus gebildete TRH stellt bei ausreichender Energiezufuhr einen der wichtigsten neuronalen Regulatoren der TSH-Synthese dar. Die Ergebnisse einer früheren

Studie lassen jedoch vermuten, dass TRH unter Fastenbedingungen eher eine untergeordnete Rolle in der Regulation der TSH-Synthese spielt (Boelen *et al.*, 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit scheint TRH keinen Einfluss auf die fastenbedingten Veränderungen der TSH-Expression zu nehmen, da in beiden Fastenversuchen die TRH-mRNA-Konzentration im Hypothalamus unverändert blieb. Auch Harris *et al.* (1978) konnten nach 48-stündigem Fasten keine Veränderung in der TRH-Expression im Hypothalamus von Ratten beobachten. Andere Studien an Ratten zeigten hingegen, dass Fasten über 65 h und 72 h eine Abnahme der TRH-mRNA-Konzentration im Hypothalamus bedingt (van Haasteren *et al.*, 1995; Legradi *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 2004). Daher lässt sich vermuten, dass die kontroversen TRH-Daten auf den unterschiedlich gewählten Fastenzeiträumen beruhen.

Im *in-vivo*-Versuch 3 konnte nach oraler Applikation von WY 14.643 anhand des PPAR α -Zielgens HMGCS2 eine PPAR α -Aktivierung im Hypothalamus der WT-Tiere nachgewiesen werden. Allerdings war auch in diesem *in-vivo*-Versuch keine unterschiedliche TRH-mRNA-Konzentration im Hypothalamus der mit WY 14.643 behandelten Tiere und der Kontrolltiere zu beobachten. Folglich scheint PPAR α keinen Einfluss auf die TRH-Synthese zu nehmen.

Die TRH-Synthese im PVN des Hypothalamus unterliegt einer indirekten und direkten Regulation des Leptins (Ghamari-Langroudi *et al.*, 2010; siehe Abb. 34). Vorhergehende Studien belegen, dass der im Fastenzustand beobachtete verminderte Leptinspiegel im Plasma mit einer Abnahme der TRH-Expression im Hypothalamus einhergeht (Ahima *et al.*, 1996; Legradi *et al.*, 1997). Auch im Rahmen dieser Arbeit war unabhängig vom Genotyp eine fastenbedingte Abnahme der Leptinkonzentration im Plasma zu beobachten (*in-vivo*-Versuch 2). Leptin ist ein von Adipozyten gebildetes Hormon, das im Hypothalamus die POMC-mRNA-Expression stimuliert, während es inhibierend auf die DIO2- und NPY-mRNA-Expressionen wirkt (Schwartz *et al.*, 1996; Mizuno *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2005). Demzufolge wurde der im *in-vivo*-Versuch 2 beobachtete Anstieg der DIO2- und NPY-mRNA-Konzentrationen sowie die Abnahme der relativen mRNA-Konzentration von POMC im Hypothalamus der Mäuse infolge des Fastens vermutlich durch die verminderte Leptinkonzentration im Plasma hervorgerufen. Zudem konnte bei den gefasteten WT-Tieren eine höhere hypothalamische mRNA-Konzentration an NPY als bei den gefasteten PPAR α -KO-Tieren nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen möglichen Einfluss des PPAR α auf die NPY-mRNA-Expression hin. Aus früheren Studien ist bekannt, dass der FGF21, ein PPAR α -abhängiges endokrines Hormon der Leber, die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und im Hypothalamus die mRNA-Expression von NPY stimuliert (Lundasen *et al.*, 2007; Chikahisa *et al.*, 2008; Ishida, 2009; Wang *et al.*, 2010). In der aktuellen Arbeit war unter

Fastenbedingungen ein deutlich stärkerer Anstieg der FGF21-mRNA-Konzentration in der Leber der WT- gegenüber der PPAR α -KO-Mäuse zu beobachten. Somit lässt sich die gesteigerte hypothalamische NPY-mRNA-Konzentration in den gefasteten WT-Tieren im Vergleich zu den gefasteten PPAR α -KO-Tieren auf die mit einer fastenbedingten PPAR α -Aktivierung verbundenen Stimulation der FGF21-mRNA-Expression in der Leber zurückführen. Dem NPY wird eine hemmende Wirkung auf die mRNA-Expression des TRH-Prohormons zugeschrieben (Fekete *et al.*, 2001; Fekete *et al.*, 2002). Daneben trägt DIO2 während des Fastens zu lokal erhöhten T3-Konzentrationen im Hypothalamus und damit möglicherweise zur Reduktion der TRH-mRNA-Expression bei (Diano *et al.*, 1998). Aufgrund der infolge des Fastens gesteigerten mRNA-Konzentration von DIO2 und NPY, wäre im Rahmen dieser Arbeit eine verminderte TRH-mRNA-Konzentration im Hypothalamus der gefasteten Tiere zu erwarten gewesen. Die Ursache für das Ausbleiben der fastenbedingten Abnahme der TRH-Synthese konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Neben dem TRH sind noch weitere neuronale Faktoren an der Regulation der TSH-Synthese beteiligt (Abb. 34). Dazu gehört die DIO2, die für die Umwandlung von inaktivem T4 in aktives T3 im Gehirn verantwortlich ist und so unter anderem zur negativen Feedbackregulation der Schilddrüsenhormone auf die TSH-Expression beiträgt. Auf die bedeutende Rolle der DIO2 bei der Regulation der TSH-Synthese wies die Studie von Fonseca *et al.* (2013) hin. Darin konnte anhand von Mäusen gezeigt werden, dass ein DIO2-*knockout* in der Hypophyse mit einem starken Anstieg der TSH- und T4-Konzentrationen im Serum einhergeht. Allerdings war im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der relativen DIO2-mRNA-Konzentration in der Hypophyse der gefasteten Tiere gegenüber der Kontrolltiere zu beobachten. Fekete und Lechan (2007) vermuteten, dass das infolge des fastenbedingten Anstiegs der DIO2-mRNA-Expression vermehrt gebildete T3 im Hypothalamus über den Portalkreislauf zur Hypophyse gelangt und dort möglicherweise die Herunterregulation der TSH β -mRNA-Konzentration bedingt. Allerdings blieb im *in-vivo*-Versuch 1 die TR β 2-mRNA-Konzentration in der Hypophyse der gefasteten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert. TR β 2 vermittelt die hemmende Wirkung des T3 auf die TSH-mRNA-Expression in den thyreotropen Zellen der Hypophyse (Nakagano *et al.*, 2004). Somit scheinen weder die DIO2 noch die TR β 2 der Hypophyse an den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der TSH β -mRNA-Konzentration beteiligt gewesen zu sein.

Die TSH-Synthese wird weiterhin vom TRHDE der Hypophyse beeinflusst. Das TRHDE ist eine Peptidase, die für den Abbau von TRH verantwortlich ist (Bauer *et al.*, 1981). Schomburg und Bauer (1995) konnten einen inversen Zusammenhang zwischen der TRHDE- und der TSH β -mRNA-Konzentration belegen. In der vorliegenden Arbeit (*in-vivo*-Versuch 1) war jedoch keine Veränderung der relativen mRNA-Konzentration von TRHDE in der Hypophyse gefasteter WT- und PPAR α -KO-Tiere gegenüber den Kontrolltieren zu erkennen, die die fastenbedingte Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration erklären würde.

Auch der nukleare Transkriptionsfaktor RXR spielt bei der Regulation der TSH-Synthese eine Rolle. Der RXR ist ein Heterodimerisierungspartner zahlreicher weiterer nuklearer Rezeptoren, wie zum Beispiel dem PPAR α und den TRs und wird über die Bindung von spezifischen Liganden aktiviert. Janssen *et al.* (2011) konnten anhand von *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellen zeigen, dass die Behandlung mit einem RXR-Antagonisten einen dosisabhängigen Anstieg der relativen mRNA-Konzentration beider TSH-Untereinheiten bedingt, während die TRH-mRNA-Konzentration unverändert blieb. Somit scheint RXR ein direkter Regulator der TSH-Synthese zu sein. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die relative mRNA-Konzentration von RXR α in der Hypophyse von WT- und PPAR α -KO-Mäusen ermittelt. Unter Fastenbedingungen war ein Anstieg der RXR α -mRNA-Konzentration in der Hypophyse der Tiere zu beobachten, der bei den PPAR α -KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren deutlich stärker ausfiel (*in-vivo*-Versuch 1). Aus der Literatur ist bekannt, dass ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure, Linolsäure, Arachidonsäure und Docosahexaensäure physiologisch bedeutsame RXR α -Liganden darstellen (de Urquiza *et al.*, 2000; Goldstein *et al.*, 2003). Im *in-vivo*-Versuch 1 und 2 kam es infolge des Fastens zu einem Anstieg der Konzentration an NEFA im Plasma der WT- und PPAR α -KO-Mäuse gegenüber der Kontrolltiere. Ein PPAR α -Mangel geht häufig mit einer gestörten Fettsäureaufnahme und β -Oxidation einher (Kersten *et al.*, 1999; Leone *et al.*, 1999). Als mögliche Folge dessen waren bei den gefasteten PPAR α -KO-Tieren deutlich höhere NEFA-Konzentrationen im Plasma als bei den gefasteten WT-Tieren zu beobachten. Die aktuellen Ergebnisse lassen vermuten, dass RXR α nach 48-stündigem Fasten in der Hypophyse der PPAR α -KO-Tiere gegenüber den WT-Tiere nicht nur vermehrt exprimiert, sondern auch durch NEFA verstärkt aktiviert wurde. Möglicherweise könnte die höhere hypophysäre RXR α -mRNA-Konzentration und -Aktivität somit zur stärkeren Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration der gefasteten PPAR α -KO-Tiere im Vergleich zu den gefasteten WT-Tieren beigetragen haben.

Auch die Sekretion des TSHs wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Zu den neuronalen

Inhibitoren der TSH-Sekretion gehört unter anderem das Neuromedin B. In Versuch 1 war die relative mRNA-Konzentration von Neuromedin B in der Hypophyse der PPAR α -KO-Tiere sowohl unter *ad libitum* Fütterung als auch unter Fastenbedingungen im Vergleich zu den WT-Tieren signifikant erhöht. Die zugrunde liegende Ursache konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Aus einer früheren Studie von Lee *et al.* (2004) ist bereits bekannt, dass PPAR α nicht nur aktivierend, sondern auch hemmend auf die Expression seiner Zielgene wirken kann. Demzufolge wäre es denkbar, dass auch Neuromedin B zu den durch PPAR α negativ regulierten Genen gehört. Schilddrüsenhormone zählen zu den Stimulatoren der Neuromedin B-Synthese (Ortiga-Carvalho *et al.*, 1995; Ortiga-Carvalho *et al.*, 1996) und vermitteln ihre Wirkung über TRs. Judge-Aubry *et al.* (1995) zeigten, dass TRs mit PPAR α um die Bindung an den gemeinsamen Heterodimerisierungspartner RXR α konkurrieren. Daraus kann geschlossen werden, dass ein Mangel an aktivierbarem PPAR α zur vermehrten Heterodimerisierung von TR und RXR α führt und somit eine gesteigerte Bindung des TR-RXR α -Komplexes an den Neuromedin B-Promotor bedingt. Dies könnte ebenfalls eine mögliche Ursache für die im *in-vivo*-Versuch 1 beobachtete höhere hypophysäre Neuromedin B-mRNA-Konzentration der PPAR α -KO- gegenüber der WT-Tiere darstellen. Die Ergebnisse früherer Studien lassen vermuten, dass die mRNA- und Proteinexpression von Neuromedin B positiv miteinander korreliert ist (Jones *et al.*, 1992; Ortiga-Carvalho *et al.*, 2003). Somit könnte die erhöhte mRNA-Konzentration von Neuromedin B in der Hypophyse der PPAR α -KO-Mäuse mit einer gesteigerten Neuromedin B-Proteinkonzentration einhergegangen sein, die wiederum möglicherweise zu einer verminderten TSH-Sekretion in den PPAR α -KO-Mäusen führte. Infolge des Fastens war im *in-vivo*-Versuch 1 keine Veränderung der Neuromedin B-mRNA-Konzentration in der Hypophyse der WT- und PPAR α -KO-Mäuse gegenüber den Kontrolltieren feststellbar. Auch bei Ortiga-Carvalho *et al.* (1997) blieb der Neuromedin B-Gehalt in der Hypophyse von Ratten nach 48-stündigem Fasten unverändert. Erst nach 78-stündigem Fasten konnte diese Arbeitsgruppe eine Zunahme des hypophysären Neuromedin B-Gehaltes der Tiere beobachten. Somit scheint die Dauer des Fastens entscheidend für die Regulation der Neuromedin B-Synthese zu sein.

Einen weiteren Einflussfaktor der TSH-Sekretion stellt das POMC dar. Das in der Hypophyse gebildete POMC ist der Vorläufer verschiedener biologisch aktiver Peptide wie zum Beispiel β -Endorphin (Smith und Funder, 1988). Aus β -Endorphin kann das sogenannte met-Enkephalin abgespalten werden (Herbert *et al.*, 1980). Sowohl β -Endorphin, als auch met-Enkephalin besitzen eine regulatorische Wirkung auf die TSH-Sekretion. Eine Behandlung von Ratten mit β -Endorphin- und met-Enkephalin-Antiserum führte zu einer Erhöhung der

TSH- und T3-Konzentrationen im Plasma, was auf eine gehemmte TSH-Freisetzung aus der Hypophyse schließen lässt (Mitsuma *et al.*, 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit blieb die hypophysäre POMC-mRNA-Konzentration der gefasteten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert (*in-vivo*-Versuch 2). Es ist daher zu vermuten, dass weder das aus POMC gebildete β -Endorphin, noch dessen Spaltprodukt met-Enkephalin an der Regulation der TSH-Sekretion beteiligt waren.

Neben den neuronalen sind auch periphere Einflussfaktoren wie Leptin und NEFA an der Regulation der Synthese und Sekretion von TSH beteiligt. Das Leptin scheint stimulierend auf die TSH-Synthese zu wirken. So konnten Chowdhury *et al.* (2004) nachweisen, dass eine Leptinbehandlung von Hypophysenzellen der Ratte einen dosisabhängigen Anstieg der TSH β -mRNA-Konzentration bedingt. In der vorliegenden Arbeit (*in-vivo*-Versuch 2) war jedoch unter Fastenbedingungen kein genotypspezifischer Unterschied in der Leptinkonzentration im Plasma zu beobachten, der die deutlich stärkere Abnahme der hypophysären TSH β -mRNA-Konzentration der PPAR α -KO- gegenüber den WT-Mäusen erklären könnte.

Frühere *in-vitro*-Studien zeigten, dass erhöhte Konzentrationen an NEFA die Bindung von T3 an den Schilddrüsenhormonrezeptor hemmen (Wiersinga *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1989) und somit möglicherweise Einfluss auf die TSH-mRNA-Expression nehmen. Weiterhin wurden erhöhte Konzentrationen an NEFA mit einer Reduktion der TSH-Sekretion in Verbindung gebracht. Kennedy *et al.* (1994) konnten nach Behandlung von Hypophysenzellen der Ratte mit $2,3 \times 10^{-4}$ M Ölsäure eine um 80 % verminderte TSH-Sekretion gegenüber den Kontrollzellen belegen. Im Rahmen dieser Arbeit lagen die Konzentrationen an NEFA im Plasma der Kontrollmäuse bei etwa $0,8-1,0 \times 10^{-3}$ M, nahmen in den gefasteten WT-Tieren zu und erreichten in den gefasteten PPAR α -KO-Tieren mit etwa $1,8 \times 10^{-3}$ M den höchsten Wert (*in-vivo*-Versuch 1 und 2). Demzufolge könnten die höheren Konzentrationen an NEFA im Plasma der gefasteten PPAR α -KO-Tiere gegenüber denen der gefasteten WT-Tiere nicht nur zur deutlich stärkeren Abnahme der TSH-mRNA-Expression, sondern auch zur verstärkten Reduktion der TSH-Sekretion geführt haben.

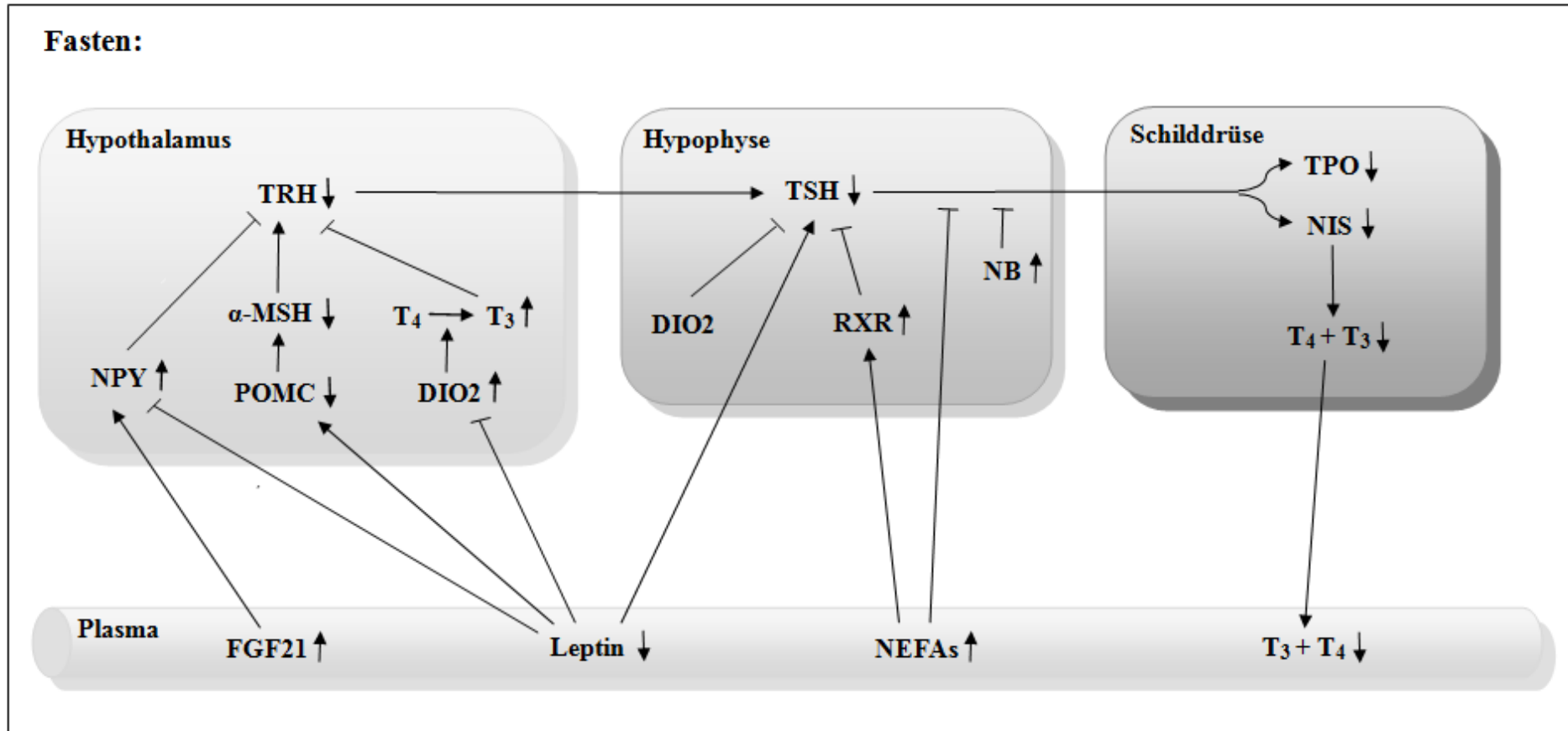


Abb. 34: Fastenbedingte Veränderungen in der Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises.

α-MSH, α-Melanozyten-stimulierendes Hormon; DIO2, Typ II 5' Deiodase; FGF21, *fibroblast growth factor 21*; NB, Neuromedin B; NEFA, unveresterte Fettsäuren; NIS, Natrium-Iodid-Symporter; NPY, Neuropeptid Y; POMC, Proopiomelanocortin; RXR, 9-cis Retinoid-X-Rezeptor; T₃, Triiodthyronin; T₄, Thyroxin; TPO, Thyreoperoxidase; TRH, Thyreoliberin; TSH, Thyreotropin

5.1.3 Auswirkungen einer fasten- und genotypbedingten Veränderung der TSH-Expression auf die Synthese der Schilddrüsenhormone

In der vorliegenden Arbeit konnte nach 48-stündigem Fasten, neben einer verminderten TSH-mRNA-Konzentration in der Hypophyse, eine Abnahme der relativen mRNA-Konzentrationen von NIS, TPO und TSH-R in der Schilddrüse der WT- und PPAR α -KO-Mäuse beobachtet werden (Abb. 34). Die mRNA- und Proteinexpressionen von NIS, TPO und TSH-R unterliegen einer positiven Regulation durch zirkulierendes TSH im Plasma (Weiss *et al.*, 1984; Zarrilli *et al.*, 1990; Kohn *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die im *in-vivo*-Versuch 1 und 2 beobachtete fastenbedingte Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration eine verminderte TSH-Konzentration im Plasma zur Folge hatte. Eine direkte Bestimmung der Plasma-Konzentration an TSH mittels Western Blot ist derzeit nicht möglich, da bislang kein geeigneter TSH-Antikörper der Maus erhältlich ist. Obwohl PAX-8 ebenfalls zu den durch TSH positiv regulierten Genen gehört (Fabbro *et al.*, 1998), war im *in-vivo*-Versuch 1 keine Veränderung der PAX-8-mRNA-Konzentration in der Schilddrüse der gefasteten Mäuse gegenüber der Kontrolltiere feststellbar. Übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen zeigte eine Studie von Postiglione *et al.* (2002), dass ein Mangel an TSH mit verminderten NIS- und TPO-mRNA-Konzentrationen einhergeht, während die relative mRNA-Konzentration von PAX-8 unverändert blieb. Eine fasteninduzierte Abnahme der NIS- und TPO-mRNA-Konzentrationen lässt auf eine verminderte Schilddrüsenhormonsynthese schließen. So konnte im Rahmen der aktuellen Arbeit eine Abnahme der Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma der WT- und PPAR α -KO-Tiere infolge des Fastens beobachtet werden. Entsprechend der reduzierten TSH β -mRNA-Konzentration in der Hypophyse war die TPO-Konzentration in der Schilddrüse sowie die Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma der gefasteten PPAR α -KO-Mäuse gegenüber den gefasteten WT-Tieren deutlich geringer (*in-vivo*-Versuch 1). Im *in-vivo*-Versuch 2 dagegen wiesen die PPAR α -KO-Tiere analog zur verminderten hypophysären TSH β -mRNA-Konzentration sowohl unter Kontroll- als auch unter Fastenbedingungen geringere NIS- und TPO-mRNA-Konzentrationen in der Schilddrüse und folglich eine geringere Konzentration an freiem T4 im Plasma als die WT-Tiere auf. Auch im *in-vivo*-Versuch 3 ging die deutlich niedrigere TSH β -mRNA-Konzentration in der Hypophyse der PPAR α -KO-Tiere gegenüber der WT-Tiere unabhängig von der Behandlung mit einer geringeren relativen mRNA-Konzentration von NIS in der Schilddrüse und einer geringeren fT4-Konzentration im Plasma einher. Somit stehen die

Ergebnisse der *in-vivo*-Studien im Kontrast zu den *in-vitro*-Daten und der Hypothese, dass PPAR α direkt an der Abnahme der hypophysären TSH-mRNA-Expression und TSH-induzierter Prozesse in der Schilddrüse beteiligt ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen am Modelltier Maus deuten eher daraufhin, dass PPAR α einer fastenbedingten Herunterregulation der thyreotropen Achse entgegenwirkt.

5.1.4 Einfluss von PPAR α auf Schilddrüsenhormon-inaktivierende Gene der Leber

Neben dem Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis spielt die Inaktivierung und Eliminierung von T3 und T4 eine wichtige Rolle in der Regulation des Schilddrüsenhormonstoffwechsels. An der Inaktivierung der Schilddrüsenhormone sind Enzyme des Fremdstoffwechsels wie Sults und UGTs beteiligt (Mol und Visser, 1985; Qatanani *et al.*, 2005). Glucuronidierungs- und Sulfatierungsreaktionen führen zu erhöhter Wasserlöslichkeit der Schilddrüsenhormone und ermöglichen somit deren Ausscheidung über die Galle und den Urin (Visser *et al.*, 1996). Die Transkription der für die Schilddrüsenhormonkonjugation verantwortlichen Gene UGT1A1 und Sult1A1 unterliegt der Kontrolle des nuklearen Rezeptors CAR. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Fasten mit einer Zunahme der mRNA-Konzentration von CAR sowie CAR-abhängiger Gene einhergeht (Maglich *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2006). Auch im *in-vivo*-Versuch 2 der vorliegenden Arbeit war ein fastenbedingter Anstieg der relativen mRNA-Konzentrationen von CAR, UGT1A1 und Sult1A1 in der Leber der WT- und PPAR α -KO-Mäuse zu beobachten. Die gefasteten WT-Tiere wiesen jedoch deutlich höhere hepatische mRNA-Konzentrationen an CAR und Sult1A1 als die gefasteten PPAR α -KO-Mäuse auf. Andere *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien konnten bereits erhöhte hepatische mRNA-Konzentrationen von CAR und CAR-abhängigen Genen infolge einer WY 14.643-Behandlung belegen (Wieneke *et al.*, 2007; Wieneke *et al.*, 2009). Daher ist zu vermuten, dass PPAR α an der Stimulation der mRNA-Expression von CAR und dessen Zielgene beteiligt ist. Möglicherweise spielt dabei der PPAR α -abhängige FGF21 eine Rolle. Bekannt ist, dass die FGF21-Expression in der Leber während des Fastens durch PPAR α induziert wird (Inagaki *et al.*, 2007; Lundåsen *et al.*, 2007). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein fastenbedingter Anstieg der hepatischen FGF21-mRNA-Konzentration beobachtet werden. Dieser war bei den WT- im Vergleich zu den PPAR α -KO-Tieren deutlich stärker ausgeprägt. Frühere Untersuchungen belegen, dass sowohl das Fasten als auch eine Behandlung mit synthetischen PPAR α -Agonisten mit einer gesteigerten FGF21-Expression in der Leber und einer erhöhten FGF21-Konzentration im Plasma von Mäusen

einhergeht (Badman *et al.*, 2007; Inagaki *et al.*, 2007; Lundåsen *et al.*, 2007). FGF21 ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und die NPY-mRNA-Expression im Hypothalamus zu induzieren. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete höhere FGF21-mRNA-Expression in der Leber könnte somit eine mögliche Erklärung für die höhere relative mRNA-Konzentration von NPY im Hypothalamus der gefasteten WT- gegenüber der gefasteten PPAR α -KO-Tiere darstellen. Ergebnisse von Vella *et al.* (2011) wiesen erstmals darauf hin, dass NPY während des Fastens sowohl in der zentralen Herunterregulation des Schilddrüsenstoffwechsels via Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis, als auch in der hepatischen Inaktivierung der Schilddrüsenhormone via Induktion von CAR und CAR-abhängigen Genen involviert ist. Somit sind die in der aktuellen Arbeit beobachteten höheren mRNA-Konzentrationen von CAR und Sult1A1 in der Leber der gefasteten WT-Tiere gegenüber der gefasteten PPAR α -KO-Tiere möglicherweise auf die stärkere Expression von NPY im Hypothalamus dieser Tiere zurückzuführen. Hinsichtlich der hepatischen UGT1A1-mRNA-Konzentration war dagegen bei den gefasteten PPAR α -Tieren kein Unterschied zu den gefasteten WT-Tieren feststellbar. Die Ursache dafür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Aleksunes und Klaassen (2012) zeigten anhand transgener Mäuse, dass neben CAR noch weitere Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) für die Regulation der UGT1A1-mRNA-Expression von Bedeutung sind. Sowohl AhR als auch PXR werden während des Fastens aktiviert (Xu *et al.*, 2011) und könnten die im Rahmen der aktuellen Arbeit unter Fastenbedingungen beobachtete gleich starke UGT1A1-Expression in der Leber der WT- und PPAR α -KO-Tieren erklären.

Insgesamt deuten die aktuellen Ergebnisse darauf hin, dass PPAR α während des Fastens direkt oder indirekt über den FGF21-NPY-Weg die Induktion von CAR und CAR-abhängigen Genen in der Leber bedingt und damit möglicherweise an der Regulation der Inaktivierung und Eliminierung der Schilddrüsenhormone beteiligt ist. Entgegen der Vermutung, dass PPAR α über eine verstärkte Inaktivierung und Eliminierung von T3 und T4 zu der in der vorliegenden Arbeit beobachteten fasteninduzierten Abnahme der Schilddrüsenhormone im Plasma beigetragen haben könnte, wiesen die gefasteten WT-Tiere höhere Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma als die gefasteten PPAR α -KO-Tiere auf. Somit scheinen die unter Fastenbedingungen deutlich geringeren Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma der PPAR α -KO-Tiere gegenüber der WT-Tiere nicht durch eine stärkere biliäre und renale Ausscheidung, sondern über eine stärkere Inhibierung der Schilddrüsenhormonsynthese hervorgerufen worden zu sein.

5.1.5 Einfluss von PPAR α auf die Schilddrüsenhormontransporter MCT8 und MCT10

Die biologische Aktivität der Schilddrüsenhormone wird durch die Verfügbarkeit der intrazellulären T3-Konzentration für die Bindung an die TRs bestimmt und ist somit vom Transport der Schilddrüsenhormone durch die Zellmembran abhängig. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Schilddrüsenhormone mittels passiver Diffusion in die Zielzellen gelangen (Robbins und Rall, 1960; Hillier, 1970). Neuere Studien zeigen jedoch, dass die zelluläre Aufnahme und Abgabe der Schilddrüsenhormone über spezielle Transporter erfolgt (Hennemann *et al.*, 2001; Friesema *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2005). Zu den spezifischen Schilddrüsenhormontransportern ist der MCT8 zu zählen. Der MCT8 wird hauptsächlich in Leber, Niere, Herz, Skelettmuskel, Hypophyse und Schilddrüse exprimiert und ist vor allem für die Schilddrüsenhormonaufnahme ins Gehirn von zentraler Bedeutung (Heuer *et al.*, 2005; Friesema *et al.*, 2006; Nishimura und Naito, 2008). Einen weiteren Schilddrüsenhormontransporter stellt der MCT10 dar (Friesema *et al.*, 2008), der zudem an der Aufnahme und dem Efflux aromatischer Aminosäuren beteiligt ist. Die Expression von MCT10 erfolgt in verschiedenen Geweben wie zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt, in der Leber, in der Niere, im Skelettmuskel, aber auch im Gehirn, in der Hypophyse und der Schilddrüse (Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Ramadan *et al.*, 2006; Nishimura und Naito, 2008).

Über die Regulation der Expression der beiden MCTs ist bislang nur wenig bekannt. Vorhergehende Studien anderer Arbeitsgruppen lassen eine substratabhängige Regulation der Expression von MCT8 und MCT10 vermuten. Bei Verabreichung von exogenen Schilddrüsenhormonen konnte *in-vivo* eine Abnahme der relativen mRNA-Konzentrationen von MCT8 und MCT10 in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Mebis *et al.*, 2009; Muzzio *et al.*, 2013). Dagegen gehen niedrige Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma mit einem Anstieg der Expression beider Schilddrüsenhormontransporter im Knochen von Mäusen sowie im Skelettmuskel und der Leber von Mensch und Kaninchen einher (Capelo *et al.*, 2009; Mebis *et al.*, 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen den Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma und der relativen mRNA-Konzentration von MCT10 in verschiedenen Geweben der Maus. So war im *in-vivo*-Versuch 2 infolge des Fastens eine Abnahme der Konzentration an fT4 im Plasma der Mäuse zu beobachten, während die MCT10-mRNA-Konzentration im Hypothalamus, der Hypophyse und Leber der Tiere anstieg. In der Schilddrüse kam es dagegen bei den gefasteten Tieren gegenüber den Kontrolltieren zu einer signifikanten Abnahme der relativen mRNA-Konzentration vom MCT10, was auf eine organspezifische Regulation der MCT10-mRNA-

Expression während des Fastens schließen lässt. Trotz der fastenbedingten Abnahme der Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma, war die relative mRNA-Konzentration von MCT8 im Hypothalamus sowie in der Schilddrüse und Leber der Tiere unter Fastenbedingungen vermindert (*in-vivo*-Versuch 2). Herwig *et al.* (2009) konnten infolge einer Futterrestriktion ebenfalls eine Abnahme der MCT8-mRNA-Expression in Tanyzyten des Hypothalamus sibirischer Hamster beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transkription von MCT8 bei Nahrungsentzug möglicherweise anderen Regulationsmechanismen als bei normalem Nahrungsangebot unterliegt.

Untersuchungen von König *et al.* (2008, 2010), in denen gezeigt werden konnte, dass die Transkription von MCT1, einen weiteren Vertreter der Familie der Monocarboxylat-Transporter, der direkten Kontrolle durch PPAR α unterliegt, lassen auch eine mögliche Beteiligung des PPAR α an der Regulation der MCT8- und MCT10-Expressionen vermuten. Im *in-vivo*-Versuch 2 der vorliegenden Arbeit war bei den PPAR α -KO-Tieren gegenüber den WT-Tieren unter Fastenbedingungen eine deutlich stärkere Abnahme der MCT8-mRNA-Konzentration im Hypothalamus und in der Leber feststellbar. Zudem wiesen die gefasteten PPAR α -KO-Tiere in der Leber und Hypophyse eine höhere, in der Schilddrüse dagegen eine geringere relative MCT10-mRNA-Konzentration als die gefasteten WT-Tiere auf. Dies deutet auf einen möglichen Einfluss einer fasteninduzierten PPAR α -Aktivierung auf die Expression von MCT8 und MCT10 hin. Dabei scheint PPAR α die MCT8- und MCT10-mRNA-Expressionen in den untersuchten Geweben mit Ausnahme der Schilddrüse gegensätzlich zu beeinflussen. Um die Ergebnisse der Fastenstudie zu verifizieren, wurde im *in-vivo*-Versuch 3 nach oraler Verabreichung von WY 14.643 über eine Schlundsonde die mRNA-Konzentrationen von MCT8 und MCT10 im Hypothalamus sowie in der Hypophyse und Schilddrüse der Mäuse bestimmt. Im Hypothalamus und der Schilddrüse der Tiere waren genotypabhängige Unterschiede in den mRNA-Expressionen beider Schilddrüsenhormontransporter zu erkennen. So wiesen die PPAR α -KO-Tiere im Hypothalamus eine geringere MCT8-mRNA-Konzentration als die WT-Tiere auf. Dagegen zeigte sich in der Schilddrüse der PPAR α -KO-Tiere gegenüber der WT-Tiere höhere relative mRNA-Konzentrationen an MCT8 und MCT10, was auf eine unterschiedliche Regulation dieser beiden Schilddrüsenhormontransporter in verschiedenen Geweben hindeutet. Zudem konnte im *in-vivo*-Versuch 3 eine höhere Konzentration an fT4 im Plasma der PPAR α -KO-Mäuse gegenüber der WT-Mäuse beobachtet werden. Dies lässt auf eine mögliche Bedeutung der Schilddrüsenhormone für die genotypspezifischen MCT8- und MCT10-mRNA-Expressionen schließen. In keinem der untersuchten Gewebe war ein Interaktionseffekt von Genotyp und

WY 14.643-Behandlung auf die MCT8- und MCT10-mRNA-Konzentrationen zu erkennen. Demzufolge scheint PPAR α keinen direkten Einfluss auf die Expression der beiden Schilddrüsenhormontransporter zu nehmen.

5.2 Effekt einer regelmäßigen Nahrungsaufnahme versus Fasten auf die 24 h-Expression von PPAR α und BMAL1 männlicher und weiblicher Probanden

Die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR α unterliegt, wie die einer Vielzahl weiterer nuklearer Rezeptoren, dem Einfluss zirkadianer Regulatoren. Dies hat, wie bereits im Nager beobachtet, tageszeitliche Schwankungen der PPAR α -Expression zur Folge (Lemberger *et al.*, 1996; Stavinoha *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006; Oishi *et al.*, 2008). Daraufhin lässt sich vermuten, dass das 24 h-Expressionsprofil des PPAR α im Vergleich zu Einpunktanalysen deutlich verlässlichere Ergebnisse liefert, um externe und interne Einflussfaktoren zu identifizieren. Untersuchungen an Mäusen lieferten erste Hinweise, dass möglicherweise die Nahrungsaufnahme und das Geschlecht das 24 h-Expressionsprofil von PPAR α beeinflusst (Canaple *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009). Daten aus Nagerstudien sind jedoch nur bedingt auf den Menschen übertragbar, da Ratten und Mäuse sich aufgrund ihrer Nachtaktivität, Nahrungsaufnahme und hohen PPAR α -Aktivität vom Menschen unterscheiden.

Bislang ist noch nicht bekannt, ob der PPAR α auch beim Menschen geschlechtsspezifische Tagesexpressionsprofile aufweist und inwieweit dabei die Nahrungsaufnahme eine Rolle spielt. Dies zu klären ist jedoch von enormer Relevanz, da PPAR α neben der Anpassung des Stoffwechsels an das Fasten noch für den Alterungsprozess, altersbedingte Erkrankungen und die Immunantwort von Bedeutung ist (Daynes und Jones, 2002; Mandard *et al.*, 2004; Masternak und Bartke, 2007; Ringseis *et al.*, 2013). Zudem werden Fibrate, die zu den synthetischen PPAR α -Agonisten gehören, in der Behandlung hyperlipidämischer Erkrankungen eingesetzt. Die Aufklärung potentieller Einflussfaktoren auf die PPAR α -Expression könnte daher wesentlich dazu beitragen, Therapiekonzepte zu optimieren. Daraufhin wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen zweier Humanstudien das 24 h-mRNA-Expressionsprofil von PPAR α in Monozyten männlicher und weiblicher Probanden ermittelt, die innerhalb des Versuchszeitraums entweder 4 geregelte Mahlzeiten zu sich nahmen oder fasteten. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass auch beim Menschen das Geschlecht die 24 h-PPAR α -mRNA-Expression beeinflusst. So unterschied sich das 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil der nicht-fastenden Frauen deutlich von dem der Männer. Als eine mögliche Ursache für diesen geschlechtsspezifischen Unterschied wurde das

Sexualhormon Östrogen diskutiert. Frühere Nagerstudien deuten bereits auf einen Einfluss von PPAR α auf den Östrogenstoffwechsel hin. Keller *et al.* (1995) beobachteten, dass PPAR α mit dem Östrogenrezeptor (ER) um die Bindung an ER *response elements* konkurriert. Zudem wirkt PPAR α hemmend auf die Expression der Steroid/Oxysterol-7-alpha-Hydroxylase (CYP7B1) (Leuenberger *et al.*, 2009). Cyp7B1 katalysiert den Abbau des ER-Antagonists 27-Hydroxylase und stimuliert so die ER-Aktivität (Martin *et al.*, 2001; Umetani *et al.*, 2007). Der aktivierte ER fördert seinerseits die CYP7B1-Expression, was vor allem bei Frauen in einem erhöhten Risiko für östrogeninduzierte Inflammation, Hepatotoxizität und intrahepatischer Cholestase resultiert (Yamamoto *et al.*, 2006; Pusl und Beuers, 2007). Andererseits konnte in einer Studie von Jalouli *et al.* (2003) gezeigt werden, dass eine Behandlung von männlichen und weiblichen Ratten mit dem Sexualhormon des jeweils anderen Geschlechts eine Veränderung der hepatischen PPAR α -mRNA-Expression nach sich zieht. Diese Beobachtungen bestärken die Ergebnisse der aktuellen Arbeit und lassen auch beim Menschen eine enge Wechselwirkung von PPAR α und den Sexualhormonen vermuten. Weiterhin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass das 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil von Männern und Frauen unterschiedlich auf einen Nahrungsmangel reagiert. So wiesen die fastenden Frauen in der vorliegenden Arbeit ein entgegengesetztes 24 h-mRNA-Expressionsprofil von PPAR α als die nicht-fastenden Frauen auf. Dagegen blieb das 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil der Männer infolge des Fastens unverändert. Dies hatte eine Angleichung des 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofils der fastenden Frauen an das der Männer zur Folge. Die Ursache für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion des 24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofils auf das Fasten ist bislang noch unbekannt. Allerdings lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass der weibliche Stoffwechsel schneller in der Lage ist, sich an einen bestehenden Nahrungsmangel anzupassen. Dass Frauen im Vergleich zu Männern eine höhere metabolische Flexibilität besitzen, die unter anderem durch eine gesteigerte PPAR α -Expression im Fettgewebe gekennzeichnet ist, wurde bereits von Sparks *et al.* (2009) beobachtet. Hoyenga und Hoyenga (1982) beschrieben zudem, dass weibliche Individuen deutlich längere Fastenperioden überleben und führten dies unter anderem auf deren spezifische Rolle in der Reproduktion zurück.

An der Regulation der tageszeitlichen Schwankungen der PPAR α -Expression ist der zirkadiane Schrittmacher BMAL1 beteiligt (Canaple *et al.*, 2006; Shirai *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008). Zudem ist BMAL1 für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase von Bedeutung (Shimba *et al.*, 2011). Daraufhin wurde im Rahmen dieser Arbeit neben dem

24 h-PPAR α -mRNA-Expressionsprofil das 24 h-mRNA-Expressionsprofil von BMAL1 in den Monozyten der nicht-fastenden und fastenden Männer und Frauen bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die 24 h-mRNA-Expressionsprofile von BMAL1 und PPAR α in den Monozyten der nicht-fastenden und fastenden Männer und Frauen ähnelten. Dies deutet darauf hin, dass die PPAR α - und BMAL1-Expression im Menschen, wie auch im Nager, einer wechselseitigen Interaktion unterliegt.

Ein überraschendes Ergebnis der vorliegenden Arbeit war, dass die nicht-fastenden Frauen, nicht jedoch die fastenden Frauen, qualitativ und quantitativ unterschiedliche 24 h-PPAR α - und BMAL1-mRNA-Expressionsprofile im Vergleich zu den Männern aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede in den 24 h-mRNA-Expressionsprofilen von PPAR α und BMAL1 möglicherweise mit dem energetischen Mehrbedarf von Frauen für die Reproduktion zusammenhängen und es somit für Frauen von größerer Bedeutung ist, verfügbare Nahrungsenergie zu speichern. Darüber hinaus besitzen Frauen in vielen Ländern eine höhere Lebenserwartung als Männer (Austad, 2006). Der Geschlechtsdimorphismus in Hinblick auf das Altern und die Lebensspanne wurde in verschiedenen Studien auf eine geschlechtsspezifische Optimierung der Wechselbeziehung zwischen Reproduktion und Überleben zurückgeführt (Williams, 1957; Clutton-Brock und Parker, 1992; Bonduriansky *et al.*, 2008; Kokko und Jennions, 2008). Die fundamentale Schlüsselfunktion, die PPAR α und BMAL1 im Stoffwechsel zukommt, könnte im Zusammenspiel mit den unterschiedlichen reproduktiven Aufgaben von Männern und Frauen zur Entstehung einer gegensätzlichen Regulation der PPAR α - und BMAL1-Expression der beiden Geschlechter beigetragen haben.

Nager weisen am Tag die höchste und in der Nacht die niedrigste PPAR α -Expression auf. Dies wurde auf Dämmerungs- bzw. Nachtaktivität der Nager zurückgeführt. Um herauszufinden, inwieweit die PPAR α - und BMAL1-Expression des Menschen vom Schlaf/Wach-Rhythmus abhängt, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den 24 h-mRNA-Expressionsprofilen, die Tag/Nacht-Expression von PPAR α und BMAL1 ermittelt. Dabei zeigte sich, dass sich die beobachteten Unterschiede der 24 h-mRNA-Expressionsprofile von PPAR α und BMAL1 zwischen nicht-fastenden Frauen und den 3 anderen Gruppen auch in den Veränderungen der Tag- und Nacht-mRNA-Expressionen beider Gene widerspiegeln. So kam es bei den nicht-fastenden Frauen in der Nacht gegenüber dem Tag zu einer Zunahme der mRNA-Expression von PPAR α und BMAL1. Dagegen konnte bei den fastenden Frauen sowie den fastenden und nicht-fastenden Männern in der Nacht eine Abnahme der PPAR α - und BMAL1-mRNA-Expression beobachtet werden. Entsprechend der

mRNA-Expression war die Protein-Expression von PPAR α in den Monozyten der nicht-fastenden Frauen in der Nacht gegenüber dem Tag erhöht, während die PPAR α -Protein-Expression der fastenden Frauen sowie der nicht-fastenden und fastenden Männer in der Nacht abnahm. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den in früheren Studien beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschied in der Reaktion auf eine Behandlung mit dem synthetischen PPAR α -Agonisten Fenofibrat darstellen. Liu *et al.* (2008) stellten beispielsweise fest, dass sich eine 1x tägliche orale Fenofibratgabe gegensätzlich auf die Konzentration großer LDL-Partikel im Plasma männlicher und weiblicher Probanden auswirkt. Untersuchungen von Trottier *et al.* (2011) zeigten weiterhin, dass eine Fenofibratbehandlung mit einer Abnahme der Gesamt-Gallensäurekonzentration im Serum männlicher Probanden einhergeht, während die der weiblichen Probanden unverändert blieb. Zusammenfassend könnten die aktuellen Ergebnisse praktische Relevanz für die Humanmedizin besitzen, da synthetische PPAR α -Aktivatoren aus der Substanzklasse der Fibrate bereits in der Therapie hyperlipidämischer Erkrankungen Anwendung finden (Berger und Moller, 2002; Barbier *et al.*, 2009). Des Weiteren wird PPAR α als therapeutisches Target für die Behandlung zahlreicher chronischer Erkrankungen wie zum Beispiel Arteriosklerose, Diabetes mellitus, verschiedene Herz- und Nierenerkrankungen sowie chronisch lymphatische Leukämie diskutiert (Singh *et al.*, 2011; Hamilton-Craig *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2012; Spaner *et al.*, 2013). Die Erkenntnis, dass PPAR α beim Menschen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, lässt auch eine rhythmische Expression anderer mit Stoffwechselerkrankungen in Verbindung gebrachter nuklearer Faktoren vermuten und könnte die Entwicklung von Chronotherapien zur Erhöhung der Wirksamkeit von Medikamenten entscheidend beeinflussen. Hinsichtlich dessen sind mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Entstehung von Erkrankungen sowie dem Ansprechen auf medikamentöse Behandlungen zu berücksichtigen. Dies könnte bis dato unerwartete Folgen für die tägliche medizinische Praxis sowie für die Wahl, Wirkung und Effizienz von Therapien nach sich ziehen.

6. Zusammenfassung

Fasten geht mit zahlreichen Veränderungen des Stoffwechsels einher, die der Mobilisierung endogener Energiereserven und der Minimierung des Energieumsatzes des Körpers dienen. Einen Hauptanpassungsmechanismus an das Fasten stellt die Herunterregulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises dar. Gekennzeichnet ist dies durch eine verminderte Synthese und Sekretion von TRH des Hypothalamus, was wiederum mit einer verminderten Bildung von TSH in der Hypophyse sowie T4 und T3 in der Schilddrüse einhergeht. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise könnte der Transkriptionsfaktor PPAR α bei der fastenbedingten Herunterregulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises eine Rolle spielen, da PPAR α während des Fastens eine Reihe adaptiver Stoffwechselfvorgänge induziert wie beispielsweise die β -Oxidation von Fettsäuren und die Ketonkörpersynthese. Die Ergebnisse einer früheren Studie deuten darauf hin, dass PPAR α an der Regulation von TSH sowie TSH-induzierter Prozesse in der Schilddrüse beteiligt ist. Um der Bedeutung von PPAR α für die Regulation der TSH- und Schilddrüsenhormonsynthese nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit *in-vitro*-Studien mit TSH-produzierenden Zellen und *in-vivo*-Versuche mit Mäusen durchgeführt. Für die *in-vitro*-Studien wurde die murine Adenohypophysen-Tumorzelllinie T α T1 genutzt, da diese ein geeignetes Zellkulturmodell darstellt, um die Effekte des PPAR α auf die TSH-Synthese zu untersuchen. T α T1-Zellen reagieren auf eine T3-Stimulierung mit einer dosis- und zeitabhängigen Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration und exprimieren den RXR, einen Heterodimerisierungspartner von PPAR α und den TRs. Aus diesem Grund wurden die T α T1-Zellen mit synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten behandelt. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung der Zellen mit synthetischen und natürlichen PPAR α -Agonisten mit einer Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration einhergeht. Das PPAR α in den Zellen stimulierbar ist wurde anhand der mRNA-Konzentrationen ausgewählter Zielgene ermittelt. Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung des PPAR α an der Regulation der TSH-Synthese vermuten. Um zu überprüfen, ob es sich beim TSH möglicherweise um ein PPAR α -Zielgen handelt, wurde eine TSH-Promotoraktivitätsanalyse durchgeführt. Die Sequenzanalyse des murinen TSH β -Promotors mittels NUBIScan-Software ergab 3 putative PPREs an den Positionen -553 bis -565, -4 bis -16 sowie +381 bis +393 relativ zum Transkriptionsstart. Für den anschließenden Luciferase-Assay wurden HepG2-Zellen mit einem TSH β -Promotor-

Reportergenkonstrukt transfiziert und mit PPAR α - und RXR α -Expressionsplasmiden cotransfiziert. Nach einer 24 h-Inkubation der transfizierten Zellen mit 100 μ M WY 14.643 war keine Veränderung der Luciferase-Aktivität zu beobachten, was darauf hindeutet, dass PPAR α im untersuchten TSH β -Promotorbereich keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation nimmt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der *in-vitro*-Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit *in-vivo*-Versuche mit WT- und PPAR α -KO-Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden entweder über 48 h gefastet oder bekamen 1 x täglich über 4 Tage WY 14.643 via Schlundsonde verabreicht. Die Ergebnisse zeigten, dass Fasten mit einer erhöhten mRNA-Konzentration des PPAR α -Zielgens HMGCS2 in der Hypophyse einhergeht, was auf eine PPAR α -Aktivierung schließen lässt. Im Gegensatz zu den *in-vitro*-Daten, wiesen die gefasteten PPAR α -KO-Tiere jedoch eine signifikant geringere hypophysäre TSH β -mRNA-Konzentration als die gefasteten WT-Tiere auf. Im zweiten Fastenversuch war zudem unter *ad libitum* Fütterung bei den PPAR α -KO-Tieren gegenüber den WT-Tieren eine signifikant geringere TSH β -mRNA-Konzentration in der Hypophyse zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass PPAR α direkt oder indirekt an der Regulation der TSH-Synthese beteiligt ist. Allerdings deuten die Ergebnisse der Fastenstudien eher darauf hin, dass eine PPAR α -Aktivierung der fasteninduzierten Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration entgegenwirkt. Die orale Gabe von WY 14.643 verminderte die TSH β -mRNA-Konzentration der PPAR α -KO-Tiere, nicht jedoch die der WT-Tiere. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass PPAR α direkt Einfluss auf die TSH β -mRNA-Expression nimmt. *In-vivo* wird die TSH-Synthese und -Sekretion durch zahlreiche weitere neuronale und periphere Einflussfaktoren reguliert. Das TRH scheint für die beobachteten Veränderungen der TSH β -mRNA-Konzentration in der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung zu sein, da die relative mRNA-Konzentration von TRH im Hypothalamus der Tiere weder durch den Genotyp, noch durch die WY 14.643-Behandlung bzw. das Fasten beeinflusst wurde. Auch die relativen mRNA-Konzentrationen der TSH-Inhibitoren TR β 2, DIO2 und TRHDE blieben während des Fastens unverändert. Dagegen war die hypophysäre mRNA-Konzentration von RXR α , einem weiteren neuronalen Inhibitor der TSH-mRNA-Expression, bei den PPAR α -KO-Tieren infolge des Fastens im Vergleich zu den WT-Tieren signifikant erhöht. Zudem kam es bei den gefasteten PPAR α -KO- gegenüber den gefasteten WT-Tieren zu einem stärkeren Anstieg der Konzentration an NEFA im Plasma, welche physiologisch bedeutsame RXR α -Liganden darstellen. Folglich scheint RXR α in der Hypophyse der gefasteten PPAR α -KO-Tiere auch verstärkt aktiviert zu werden und könnte somit zur stärkeren Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration der gefasteten PPAR α -KO-

gegenüber der gefasteten WT-Tiere beigetragen haben. Die fastenbedingte Abnahme der Plasmakonzentration an Leptin, einem peripheren Stimulator der TSH-Synthese, könnte ursächlich für die Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration infolge des Fastens gewesen sein, bietet jedoch keine Erklärung für die stärkere Abnahme der TSH β -mRNA-Konzentration der gefasteten PPAR α -KO- gegenüber der gefasteten WT-Tiere. Die Veränderung der TSH β -mRNA-Konzentration ging mit entsprechenden Veränderungen der mRNA-Konzentration TSH-abhängiger Gene in der Schilddrüse und der Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma einher. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf gegensätzliche PPAR α -Effekte in der Zellkultur und im Mausmodell hin. Es ist daher davon auszugehen, dass die fasteninduzierte Abnahme der TSH-Synthese und der TSH-abhängigen Prozesse in der Schilddrüse nicht durch PPAR α hervorgerufen wurde. Die Tatsache, dass sich WT- und PPAR α -KO-Mäuse hinsichtlich ihres Schilddrüsenhormonstatus unterscheiden, sollte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

Auch ein verstärkter Schilddrüsenhormonabbau in der Leber könnte an der fasteninduzierten Abnahme der Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma der Mäuse beteiligt gewesen sein. In der vorliegenden Arbeit war infolge des Fastens eine signifikante Zunahme der relativen mRNA-Konzentrationen von CAR und der CAR-abhängigen Enzyme UGT1A1 und Sult1A1 in der Leber zu beobachten, welche für die Ausscheidung von Schilddrüsenhormonen über die Galle und den Urin von Bedeutung sind. Die gefasteten WT-Tiere wiesen jedoch eine höhere hepatische mRNA-Konzentration von CAR und Sult1A1 als die gefasteten PPAR α -KO-Tiere auf. Demzufolge scheinen die unter Fastenbedingungen deutlich geringeren Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma der PPAR α -KO- gegenüber der WT-Tiere nicht durch eine vermehrte Ausscheidung sondern über eine stärkere Inhibierung der Schilddrüsenhormonsynthese hervorgerufen worden zu sein.

Am Transport der Schilddrüsenhormone über die Zellmembran und der damit verbundenen intrazellulären Aktivität der Schilddrüsenhormone sind die beiden Monocarboxylat-Transporter MCT8 und MCT10 beteiligt. Vorausgehende Studien belegten einen inversen Zusammenhang zwischen der Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma und der Genexpression der beiden Transporter. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte infolge des Fastens ein Anstieg der relativen mRNA-Konzentration von MCT10 im Hypothalamus, in der Hypophyse und der Schilddrüse bei gleichzeitiger Abnahme der Schilddrüsenhormone im Plasma der Tiere beobachtet werden, was auf eine Schilddrüsenhormon-abhängige MCT10-mRNA-Expression in diesen Organen schließen lässt. Im Gegensatz dazu nahm die relative mRNA-Konzentration von MCT8 in Hypothalamus, Schilddrüse und Leber der gefasteten

Tiere ab. Folglich scheinen die beiden MCT-Isoformen während des Fastens unterschiedlich reguliert zu werden. Zudem lassen die unter Fastenbedingungen beobachteten genotypspezifischen Unterschiede in der mRNA-Expression von MCT8 und MCT10 eine mögliche Beteiligung des PPAR α an der Regulation der beiden Transporter vermuten. Ein direkter Einfluss des PPAR α auf die Expression der beiden Schilddrüsenhormontransporter ist jedoch unwahrscheinlich, da sich die MCT8- und MCT10-mRNA-Konzentrationen in den untersuchten Geweben der WT- und PPAR α -KO-Tiere nach Behandlung mit WY 14.643 nicht unterschieden. In nachfolgenden Studien sollte daher untersucht werden, inwieweit die MCT8- und MCT10-Expressionen einer indirekten Regulation durch PPAR α unterliegen und ob dies möglicherweise für die fastenbedingten Veränderungen des Schilddrüsenhormonstoffwechsels von Bedeutung ist.

Neben seiner Rolle in der Anpassung des Stoffwechsels an das Fasten wird PPAR α mit einer verlängerten Lebensspanne sowie einem verzögerten Alterungsprozess in Verbindung gebracht und fungiert als Inhibitor inflammatorischer Prozesse in Immunzellen. Aus Nagerstudien ist bekannt, dass PPAR α tageszeitlichen Schwankungen unterliegt und in starker Wechselwirkung mit dem zirkadianen Schrittmacher BMAL1 steht. Es zeigte sich, dass sich PPAR α und BMAL1 gegenseitig auf Transkriptionsebene regulieren. Zudem wurde ein Einfluss der Nahrungsaufnahme und des Geschlechts auf das 24 h-Expressionsprofil von PPAR α beobachtet. Bislang ist weitgehend unbekannt, ob auch der Mensch geschlechtsspezifische PPAR α - und BMAL1-Tagesexpressionsprofile aufweist und inwieweit dabei die Nahrungsaufnahme von Bedeutung ist. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit im Rahmen zweier Humanstudien das 24 h-mRNA-Expressionsprofil von PPAR α und BMAL1 in Monozyten männlicher und weiblicher Probanden ermittelt. Die Studienteilnehmer erhielten entweder 4 geregelten Mahlzeiten oder fasteten über die 24-stündige Versuchsdauer. Dabei änderten sich die 24 h-mRNA-Expressionsprofile von PPAR α und BMAL1 der Frauen infolge des Fastens, während sie bei den Männern quantitativ und qualitativ unverändert blieben. Überraschenderweise unterschieden sich die PPAR α - und BMAL1-mRNA-Expressionsprofile der nicht-fastenden Männer und Frauen. Dagegen waren die PPAR α - und BMAL1-mRNA-Expressionsprofile der fastenden Männer und Frauen nahezu identisch. Folglich wiesen die nicht-fastenden Frauen einzigartige 24 h-Expressionsprofile von PPAR α und BMAL1 auf. Insgesamt deuten die aktuellen Ergebnisse auch beim Menschen auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in den Tages-mRNA-Expressionsprofilen der beiden Schlüsselregulatoren des Stoffwechsels in Abhängigkeit von

der Nahrungsaufnahme hin. Dieser Geschlechtsdimorphismus könnte möglicherweise mit dem energetischen Mehrbedarf von Frauen für die Reproduktion und der damit verbundenen höheren Empfindlichkeit gegenüber verfügbarer Nahrungsenergie in Zusammenhang stehen und dazu beigetragen haben, dass Frauen gegenüber Männern schneller fähig sind sich an metabolische Veränderungen anzupassen. Für die Humanmedizin sind die aktuellen Daten insoweit von Bedeutung, da PPAR α und BMAL1 zum einen Einfluss auf den Alterungsprozess und den zirkadianen Rhythmus zahlreicher Gene nehmen und zum anderen therapeutische Targets in der Behandlung von chronisch degenerativen Erkrankungen darstellen.

7. Summary

Fasting is associated with numerous metabolic changes, such as the mobilization of endogenous energy and the reduction of the energy expenditure. One of the major adaptations during fasting is the downregulation of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis that includes a decreased synthesis and secretion of TRH in the hypothalamus which in turn reduces TSH formation in the pituitary and T3 and T4 in the thyroid gland. The molecular mechanisms involved in these alterations are not completely understood. It is assumed that the transcription factor PPAR α could play a role in the fasting-induced downregulation of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis because PPAR α induces a series of adaptive metabolic responses upon fasting such as a stimulation of fatty acid oxidation and the synthesis of ketone bodies. Preliminary findings indicated a role of PPAR α in the regulation of TSH and TSH-induced processes in the thyroid gland. To elucidate the significance of PPAR α in the regulation of TSH and thyroid hormone synthesis during fasting, in-vitro studies with TSH-synthesizing cells and mice studies were conducted. For the in-vitro studies, the murine anterior pituitary tumor cell line T α T1 was used because they represent an appropriate thyroid-stimulating cell culture model to determine the effect of PPAR α on TSH synthesis. T α T1 cells show dose- and time-dependent decrease of TSH β mRNA concentration in response to T3 stimulation and express RXR, a heterodimerization partner of PPAR α and TRs. For this purpose, cells were incubated with synthetic and natural PPAR α agonists. It was found that the treatment of cells with synthetic and natural PPAR α agonists was associated with a decrease in TSH β mRNA concentration. The efficiency of PPAR α stimulation was assessed by the analysis of mRNA abundances of selected PPAR α target genes. The findings indicated that PPAR α could be involved in the regulation of TSH synthesis. To elucidate whether TSH constitutes a target gene of PPAR α , a TSH promoter analysis was performed. The sequence analysis of the murine TSH β promoter using NUBIScan software revealed 3 putative PPREs at positions -553 to -565, -4 to -16 and +381 to +393 relative to the transcriptional start site. For the subsequent luciferase assay, HepG2 cells were transiently transfected with TSH β promoter reporter gene construct and cotransfected with PPAR α and RXR α expression plasmids. The results did not show any luciferase activity upon treatment of the transfected cells with 100 μ M WY 14.643 for 24 hours, assuming that the selected TSH promoter region is not transcriptionally regulated by PPAR α .

To figure out whether PPAR α may also play a role in TSH regulation of animals, in-vivo

studies with WT and PPAR α -KO mice were conducted. The mice were either fasted for 48 hours or were given WY 14.643 once a day by gavage over a period of 4 days. Data show that fasting was accompanied by a higher mRNA level of the PPAR α target gene HMGCS2, indicating PPAR α activation in the pituitary upon fasting. In contrast to the in-vitro data, fasted PPAR α -KO mice exhibited lower pituitary TSH β mRNA concentration than fasted WT mice. In the second in-vitro study, a lower TSH mRNA concentration could be observed in the pituitary gland of ad libitum fed PPAR α -KO mice compared with ad libitum fed WT mice. The findings suggest that PPAR α is directly or indirectly involved in the regulation of the TSH synthesis. However, data from the fasting studies assume that activated PPAR α counteracts the fasting-induced downregulation of the TSH β mRNA expression level. The oral application of WY 14.643 decreased the TSH β mRNA concentration of PPAR α -KO mice but not of mice from the WT group. It is therefore unlikely that PPAR α directly influences the TSH β mRNA expression. In vivo TSH synthesis and secretion is regulated by numerous other neuronal and peripheral factors. TRH does not appear to be important for the observed changes in TSH β mRNA concentration in the present study as the relative TRH mRNA concentration in the hypothalamus of the mice was neither influenced by the genotype nor by the oral application of WY 14.643 and fasting. The relative mRNA concentrations of the TSH inhibitors TR β 2, DIO2 und TRHDE remained also unchanged during fasting. However due to fasting, the pituitary mRNA concentration of RXR, a further neuronal inhibitor of TSH mRNA expression, was significantly higher in PPAR α -KO mice than in WT mice. Furthermore, fasted PPAR α -KO mice compared to fasted WT mice showed a greater increase in the plasma concentration of unesterified fatty acids which are physiologically important RXR α ligands. Thus, RXR α was also activated to a greater degree in the pituitary gland of PPAR α -KO compared to WT mice and could therefore have contributed to the stronger decrease in the TSH β mRNA concentration of fasted PPAR α -KO mice. The fasting-induced reduction in the plasma concentration of leptin, a peripheral stimulator of TSH synthesis, could have been the cause of the decline in the TSH β mRNA concentration as a result of fasting. But it does not offer an explanation for the stronger decline in the TSH β mRNA concentration of the fasted PPAR α -KO compared to the fasted WT mice. The alteration of TSH β mRNA concentration was associated with appropriate changes in the mRNA concentrations of TSH-dependent genes in the thyroid gland and of the thyroid hormone concentrations in the plasma. Data from the current work show that the PPAR α effects in the thyroid cell line and the mouse model are inconsistent. It must therefore be assumed that the

fasting-induced decline in pituitary TSH synthesis and TSH-induced processes in the thyroid gland was not caused by PPAR α . The fact that PPAR α -KO and WT mice differ in their thyroid hormone status should be considered in future studies using these mouse models. Due to the role of thyroid hormones in the regulation of numerous metabolic processes, future studies must take into consideration that WT and PPAR α -KO mice differ in their T3 and T4 plasma levels.

An increase in thyroid hormone inactivation in the liver could also have caused the fasting-mediated reduction of thyroid hormone concentration in the plasma of the mice. In the present work, a significant increase in the relative mRNA concentration of CAR and CAR-dependent enzymes UGT1A1 and Sult1A1 in the liver was observed which are important for the biliary and urinary excretion of the thyroid hormones. Fasted WT mice exhibited a higher hepatic mRNA concentration of CAR and Sult1A1 than fasted PPAR α -KO mice. Consequently, the substantially lower thyroid hormone concentration in the plasma of PPAR α -KO compared to WT mice during fasting does not appear to be caused by increased excretion but rather by a stronger inhibition of thyroid hormone synthesis.

The transport of thyroid hormones across the cell membrane and the associated intracellular activity of thyroid hormones involve the monocarboxylate transporters MCT8 and MCT10. Previous studies have demonstrated an inverse association between the thyroid hormone concentration in the plasma and the gene expression of both transporters. The current findings show that fasting was associated with an increase in the relative mRNA concentration of MCT10 in the hypothalamus, pituitary and thyroid gland and a simultaneous decline of thyroid hormones in the plasma of mice which indicated a thyroid hormone-dependent MCT10 mRNA expression in these organs. In contrast, the relative mRNA concentration of MCT8 in the hypothalamus, thyroid gland and liver of the fasted mice diminished. It is therefore likely that both MCT isoforms were regulated in a different manner during fasting. Moreover, the observed genotype-specific differences in the mRNA expression of MCT8 and MCT10 during fasting suggest a possible involvement of PPAR α in the regulation of these two transporters. A direct impact of PPAR α on the expression of both thyroid hormone transporters is however unlikely as the MCT8 and MCT10 mRNA concentration in the analysed tissues of WT and PPAR α -KO mice does not differ upon treatment with WY 14.643. Whether the MCT8 and MCT10 mRNA expression is directly regulated by PPAR α and whether changes of both MCT mRNA levels during fasting may influence the thyroid hormone metabolism still needs to be addressed.

Beside its role in the adaptation of the metabolism to fasting, PPAR α is associated with a prolonged life span and a delayed aging process and functions as an inhibitor of inflammatory processes in immune cells. In rodents, PPAR α displays diurnal variations and strongly interacts with the circadian pacemaker BMAL1. It was found that PPAR α and BMAL1 cross-regulate each other at transcriptional level. Additionally, it was observed that food intake and gender exerted an influence on the PPAR α expression profile. So far, it is largely unknown whether humans also exhibit gender-specific PPAR α and BMAL1 diurnal expression profiles and how far the food intake is relevant within this context. Consequently, in the present work two human studies were carried out in which the 24 hours PPAR α and BMAL1 mRNA expression profiles in the monocytes of male and female subjects were determined. The study participants were given four regular meals or they fasted over a period of 24 hours. The 24 hours mRNA expression profiles of PPAR α and BMAL1 did not change in men when switching from feeding to fasting, whereas they changed qualitatively and quantitatively in women. Interestingly, the PPAR α and BMAL1 mRNA profiles of feeding men and women were different, whereas the profiles of fasting men and women were virtually identical. This finding indicates unique PPAR α and BMAL1 mRNA profiles of feeding women. Overall, the current results indicate that humans also exhibit a gender-specific difference in the diurnal mRNA expression profile of the two metabolic key regulators in response to caloric intake. This gender dimorphism could possibly be related to the additional reproduction-associated energy requirements of women and the related higher sensitivity to available food energy. This could contribute to the fact that women are able to adapt more quickly to metabolic changes in comparison to men.

The current findings have significance for human medicine as PPAR α and BMAL1 not only have an effect on the ageing process and circadian rhythm of numerous genes, but also represent therapeutic targets in the treatment of chronic degenerative disorders.

Literatur

Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE (2001): Critical role for thyroid hormone receptor $\beta 2$ in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J. Clin. Invest.* 107, 1017-1023

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS (1996): Role of the leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250-252

Aleksunes LM, Klaassen CD (2012): Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR α - and Nrf2-null-mice. *Drug Metab. Dispos.* 40, 1366-1379

Austad SN (2006): Why women live longer than men: sex differences in longevity. *Genet. Med.* 3, 79-92

Bauer K, Nowak P, Kleinkauf H (1981): Specificity of a serum peptidase hydrolysing thyroliberin at the pyroglutamyl histidine bond. *Eur. J. Biochem.* 118, 173-176

Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E (2007): Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426-37

Barbier O, Fontaine C, Fruchart JC, Staels B (2004): Genomic and non-genomic interactions of PPAR α with xenobiotic-metabolizing enzymes. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 324-330

Barbier O, Trottier J, Kaeding J, Caron P, Verreault M (2009): Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol. Cell. Biochem.* 326, 3-8

Bentley P, Calder I, Elcome C, Grasso P, Stringer D, Wiegand HJ (1993): Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food Chem. Toxicol.* 31, 875-907

Berger J, Moller DE (2002): The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409-435

Bodner M, Castrillo J, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M (1988): The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55, 505-518

Boelen A, Kwakkel J, Vos XG, Wiersinga WM, Fliers E (2006): Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor beta2 mRNA expression in mice. *J. Endocrinol.* 190, 537-544

Boelen A, Wiersinga WM, Fliers E (2008): Fasting induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid* 18, 123-129

- Bonduriansky R, Maklakov A, Zajitschek F, Brooks R (2008): Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Functional Ecology* 22, 443-453
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem. Bd.* 72, 248-254
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137, 354-366
- Canaple L, Rambaud O, Dkhissi-Benyahya, Rayet B, Tan NS, Michalik L, Delaunay F, Wahli W, Laudet V (2006): Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol. Endocrinol.* 20, 1715-1727
- Capelo LP, Beber EH, Fonseca TL, Gouveia CH (2009): The monocarboxylate transporter 8 and L-type amino acid transporters 1 and 2 are expressed in mouse skeletons and in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Thyroid.* 19, 171-180
- Chakravarthy MV, Zhu Y, Lopez M, Yin L, Wozniak DF, Coleman T, Hu Z, Wolfgang M, Vidal-Puig A, Lane MD, Semenkovich CF (2007): Brain fatty acid synthase activates PPARalpha to maintain energy homeostasis. *J. Clin. Invest.* 117, 2539-2552
- Chao PM, Chao CY, Lin FJ, Huang CJ (2001): Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P₄₅₀ A1 genes in rats and activates PPARalpha. *J. Nutr.* 131, 3166-3174
- Chikahisa S, Tominaga K, Kawai T, Kitaoka K, Oishi K, Ishida N, Rokutan K, Sei H (2008): Bezafibrate, a peroxisome proliferator-activated receptors agonist, decreases body temperature and enhances electroencephalogram delta-oscillation during sleep in mice. *Endocrinology* 149, 5262-5271
- Chowdhury I, Chien JT, Chatterjee A, Yu JY (2004): Effects of leptin and neuropeptide-Y on transcript levels of thyrotropin beta and common alpha subunits of rat pituitary cells in vitro. *Life Sci.* 75, 2897-2909
- Christoffolete MA, Ribeiro R, Singru P, Fekete C, da Silva WS, Gordon DF, Huang SA, Crescenzi A, Harney JW, Ridgway EC, Larsen PR, Lechan RM, Bianco AC (2006): Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explain the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism. *Endocrinology* 147, 1735-1743
- Clutton-Brock TH, Parker GA (1992): Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *The Quarterly Review of Biology* 67, 437-456
- Coppola A, Meli R, Diano S (2005): Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology* 146, 2827-2833

- Cullingford TE, Dolphin CT, Sato H (2002): The peroxisome proliferator-activated receptor alpha-selective activator ciprofibrate upregulated expression of genes encoding fatty acid oxidation and ketogenesis enzymes in rat brain. *Neuropharmacol.* 42, 724-730
- Daynes RA, Jones DC (2002): Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 748-759
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Berghe WV, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32048-32054
- Delerive P, Furman C, Teissier E, Fruchart JC, Duriez P, Staels B (2000): Oxidized phospholipids activate PPAR α in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett.* 471, 34-38
- Desvergne B, Wahli W (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649-688
- De Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjoval J, Perlmann T (2000): Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144
- Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL (1998): Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 139, 2879-2884
- Ding X, Lichti K, Kim I, Gonzalez FJ, Staudinger JL (2006): Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J. Biol. Chem.* 281, 26540-26551
- Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M (1999): Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor α interacting protein. *J. Biol. Chem.* 274, 15901-15907
- Dunn SE, Ousman SS, Sobal RA, Zuniga L, Baranzini SE, Youssef S, Crowell A, Loh J, Oksenberg J, Steinman L (2007): Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.* 204, 321-330
- Edgar AD, Tomkiewicz C, Costet P, Legendre C, Aggerbeck M, Bouguet J, Staels B, Guyomard C, Pineau T, Barouki R (1998): Fenofibrate modifies transaminase gene expression via a peroxisome proliferator activated receptor alpha-dependent pathway. *Toxicol. Lett.* 98, 13-23
- Fabbro D, Pellizzari L, Mercuri F, Tell G, Damante G (1998): Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 347-354

- Fekete C, Kelly J, Mihaly E, Sarkar S, Rand WM, Legradi G, Emerson CH, Lechan RM (2001): Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142, 2606-2613
- Fekete C, Lechan RM (2007): Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front. Neuroendocrinol.* 28, 97-114
- Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Beck-Sickinger A, Lechan RM (2002): Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 143, 4513-4519
- Fekete C, Singru PS, Sanchez E, Sarkar S, Christoffolete MA, Riberio RS, Rand WM, Emerson CH, Bianco AC, Lechan RM (2006): Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 147, 520-529
- Findlay KA, Kaptein E, Visser TJ, Burchell B (2000): Characterization of the uridin diphosphate-glucuronosyltransferase-catalyzing thyroid hormone glucuronidation in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2879-2883
- Fonseca TL, Correa-Medina M, Campos MP, Wittmann G, Werneck-de-Castro JP, Arrojo e Drigo R, Mora-Garzon M, Ueta CB, Caicedo A, Fekete C, Gereben B, Lechan RM, Bianco AC (2013): Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression. *J. Clin. Invest.* 123, 1492-1500
- Forman BM, Chen J, Evans RM (1997): Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4312-4317
- Friesema EC, Jansen J, Heuer H, Trajkovic M, Bauer K, Visser TJ (2006): Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2, 512-523
- Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ (2008): Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol. Endocrinol.* 22, 1357-1369
- Friesema EC, Jansen J, Milici C, Visser TJ (2005): Thyroid hormone transporters. *Vitam. Horm.* 70, 137-167
- Fruchart JC (2009): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 205, 1-8
- Gärtner R, Brabant G, Dralle H, Fischer M, Gimm O, Grüters A, Heinzeller T, Hintze G, Hörmann R, Janssen OE, Kahaly GJ, Köhrle J, Reiners C, Reinhardt W, Rendl J, Schmutzler C (2004): Schilddrüsenerkrankungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

- Gauthier K, Chaussande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J (1999): Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.* 18, 623-631
- Ghamari-Langroudi M, Vella KR, Srisai D, Sugrue ML, Hollenberg AN, Cone RD (2010): Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol. Endocrinol.* 24, 2366-2381
- Goldstein JT, Dobrzyn A, Clagett-Dame M, Pike JW, DeLuca HF (2003): Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 420, 185-193
- Gordon DF, Lewis SR, Haugen BR, James RA, McDermott MT, Wood WM, Ridgway EC (1997): Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 24339-24347
- Gurr JA, Vrontakis ME, Athanasian EA, Wagner CR, Kourides IA (1986): Hormonal regulation of thyrotropin alpha and beta subunit mRNAs. *Horm. Metab. Res.* 18, 382-385
- Gutgesell A, Wen G, König B, Koch A, Spielmann J, Stangl GI, Eder K, Ringseis R (2009): Mouse carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) is transcriptionally regulated by PPARalpha and PPARdelta in liver cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790, 1206-1216
- Hamilton-Craig I, Kostner KM, Woodhouse S, Colquhoun D (2012): Use of fibrates in clinical practice: Queensland Lipid Group consensus recommendation. *Int. J. Evid. Based. Healthc.* 10, 181-190
- Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjoorbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN (2001): Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J. Clin. Invest.* 107, 111-120
- Harris AR, Fang SL, Azizi F, Lipworth L, Vagenakis A, Braverman LE (1978): Effect of starvation on hypothalamic-pituitary-thyroid function in the rat. *Metabolism* 27, 1074-1083
- Hashimoto T, Fujita T, Usuda N, Cook W, Qi C, Peters JM, Gonzalez FJ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK (1999): Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty acid liver phenotype. *J. Biol. Chem.* 274, 19228-19236
- Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS (2000): Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.* 275, 28918-28928

Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ (2001): Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr. Rev.* 22, 451-476

Herbert E, Roberts J, Phillips M, Allan R, Hinman M, Budarf M, Policastro P, Rosa P (1980): Biosynthesis, processing and release of corticotropin, β -endorphin and melanocyte-stimulating hormone in pituitary cell culture systems. In: *Frontiers in Neuroendocrinology* Vol. 6, Raven Press NY p. 67-101

Herwig A, Wilson D, Logie TJ, Boelen A, Morgan PJ, Mercer JG, Barrett P (2009): Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the siberian hamster. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, 1307-1315

Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema EC, Visser TJ, Bauer K (2005): The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146, 1701-1706

Heuer H, Visser TJ (2009): Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology* 150, 1078-1083

Hillier AP (1970): The binding of thyroid hormones to phospholipid membranes. *J. Physiol.* 211, 585-597

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW (1989): Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244, 76-79

Hoyenga KB, Hoyenga KT (1982): Gender and energy balance: sex differences in adaptations for feast and famine. *Physiol. Behav.* 28, 545-563

Hu X, Lazar MA (1999): The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93-96

Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B (1997): Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J. Biol. Chem.* 272, 20108-20117

Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, Klierwer SA (2007): Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell. Metab.* 5, 415-425

Ingraham H, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG (1988): A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell.* 55, 519-529

- Inoue A, Yamamoto N, Morisawa Y, Uchimoto T, Yukioka M, Morisawa S (1989): Unesterified long-chain fatty acids inhibit thyroid hormone binding to the nuclear receptor. Solubilized receptor and the receptor in cultured cells. *Eur. J. Biochem.* 183, 565-572
- Ishida N (2009): Role of PPAR α in the control of torpor through FGF21-NPY pathway: From circadian clock to seasonal change in mammals. *PPAR Res.* 2009, 412949
- Issemann I, Green S (1990): Activation of a number of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650
- Jalouli M, Carlsson L, Ameen C, Linden D, Ljungberg A, Michaelik L, Eden S, Wahli W, Oscarsson J (2003): Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression: influence of pituitary and gonadal hormones. *Endocrinology* 144, 101-109
- Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ (2005): Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15, 757-768
- Janssen J, Sharma V, Pugazhenthii U, Sladek C, Wood WM, Haugen BR (2011): A rexinoid antagonist increases the hypothalamic-pituitary-thyroid set point in mice and thyrotrope cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 339, 1-6
- Jones PM, Withers DJ, Ghatgei MA, Bloom SR (1992): Evidence for neuromedin-B synthesis in the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* 130, 1829-1836
- Judge-Aubry CE, Gorla-Bajszczak A, Pernin A, Lemberger T, Wahli W, Burger AG, Meier CA (1995): Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine zipper-like heptad repeat. *J. Biol. Chem.* 270, 18117-18122
- Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O (2005): Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* 135, 2503-2506
- Jun M, Zhu B, Tonelli M, Jardine MJ, Patel A, Neal B, Liyanage T, Keech A, Cass A, Perkovic V (2012): Effects of fibrates in kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20, 2061-2071
- Kast-Woelberg HR, Dana SL, Cesario RM, Sun L, de Grandpre LY, Brooks ME, Osburn DL, Reifel-Miller A, Klausning K, Leibowitz MD (2004): Rosiglitazone induction of Insig-1 in white adipose tissue reveals a novel interplay of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and sterol regulatory element-binding protein in the regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 23908-23915
- Keller H, Givel F, Perroud M, Wahli W (1995): Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.* 9, 794-804

Kennedy JA, Nicolson R, Wellby ML (1994): The effect of oleic acid on the secretion of thyrotrophin and growth hormone by cultured rat anterior pituitary cells. *J. Endocrinol.* 143, 557-564

Kersten S, Desvergne B, Wahli W (2000): Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421-424

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103, 1489-1498

Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1992): Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355, 446-449

Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W (1997): Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* 11, 779-791

Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H (2001): Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J. Biol. Chem.* 276, 17221-17228

Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, Enomoto A, Cha SH, Goya T, Endou H (2002): The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics* 79, 95-103

Kim MS, Small CJ, Russell SH, Morgan DG, Abbott CR, alAhmed SH, Hay DL, Ghattei MA, Smith DM, Bloom SR (2002): Effects of melanocortin receptor ligands on thyrotropin-releasing hormone release: evidence for the differential roles of melanocortin 3 and 4 receptors. *J. Neuroendocrinol.* 14, 276-282

Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Ghattei MA, Bloom SR (2000): The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J. Clin. Invest.* 105, 1005-1011

Kinlaw WB, Schwartz HL, Oppenheimer JH (1985): Decreased serum triiodothyronine in starving rats is due primarily to diminished thyroidal secretion of thyroxine. *J. Clin. Invest.* 75, 1238-1241

König B, Fischer S, Schlotte S, Wen G, Eder K, Stangl GI (2010): Monocarboxylate transporter 1 and CD147 are up-regulated by natural and synthetic peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists in livers of rodents and pigs. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1248-1256

- König B, Koch A, Giggel K, Dordschbal B, Eder K, Stangl GI (2008): Monocarboxylate transporter (MCT)-1 is up-regulated by PPARalpha. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780, 899-904
- König B, Rauer C, Rosenbaum S, Brandsch C, Eder K, Stangl GI (2009): Fasting upregulates PPAR α target genes in brain and influences pituitary hormone expression in a PPAR α dependent manner. *PPAR Res.* 2009, 801609
- Kohn LD, Shimura H, Shimura Y, Hidaka A, Giuliani C, Napolitano G, Ohmori M, Laglia G, Saji M (1995): The thyrotropin receptor. *Vitam. Horm.* 50, 287-384
- Kokko H, Jennions MD (2008): Parental investment, sexual selection and sex ratios. *J. Evol. Biol.* 21, 919-948
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lechan RM, Segerson TP (1989): Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain. Observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 553, 29-59
- Lechan RM, Qi Y, Jackson IM, Mahdavi V (1994): Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 135, 92-100
- Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ (1995): Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012-3022
- Lee SS, Chan WY, Lo CK, Wan DC, Tsang DS, Cheung WT (2004): Requirement of PPAR α in maintaining phospholipid and triacylglycerol homeostasis during energy deprivation. *J. Lipid Res.* 45, 2025-2037
- Lee S, Young BM, Wan W, Chan IH, Privalsky ML (2011): A mechanism for pituitary-resistance to thyroid hormone (PRTH) syndrome: a loss in cooperative coactivator contacts by thyroid hormone receptor (TR) β 2. *Mol. Endocrinol.* 25, 1111-1125
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Christancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ Jr., Liu XS, Lazar MA (2008): PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes. Dev.* 22, 2941-2952
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM (1997): Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138, 2569-2576

Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier JM, Mader S, Chambon P (1992): Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395

Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J (1996): Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J. Biol. Chem.* 271, 1764-1769

Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP (1999): A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7473-7478

Leuenberger N, Pradervand S, Wahli W (2009): Sumoylated PPARalpha mediates sex-specific gene repression and protects the liver from estrogen-induced toxicity in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3138-3148

Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N (1997): Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 5568-5573

Liu Y, Ordovas JM, Gao G, Province M, Straka RJ, Tsai MY, Lai CQ, Zhang K, Borecki I, Hixson JE, Allison DB, Arnett DK (2008): The SCARB1 gene is associated with lipid response to dietary and pharmacological interventions. *J. Hum. Genet.* 53, 709-717

Lundåsen T, Hunt MC, Nilsson LM, Sanyal S, Angelin B, Alexson SE, Rudling M (2007): PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 437-440

Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA (2002): Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol. Pharmacol.* 62, 638-646

Maglich JM, Watson J, McMillen PJ, Goodwin B, Willson TM, Moore JT (2004): The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J. Biol. Chem.* 279, 19832-19838

Mandard S, Müller M, Kersten S (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life. Sci.* 61, 393-416

Martin C, Bean R, Rose K, Habib F, Seckl J (2001): Cyp7b1 catalyses the 7alpha-hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate. *Biochem. J.* 355, 509-515

Marrapodi M, Chiang JY (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and agonist inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J. Lipid. Res.* 41, 514-520

- Masternak M, Bartke A (2007): PPARs in calorie restricted and genetically long-lived mice. *PPAR Res.* 2007, 28436
- Mebis L, Paletta D, Debaveye Y, Ellger B, Langouche L, D'Hoore A, Darras VM, Visser TJ, Van den Berghe G (2009): Expression of thyroid hormone transporters during critical illness. *Eur. J. Endocrinol.* 161, 243-250
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels BM, Wahli W (2006): International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 726-741
- Mitsuma T, Hirroka Y, Nogimori T (1993): Effects of immunoneutralization of endogenous opioid peptides on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in rats. *Horm. Res.* 39, 77-80
- Miyai S, Yoshimura S, Iwasaki Y, Takekoshi S, Lloyd RV, Osamura RY (2005): Induction of GH, PRL, and TSH beta mRNA by transfection of Pit-1 in a human pituitary adenoma-derived cell line. *Cell. Tissue. Res.* 322, 269-277
- Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV (1998): Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47, 294-297
- Mol JA, Visser TJ (1985): Rapid and selective inner ring deiodination of thyroxine sulfate by rat liver deiodinase. *Endocrinology* 117, 8-12
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP (2004): Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123, 131-145
- Mosmann, T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* Bd. 65, 55-63
- Moura EG, Moura CC (2004): Regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 48, 40-52
- Moya-Camarena SY, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA (1999): Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *J. Lipid. Res.* 40, 1426-1433
- Munoz A, Bernal J (1997): Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.* 137, 433-445

- Muzzio AM, Noyes PD, Stapleton HM, Lema SC (2013): Tissue distribution and thyroid hormone effects on mRNA abundance for membrane transporters Mct8, Mct10, and organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in a teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 167, 77-89
- Nakagano K, Matsushita A, Sasaki S, Misawa H, Nishiyama K, Kashiwabara Y, Nakamura H (2004): Thyroid-hormone-dependent negative regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone receptors: study with a new experimental system using CV1 cells. *Biochem. J.* 378, 549-557
- Nakamura KI, Inoue I, Takahashi S, Komoda T, Katayama S (2008): Cryptochrome and period proteins are regulated by the CLOCK/BMAL1 gene: crosstalk between the PPARs/RXR α -regulated and CLOCK/BMAL1-regulated systems. *PPAR Res.* 2008, 348610
- Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Duriez P, Staels B, Jude B (2001): PPAR α agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation* 103, 207-212
- Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS (2000): Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 36124-36133
- Nishimura M, Naito S (2008): Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 23, 22-44
- Oishi K, Uchida D, Ishida N (2008): Circadian expression of FGF21 is induced by PPAR α activation in the mouse liver. *FEBS Lett.* 582, 3639-3642
- Oliveira KJ, Ortiga-Carvalho TM, Cabanelas A, Veiga MA, Aoki K, Ohki-Hamazaki H, Wada K, Wada E, Pazos-Moura CC (2006): Disruption of neuromedin B receptor gene results in dysregulation of the pituitary-thyroid axis. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 73-80
- Ortiga-Carvalho TM, Curty FH, Pazos-Moura CC (1995): Acute effect of thyroxine on pituitary neuromedin B content of hypothyroid rats and its correlation with TSH secretion. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 715-719
- Ortiga-Carvalho TM, Curty FH, Nascimento-Saba CC, Moura EG, Polak J, Pazos-Moura CC (1997): Pituitary neuromedin B content in experimental fasting and diabetes mellitus and correlation with thyrotropin secretion. *Metabolism* 46, 149-153
- Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC (2002): The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. *J. Endocrinol.* 174, 121-125
- Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Morales MM, Martins VP, Pazos-Moura CC (2003): Thyrotropin secretagogues reduce rat pituitary neuromedin B, a local thyrotropin release inhibitor. *Exp. Biol. Med.* 228, 1083-1088

Ortiga-Carvalho TM, Polak J, McCann S, Pazos-Moura CC (1996): Effect of thyroid hormones on pituitary neuromedin B and possible interaction between thyroid hormones and neuromedin B on thyrotropin secretion. *Regul. Pept.* 14, 47-53

Palmer CN, Hsu MH, Griffin HJ, Johnson EF (1995): Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling. *J. Biol. Chem.* 270, 16114-16121

Patel DD, Knight BL, Wiggins D, Humphreys SM, Geoffrey FG (2001): Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR α -deficient mice. *J. Lipid Res.* 42, 328-337

Perello M, Nillni EA (2007): The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (pro-TRH). *Front. Biosci.* 12, 3554-3565

Peters JM, Cheung C, Gonzalez FJ (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J. Mol. Med.* 83, 774-784

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45

Podvynec M, Kaufmann MR, Handschin C, Meyer UA (2002): NUBIScan, an in silico approach for prediction of nuclear receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* 16, 1269-1279

Portulano C, Paroder-Belenitsky M, Carrasco N (2014): The Na⁺/I⁻ symporter (NIS): mechanism and medical impact. *Endocr. Rev.* 35, 106-149

Postiglione MP, Parlato R, Rodriguez-Mallon A, Rosica A, Mithbaokar P, Maresca M, Mirians RC, Davies TF, Zannini MS, De Felice M, Di Lauro R (2002): Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *PNAS* 99, 15462-15467

Pusl T, Beuers U (2007): Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet. J. Rare. Dis.* 2, 26

Qatanani M, Zhang J, Moore DD (2005): Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 146, 995-1002

Qi C, Zhu Y, Reddy JK (2000): Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell. Biochem. Biophys.* 32 Spring, 187-204

Rakhshandehroo M, Sanderson LM, Matilainen M, Stienstra R, Carlsberg C, de Groot PJ, Müller M, Kersten S (2007): Comprehensive analysis of PPARalpha-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. *PPAR Res.* 2007, 26839

- Ramadan T, Camargo SM, Summa V, Hunziker P, Chesnov S, Pos KM, Verrey F (2006): Basolateral aromatic amino acid transporter TAT1 (Slc16a10) functions as an efflux pathway. *J. Cell. Physiol.* 206, 771-779
- Rao MS, Reddy JK (1987): Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 8, 631-636
- Ringseis R, Keller J, Lukas I, Spielmann J, Most E, Couturier A, König B, Hirche F, Stangl GI, Wen G, Eder K (2013): Treatment with pharmacological PPAR α agonists stimulates the ubiquitin proteasome pathway and myofibrillar protein breakdown in skeletal muscle of rodents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 2105-2017
- Robbins J, Rall JE (1960): Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol. Rev.* 40, 415-489
- Roman R (2002): P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.* 82, 131-185
- Samuels HH, Stanley F, Casanova J (1979): Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. *Endocrinology* 105, 80-85
- Sanchez VC, Goldstein J, Stuart RC, Hovanesian V, Huo L, Munzberg H, Friedman TC, Bjorbaek C, Nillni EA (2004): Regulation of hypothalamic prohormone convertases 1 and 2 and effects on processing of prothyrotropin-releasing hormone. *J. Clin. Invest.* 114, 357-369
- Schaner P, Todd RB, Seidah NG, Nillni EA (1997): Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 272, 19958-19968
- Schomburg L, Bauer K (1995): Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136, 3480-3485
- Sharma V, Hays WR, Wood WM, Pugazhenti U, St Germain DL, Bianco AC, Krezel W, Chambon P, Haugen BR (2006): Effects of rexinoids on thyrotrope function and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 147, 1438-1451
- Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, Tezuka M, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y, Komiyama K, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K, Saito M (2011): Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One* 6, e25231
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996a): Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* 37, 907-925

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996b): The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302, 93-109

Schussler GC (2000): The thyroxine-binding proteins. *Thyroid.* 10, 141-149

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996): Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98, 1101-1106

Shirai H, Oishi K, Kudo T, Shibata S, Ishida N (2007): PPAR α is a potential therapeutic target of drugs to treat circadian rhythm sleep disorders. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 679-682

Singh MP, Pathak D, Sharma GK, Sharma CS (2011): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): a target with a broad therapeutic potential for human diseases: an overview. *Pharmacology online* 2, 58-89

Smith AI, Funder JW (1988): Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinol. Rev.* 9, 159-179

Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, Hori RT, Cook GA, Park EA (2010): Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol. Cell Endocrinol.* 325, 54-63

Spaner DE, Lee E, Shi Y, Wen F, Li Y, Tung S, McCaw L, Wong K, Gary-Gouy H, Dalloul A, Ceddia R, Gorczynski R (2013): PPAR-alpha is a therapeutic target for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 27, 1090-1099

Sparks LM, Pasarica M, Sereda O, deJonge L, Thomas S, Loggins H, Xie H, Miles JM, Smith SR (2009): Effect of adipose tissue on the sexual dimorphism in metabolic flexibility. *Metabolism* 58, 1564-1571

Stavinoha MA, Rayspellicy JW, Hart-Sailors ML, Mersmann HJ, Bray MS, Young ME (2004): Diurnal variations in the responsiveness of cardiac and skeletal muscle to fatty acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E878-E887

Sülzle A, Hirche F, Eder K (2004): Thermally oxidized dietary fat upregulates the expression of target genes of PPARalpha in rat liver. *J. Nutr.* 134, 1375-1383

Takagi A, Sai K, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y (1992): Hepatomegaly is an early biomarker for hepatocarcinogenesis induced by peroxisome proliferators. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 11, 145-149

Tan NS, Michalik L, Desvergne B, Wahli W (2005): Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 93, 99-105

Trottier J, Caron P, Straka RJ, Barbier O (2011): Profile of serum bile acids in noncholestatic volunteers: gender-related differences in response to fenofibrate. *Clin. Pharmacol. Ther.* 90, 279-286

Umetani M, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, Korach KS, Shaul PW, Mangelsdorf DJ (2007): 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat. Med.* 13, 1185-1192

van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Themmen AP, de Jong FH, Valentijn K, Vaundry H, Bauer K (1995): Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of pro-TRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J. Endocrinol.* 145, 143-153

Vansell NR, Klaassen CD (2002): Increase in rat liver UDP-glucuronosyltransferase mRNA by microsomal enzyme inducers that enhance thyroid hormone glucuronidation. *Drug Metabol. Dispos.* 30, 240-246

Vella KR, Ramadoss P, Lam FS, Harris JC, Ye FD, Same PD, O'Neill NF, Maratos-Flier E, Hollenberg AN (2011): NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways. *Cell. Metab.* 14, 780-790

Visser TJ, Kaptein E, van Toor H, van Raaij JA, van den Berg KJ, Joe CT, van Engelen JG, Brouwer A (1993): Glucuronidation of thyroid hormone in rat liver: effects of in vivo treatment with microsomal enzyme inducers and in vitro assay conditions. *Endocrinology* 133, 2177-2186

Visser TJ (1994): Role of sulfatation in thyroid hormone metabolism. *Chem. Biol. Interact.* 92, 293-303

Visser TJ (1996): Pathways of TH metabolism. *Acta. Med. Austriaca.* 23, 10-16

Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR (1991): Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 51, 2515-2520

Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gerbois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B (1998): The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor α and rev-erba mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J. Biol. Chem.* 273, 25713-25720

Wahli W (2002): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med. Wkly.* 132, 83-91

- Wahlstrom GM, Sjoberg M, Andersson M, Nordstrom K, Vennström B (1992): Binding characteristics of the thyroid hormone receptor homo- and heterodimers to consensus AGGTCA repeat motifs. *Mol. Endocrinol.* 6, 1013–1022
- Wang T, Shah YM, Matsubara T, Zhen Y, Tanabe T, Nagano T, Fotso S, Krausz KW, Zabriskie TM, Idle JR, Gonzalez FJ (2010): Control of steroid 21-oic acid synthesis by peroxisome proliferator-activated receptor α and role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Biol. Chem.* 285, 7670-7685
- Watts GF, Dimmitt SB (1999): Fibrates, dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 10, 561-574
- Weihe WH (1987): The laboratory rat. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals 6. Auflage, *Longman Scientific & Technical*, London, 309-330
- Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF (1984): Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology* 114, 1099–1107.
- Wen G, Ringseis R, Eder K (2010): Mouse OCTN2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) via a PPRE located in the first intron. *Biochem. Pharmacol.* 79, 768-776
- Wienecke N, Hirsch-Ernst KI, Kuna M, Kersten S, Püschel GP (2007): PPAR α -dependent induction of the energy homeostasis-regulating nuclear receptor NR1h3 (CAR) in rat hepatocytes: Potential role in starvation adaptation. *FEBS Lett.* 581, 5617-5626
- Wienecke N, Neuschäfer-Rube F, Bode LM, Kuna M, Andres J, Carnevali Jr. LD, Hirsch-Ernst KI, Püschel GP (2009): Synergistic acceleration of thyroid hormone degradation by phenobarbital and the PPAR α agonist WY14643 in rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 240, 99-107
- Wiersinga WM, Chopra IJ, Teco GN (1988): Inhibition of nuclear T3 binding by fatty acids. *Metabolism* 37, 996-1002
- Williams GC (1957): Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11, 398-411
- Wood WM, Dowding JM, Gordon DF, Ridgway EC (1999): An upstream regulator of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene mediates pituitary cell type activation and repression by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 15526-15532
- Wood WM, Ocran KW, Gordon DF, Ridgway EC (1991): Isolation and characterization of mouse complementary DNAs encoding α and β thyroid hormone receptors from thyrotrope cells: the mouse pituitary-specific β 2 isoform differs at the amino terminus from the corresponding species from rat pituitary tumor cells. *Mol. Endocrinol.* 5, 1049-1061

- Xu J, Kalkarni SR, Li L, Slitt AL (2011): UDP-glucuronosyltransferase expression in mouse liver is increased in obesity- and fasting-induced steatosis. *Drug Metab. Dispos.* 40, 259-266
- Yamamoto Y, Moore R, Hess HA, Guo GL, Gonzalez FJ, Korach KS, Maronpot RR, Negishi M (2006): Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* 281, 16625-16631
- Yang MU, Presta E, Björntorp P (1990): Refeeding after fasting in rats: effects of duration of starvation and refeeding on food efficiency in diet-induced obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, 970-978
- Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ, Evans RM (2006): Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* 126, 801-810
- Yang X, Zhang YK, Esterly N, Klaassen CD, Wan YJ (2009): Gender disparity of hepatic lipid homeostasis regulated by circadian clock. *J. Biochem.* 145, 609-623
- Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, Mc Mahon G, Browni M, Lazar MA (1995): Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.* 270, 23975-23983
- Yusta B, Alarid ET, Gordon DF, Ridgway EC, Mellon PL (1998): The thyrotropin β -subunit gene is repressed by thyroid hormone in a novel thyrotrope cell line, mouse T α T1 cells. *Endocrinology* 139, 4476-4482
- Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Lauro R (1992): Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4230-4241
- Zarrilli R, Formisano S, Di Jeso B (1990): Hormonal regulation of thyroid peroxidase in normal and transformed rat thyroid cells. *Mol. Endocrinol.* 4, 39-45

Lebenslauf

Name: Wege
Vorname: Nicole
Geburtsdatum: 12.11.1982
Geburtsort: Weißenfels
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1989-1993 Karl Marx Grundschule, Lutherstadt Wittenberg
1993-1995 Lucas-Cranach-Gymnasium, Lutherstadt Wittenberg
1995-2002 Burg-Gymnasium, Wettin
Abschluss: Abitur (2002)

Akademische Ausbildung: 2002-2008 Studium der Ernährungswissenschaften
am Institut für Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Abschluss: Diplom (2008)

Thema der Diplomarbeit: *„Einfluss einer Fasten-
induzierten PPAR α -Aktivierung auf den Carnitin-
stoffwechsel beim Schwein als nichtproliferierende
Spezies“*

2009-2013 Promotionsstudium der Ernährungswissenschaften
am Institut für Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Graduiertenstipendium des Landes Sachsen-Anhalt
(2009-2011)

Berufstätigkeit: seit 03.2014 wissenschaftliche Mitarbeiterin
bei der Verbraucherzentrale Sachsen-Anhalt e.V.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit zum Thema „Studien zur Bedeutung des PPAR α für die Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreises sowie zu humanspezifischen Einflussfaktoren auf die PPAR α -Expression“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Es wurden bisher keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen. Die Arbeit wurde bislang in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde/Fakultät vorgelegt.

Ort, Abgabedatum

Nicole Wege

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriele I. Stangl für die Vergabe des interessanten Themas, die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Ernährungswissenschaften, die konstruktiven Konsultationen, die angenehme Zusammenarbeit beim Schreiben der Veröffentlichungen und die Anregungen beim Anfertigen der Dissertationsschrift.

Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Alexandra Schutkowski und Frau Dr. Bettina König für ihre tatkräftige Unterstützung. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen, kompetenten Ratschläge sowie ihre unausschöpfliche Geduld kamen mir im Verlauf meiner Doktorandenzeit in vielerlei Hinsicht zu Gute.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Corinna Brandsch für die Hilfe bei den tierexperimentellen Versuchen und für die Bestimmung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma bedanken.

Bei Prof. Dr. Ivo Große vom Institut für Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und bei Diplom-Bioinformatiker Markus Bönn vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH-UFZ bedanke ich mich für die bioinformatische und statistische Auswertung der Humanstudien und ihren hilfreichen Anmerkungen zur Veröffentlichung dieser Daten.

Der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Heuer des Leibniz-Instituts für Altersforschung, Fritz-Lipmann-Institut e.V. in Jena, insbesondere Frau Dr. Liebsch, danke ich für die Durchführung der *in-situ*-Analysen sowie für die Gewährung interessanter Einblicke in ihre Forschungsarbeit.

Ein Dank geht an Herrn Dr. Axel Schlitt, der eine hervorragende Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Kröllwitz und damit die Durchführung der Humanstudien ermöglichte.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Ernährungswissenschaften, insbesondere den technischen Kräften Frau Ingeborg Kaiser und Frau Heike Giese sowie allen Doktoranden und Diplomanden für die bereitwillige Mitarbeit bei der Probenentnahme und -aufbereitung.

Meinen beiden Büromitinsassinnen, Frau Dr. Nicole Blum und Frau Dr. Kristin Müller, möchte ich für die zahlreichen anregenden Diskussionen, die stetige Hilfsbereitschaft und die gemeinsamen, entspannten Abende danken. Schön war's mit Euch!

Der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt danke ich für die Gewährung des Graduiertenstipendiums.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund, meiner Familie und allen meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung und die aufmunternden Worte zur rechten Zeit bedanken. Danke auch dafür, dass ihr während der gesamten Doktorandenzeit so geduldig mit mir wart und immer an mich geglaubt habt!