
Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel

Physiologische Bedeutung der Schilddrüsenrezeptorvariante TR α 1

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät der
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Maximilian Dominik Groeben
aus Düsseldorf
2021

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/75901

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20220610-080339-0

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. L. Möller

2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Andreas Bockisch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 2022

1.	INHALTSVERZEICHNIS	3
2.	EINLEITUNG	5
2.1	Schilddrüsenhormonsynthese und -regulation.....	5
2.1.1	Schilddrüsenhormonsynthese	5
2.1.2	Schilddrüsenhormonfreisetzung	6
2.1.3	Regulation durch Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH, Thyreotropin) .	6
2.2	Schilddrüsenrezeptoren.....	7
2.2.1	Gen	7
2.2.2	Wirkungsmechanismen.....	9
2.2.3	Physiologische Wirkungen	13
2.2.4	TR α -Varianten	15
3.	FRAGESTELLUNGEN UND ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	19
4.	MATERIAL UND METHODEN	20
4.1	Materialliste	20
4.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	20
4.1.2	Technische Utensilien	22
4.1.3	Antikörper	23
4.1.4	Verwendete Plasmide	23
4.1.5	Verwendete Kits	24
4.1.6	Verbrauchsgegenstände.....	24
4.1.7	Primer	25
4.2	Methoden	26
4.2.1	Herstellung der TR α Δ 1-c-flag-Variante via Mutagenese PCR und TR α -c-flag-Plasmids.....	26
4.2.2	Zellkultur	27
4.2.3	Dual-Luciferase-Assay	28
4.2.4	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	30
4.2.5	Western-Blot	32
4.2.6	Electro mobility shift assay (EMSA)	33
4.2.7	Statistische Analyse.....	34

5.	ERGEBNISSE	35
5.1	Erzeugung einer TR α Δ 1-c-flag-Variante und deren Nachweis	35
5.2	Wirkung des TR α Δ 1 auf die Genexpression	36
5.3	Lokalisation der TR α Δ 1-c-flag-Variante in der Zelle	38
5.4	DNA/Protein-Interaktionen zwischen TR α WT, TR α Δ 1 und RXR	40
6.	DISKUSSION	42
7.	ZUSAMMENFASSUNG	45
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	46
9.	TABELLENVERZEICHNIS	53
10.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	54
11.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	56
12.	DANKSAGUNG	58
13.	LEBENS LAUF.....	59

2. EINLEITUNG

Schilddrüsenhormone sind essenziell für eine regelgerechte fetale Entwicklung sowie für die Homöostase im adulten Gewebe. Ein Mangel der Hormone in frühen Stadien der Entwicklung kann zu irreversiblen Schäden wie z.B. Taubheit und geistiger Retardierung führen (Oppenheimer and Schwartz, 1997). Im Erwachsenenalter üben Schilddrüsenhormone einen wichtigen Einfluss auf den Metabolismus, u.a. den Fettstoffwechsel und den Wärmehaushalt des menschlichen Körpers, sowie die Herzfrequenz aus.

2.1 Schilddrüsenhormonsynthese und -regulation

2.1.1 Schilddrüsenhormonsynthese

Innerhalb der Schilddrüse bilden mikroskopisch kleine Follikel zusammen mit Blutkapillaren eine angiofollikuläre Einheit. Die Follikelepithelzellen (Thyreozyten) sind polar organisiert und besitzen je eine basolaterale sowie eine apikale Membran (bestehend aus einem einschichtigen, polarisierten Epithel). Die basolaterale Membran ist den Kapillaren und die apikale Seite des mit Kolloid gefülltem Lumen zugewandt. An der basolateralen Wand sind TSH-Rezeptoren lokalisiert, die Einfluss auf die Funktions- und Wachstumsregulation der Thyreozyten, den Iodidtransport in die Zelle sowie auf die Sekretion der Schilddrüsenhormone nehmen. An der apikalen Seite der Membran finden sich Enzymsysteme für die Schilddrüsenhormonsynthese. Hier spielt das Thyreoglobulin als Synthese- und Speicherprotein eine entscheidende Rolle.

Nachdem Iod über den Natrium-Iodid-Symporter gegen das Konzentrationsgefälle in die Follikelepithelzelle gelangt, wird es passiv, wahrscheinlich über die Transporter Pendrin und Anoctamin, über die apikale Membran ins Kolloid abgegeben. An der apikalen Membran sind die Enzymsysteme Thyreoperoxidase (TPO) sowie Dualoxidase (DUOX) 1 und 2 verankert, die für die Synthese der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T₃) und Tetraiodthyronin (T₄ oder auch L-Thyronin) benötigt werden. Es folgt die Organifizierung der Tyrosylreste des Thyreoglobulins durch Einbau von Iod. Iod wird durch die Thyreoperoxidase (TPO) mittels Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oxidiert. H₂O₂ wird durch die Dualoxidasen 1 und 2 zur Verfügung gestellt.

Im nächsten Schritt werden zwei benachbarte Iodotyrosylreste ebenfalls durch die TPO verbunden. Hierdurch entstehen aus zwei Diiodthyrosin bzw. einem Diiodthyrosin und einem Monoiodthyrosin T₄ und T₃. Durch Peptidbindungen verbleiben die beiden Hormone im Lumen an Thyreoglobulin gebunden und werden dort gespeichert (Blum/Müller-Wieland, 2020).

2.1.2 Schilddrüsenhormonfreisetzung

Da die Hormone außerhalb der Schilddrüse ihre Wirkung entfalten, müssen sie erst freigesetzt und ins Blut sezerniert werden. Das Thyreoglobulin wird am ehesten durch Pinozytose in die Thyreozyten aufgenommen. Dort werden von Endopeptidasen wie Cathepsin D, H und L T₃ und T₄ von dem Thyreoglobulin gelöst. Vermutlich werden diese anschließend durch den spezifischen Transporter Monocarboxylattransporter 8 (MCT 8) über die Zellmembran in die Kapillaren geschleust, welcher ebenfalls auch zu großen Teilen dafür verantwortlich ist, T₃ und T₄ in Gehirn, Leber, Niere und Herz wieder aufzunehmen (Blum/Müller-Wieland, 2020).

2.1.3 Regulation durch Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH, Thyreotropin)

Von der Hypophyse gebildet, bindet TSH an der apikalen Membran des Thyreozyten an den TSH-Rezeptor. TSH beeinflusst fast alle Parameter des Schilddrüsenmetabolismus und der Funktion. Es reguliert praktisch jeden Schritt der Schilddrüsenhormonsynthese und der Freisetzung, die Induktion von Transkriptionsfaktoren, die Entwicklung und das Wachstum der Schilddrüse (Blum/Müller-Wieland, 2020). Dieser Prozess unterliegt einer Feedback-Kontrolle der zirkulierenden Schilddrüsenhormonkonzentrationen über die Hypothalamus-Adenohypophyse-Schilddrüse-Achse (Weiss et al., 1997) (Shibusawa et al., 2003b). T₄ wird von der Schilddrüse sezerniert und in der Peripherie durch Dejodasen zu T₃ umgewandelt. T₃ wiederum bindet als wirksame Form an die Schilddrüsenhormonrezeptoren (Thyroid hormone receptor, TR) α und β , die abhängig vom Zelltyp unterschiedlich stark exprimiert werden und deren Gene auf den Chromosomen 3 und 17 liegen (Lazar, 1993b).

2.2 Schilddrüsenrezeptoren

2.2.1 Gen

Die Gene, die für Schilddrüsenrezeptoren codieren, liegen auf den Genloci v-erbA und v-erbB. Ihre Aminosäuresequenz ist das zelluläre Pendant zu einem Produkt des onkogenen viralen erbA- bzw. THRA- und erbB- bzw. THRB-Gens (Jansson et al., 1983; Sap et al., 1986; Vennström and Bishop, 1982; Weinberger et al., 1986). Strukturell gehören Schilddrüsenhormonrezeptoren der übergeordneten Familie der nukleären Hormonrezeptoren an und besitzen große Ähnlichkeit unter anderem mit Steroidhormonrezeptoren, Vitamin-D-Rezeptoren und Sexualhormonrezeptoren (Mitsubishi et al., 1988).

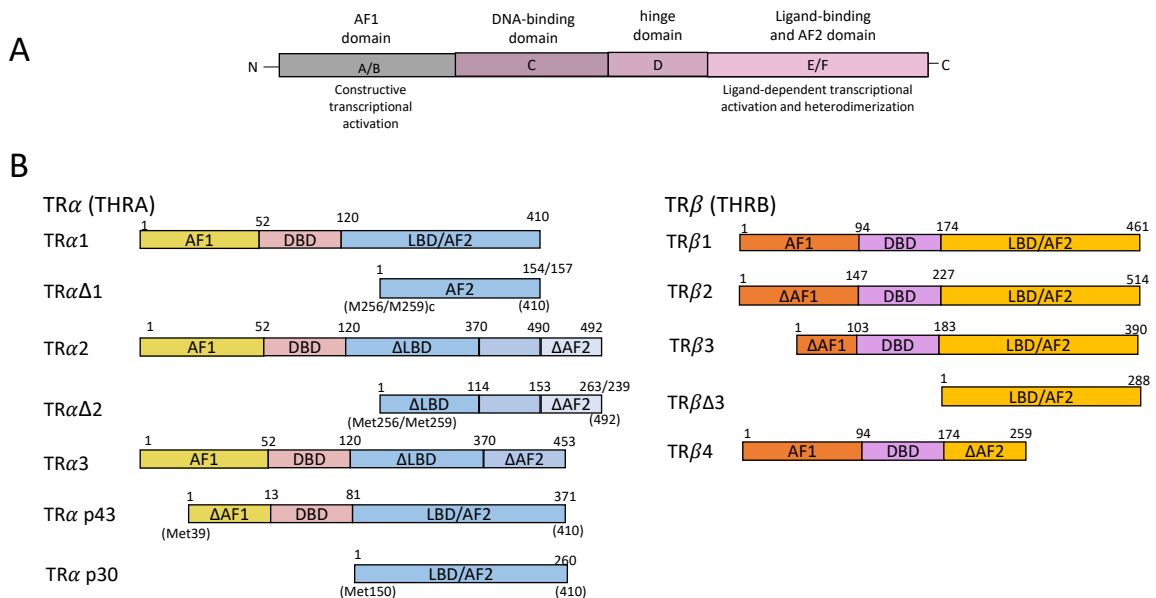


Abbildung 1: A Grundlegende Struktur der Thyroidrezeptoren: A/B = aminoterminaler Domäne; C = DNA-Bindedomäne; D = Kernlokalisationssequenz; E/F = Ligandbindedomäne; B Verschiedene Splicingvarianten der Thyroidrezeptoren α und β; modifiziert nach Lazar 1993, Chassande et al. 1997 und Williams GR 2000

2.2.1.1 Proteinstruktur

Die grundsätzliche Struktur dieser Rezeptoren besteht aus einer c-terminalen Liganden-Binde-Domäne für T3 (E), einer DNA-Binde-Domäne (C), der Kern-Lokalisations-Sequenz (D) sowie der amino-terminalen Domäne (A/B) (s. Abb. 1A).

2.1.1.2 Isoformen des Thyroidrezeptors

Die zwei Gen-Loci *THRA* und *THRB* auf Chromosom 3 und 17 codieren für zwei Isoformen $TR\alpha$ und $TR\beta$. Aus diesen zwei Genen werden durch verschiedene Prozesse wie Splicing und unterschiedlichen Transkriptionsstart verschiedene TR-Isoformen gebildet ($TR\alpha 1$, $TR\alpha 2$, $TR\alpha\Delta 1$, $TR\alpha\Delta 2$, $TR\alpha p30$, $TR\alpha p43$, $TR\beta 1$, $TR\beta 2$, $TR\beta 3$, $TR\beta\Delta 3$ and $TR\beta 4$) (Abb. 1B). Diese Isoformen unterscheiden sich in der Länge sowohl am N- als auch C-terminalen Ende und der physiologischen Funktion (Chassande et al., 1997; Hollenberg et al., 1995b; Lazar, 1993a; Tagami et al., 2010; Williams, 2000).

Die DNA-Binde-Domäne (DBD) liegt zentral zwischen der amino-terminalen Domäne und der Kernlokalisationssequenz. Sie besitzt zwei Zink-Finger (vier Cysteinsäuren angeordnet um ein Zinkion), die eine bedeutende Rolle bei der Interaktion mit der DNS spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an die DNS nicht vollzogen werden kann, wenn die Zinkfinger nicht intakt sind (durch Substitution oder Deletion der Aminosäure) (Nagaya et al., 1992). Im ersten Zinkfinger zwischen dem dritten und vierten Cystein befindet sich die P-Box mit einer bestimmten Aminosäuresequenz, welche entscheidend für die Bindung der TRs an die Thyroid-Response-Elemente (TRE) innerhalb der zu transkribierenden Gene ist. Ebenfalls wichtige Faktoren für die Bindung des Hormon-Hormonrezeptor-Komplexes an die DNS, sind die A-Box, die sich distal gelegen vom zweiten Zinkfinger befindet und die Heterodimerisation mit Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), die die DNS-Bindung stabilisiert und die Bindung an die TREs vereinfacht (Nagaya et al., 1992; Umesono and Evans, 1989).

Die Ligand-binde-Domäne (LBD) spielt ebenfalls eine Rolle bei der Dimerisation, Transaktivierung und bei der basalen Repression. Das Schilddrüsenhormon T3 bindet tief in einer hydrophoben Tasche, die durch die carboxy-terminalen Regionen der 12. Helix (ebenfalls beteiligt sind die 3., 4., und 5. Helix) gebildet wird. Die verschiedenen Isoformen des $TR\alpha$ und des $TR\beta$ binden T3 mit unterschiedlicher Affinität (Schueler et al., 1990). Des Weiteren beinhaltet die LBD mehrere 'heptad repeats', die hydrophobe Oberflächen zur Heterodimerisierung bilden. In Helix 12 der LBD existiert eine AF-2-Domäne, die wichtig für die transkriptionale Aktivierung ist. Durch Punktmutationen in dieser Domäne konnte gezeigt werden, dass zwar die Bindung von Ligand und DNA vollzogen werden kann, jedoch die Aktivierung der Transkription ausbleibt (Tone et al., 1994).

Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen Co-Aktivatoren wie SRC-1. Je nach Coaktivator/Corepressor sind unterschiedliche Helices verantwortlich.

Die amino-terminale Domäne unterscheidet sich innerhalb der Spezies (beispielsweise Mensch und Ratte) am meisten, im Gegensatz zu der LBD oder der DBD (Koenig et al., 1988). Innerhalb der amino-terminalen Domäne liegt eine transkriptionsaktivierende Sequenz, t1, die strukturellen Ähnlichkeiten mit aktivierenden viralen Proteinen wie VP16 aufweist (Hollenberg et al., 1985). Eine weitere Eigenschaft der aminoterminalen Domäne scheint die unterschiedliche ligandenunabhängige basale Repression zu sein, wobei hier wohl der TR α 1 stärker ist als der TR β 1 (Hollenberg et al., 1995a). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die amino-terminale Domäne mit Corepressoren und TREs interagiert sowie die Konfirmation der DBD beeinflusst (Hadzic et al., 1998; Yang et al., 1999). Mavinakere et al. 2012 identifizierten in der amino-terminalen Domäne des TR α 1 ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal, NLS) bezeichnet als NLS-2, welche im TR β 1 fehlt. Dieses Signal besteht aus 8 Aminosäuren und reguliert den Transport des Rezeptors zwischen Nukleus und Zytosol.

Die 'Hinge region' liegt zwischen DBD und LBD. Sie beinhaltet eine Aminosäuresequenz, die für die Kernlokalisierung sorgt. Sie ist lysinreich und die TRs werden vermutlich zeitnah nach der Synthese innerhalb des Kerns transportiert, da sie dort auch ohne die Bindung an T3 in größerer Anzahl zu finden sind. Außerdem ist die 'Hinge region' daran beteiligt, Corepressoren zu binden.

Auf die Proteinstruktur der für diese Arbeit relevanten Isoformen wird in Kapitel 2.2.4. genauer eingegangen.

2.2.2 Wirkungsmechanismen

2.2.2.1 Schilddrüsenhormonwirkung

Schilddrüsenhormone können über zwei verschiedene Mechanismen ihre Wirkung entfalten, zum einen über Schilddrüsenhormonrezeptoren (canonical bzw. klassische Wirkung), zum anderen über zytosolische Signalkaskaden (non-canonical bzw. nicht-klassische Wirkung).

2.2.2.2 Canonical bzw. klassische Wirkungsweise des TR

Der klassische Wirkmechanismus von Schilddrüsenhormonen (TH) wird über die Thyroidrezeptoren (TR) und deren Bindung an die DNA über Thyroid Response Elements (TRE) vermittelt. Das Binden an die TREs kann in einem sogenannten Apo- und Holozustand des Rezeptors erfolgen. Im Apozustand ist kein T3 an den Rezeptor gebunden. Er kann in diesem Zustand Corepressoren binden (Astapova et al. 2008; Makowski, Brzostek, Cohen 2003). Bindet nun T3 an den Rezeptor ändert sich die Struktur und er befindet sich im Holozustand. Nun kann er Co-Aktivatoren binden (Nagy & Schwabe 2004; McKenna & O'Malley 2002; Vella et al. 2014). Außerdem ist die Anwesenheit von TH nicht notwendig, damit der Rezeptor an die DNA binden kann (Nagy et al., 1999).

In Abwesenheit von T3 verhindern die TRs die Genexpression, indem sie das Ablesen der Gene mithilfe von Corepressorproteinen blockieren. Bindet nun T3 an den TR werden die Corepressorproteine durch Coaktivatorproteine ausgetauscht und die Transkription des nachfolgenden Gens kann erfolgen (Oppenheimer et al., 1987; Samuels et al., 1988). Im Apozustand verhindert der TR die Genexpression durch Bindung von Corepressoren. Zwei bekannte Corepressoren, die mit TRs interagieren, sind NCoR (nuclear receptor corepressor) und SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors) (Astapova et al., 2008; Makowski et al., 2003; Nagy et al., 1999). Über die gebundenen Corepressoren können Histondeacetylasen (HDACs) Lysinreste in der näheren Umgebung des gebundenen TRs deacetylieren. Dies führt zur einer inaktiven Chromatinstruktur und einer geringeren Expression des Zielgens (Yen, 2015).

Durch Bindung von T3 gelangt der TR in den Holozustand. Er bindet an einen Retinoid-X-Rezeptor und bildet ein Heterodimer. Dieses Heterodimer bindet nun innerhalb des Zellkerns an TRE, die in Promoterregionen der zu aktivierenden oder inhibierenden Gene lokalisiert sind, zusammen mit Co-Aktivatoren, wie SRC 1, 2, 3 und p300 (McKenna and O'Malley, 2002; Vella et al., 2014). Der Coaktivator-Komplex bildet mit Histonacetylasen (HATs) und Mediatoren, wie „TR assoziierten Proteinen“ (TRAPs) und „Vitamin D Rezeptor interagierenden Proteinen“ (DRIPs), einen Multikomplex mit verschiedenen Untereinheiten. Über eine gesteigerte Histonacetylierung durch HATs und Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II durch Mediatoren wird eine gesteigerte Genexpression induziert (Bassett et al., 2003; Yen, 2001).

Nicht alle Gene werden durch die Bindung von T3 an TRs aktiviert, sondern manche auch inhibiert. Ein Beispiel hierfür ist das Gen, welches für das Thyroid-stimulierende-Hormon (TSH) codiert. Nakano et al. 2004 konnten zeigen, dass ein mit T3 gebundener TR eine inhibierende Wirkung auf das TSH β -Gen besitzt. Diese Art der negativen Inhibition ist jedoch kein Spiegelbild der positiven Aktivierung. Die Rolle von sogenannten negativen TRE's und die genauen molekularen Mechanismen bleiben Gegenstand der aktuellen Forschung (Kuroda et al., 2020).

Die verkürzten Isoformen der TR α und TR β besitzen einen negativen dominanten Effekt. Die Aktivierung der Transkription durch die TR's benötigt die Bindung an die DNS, Heterodimerisation und Bindung von Cofaktoren. Die verkürzten Isoformen erreichen ihre negative Wirkung auf die Transkriptionsaktivität, indem sie Cofaktoren binden oder mit den TR's um TRE's konkurrieren (Chassande et al., 1997; Plateroti et al., 2001; Williams, 2000)

2.2.2.3 Non-canonical bzw. nicht klassische Wirkung des TR

Den Grundstein zu Erforschung der nicht klassischen Wirkung der TRs legten Segal und Ingbar Anfang der 80er Jahre. Sie zeigten mit ihrer Arbeit, dass T3 innerhalb weniger Minuten die Glukoseaufnahme in Rattenthymozyten steigern kann. Des Weiteren verwendeten sie Cycloheximid, ein Antibiotikum, welches die Translation in Eukaryoten hemmt. Somit konnte sicher gezeigt werden, dass der Effekt der gesteigerten Glucoseaufnahme von der Proteinsynthese unabhängig ist (Segal and Ingbar, 1981, 1985).

2000 konnte durch Simoncini und Kollegen gezeigt werden, dass Östrogenrezeptoren über die Phosphatkinasen Phosphatidylinositol-4,5-phosphate-3-kinase (PI3K) und PIP3-dependent kinase B (PKB) eine Signalkaskade bewirken. Diese Signalkaskade erfolgt innerhalb weniger Minuten und konnte außerdem in zellfreien Systemen nachgewiesen werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass dieser Weg DNS- und Proteinsynthese-unabhängig erfolgt. Simoncini gelang es, diese Ergebnisse ebenfalls mit TRs nachzuweisen (Simoncini et al., 2000).

Im Laufe der nächsten Jahre wurden verschiedene Funktionen der TRs untersucht, die DNS-bindungsunabhängig erfolgen. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass TR β bei

T3-Stimulation eine rasche Aktivierung des Kaliumkanals *Kcnh2* in Rattenzellen der Hypophyse bewirkt. Durch Wortmannin, einem PI3K-Inhibitor, konnte diese Aktivierung gehemmt werden, was auf den bereits von Simoncini beschriebenen Weg hindeutet (Storey et al., 2006; Storey et al., 2002). Die vermutete Signalkaskade der DNS-unabhängigen Wirkung des TR β ist in Abbildung 2 nach den Ergebnissen von Martin et al. (2014) dargestellt. Die Lyn-Kinase, eine nicht-rezeptor Tyrosinkinase, bildet einen Komplex mit dem TR β an der Plasmamembran (Gauthier & Flamant 2014). Die Phosphorylierung des Tyrosins im zweiten Zinkfinger an Position 147 ist notwendig, um die Lyn-Kinase zu binden. Ein weiterer Tyrosinrest an Position 171 des TR β interagiert mit der p85 α Untereinheit der PI3K. Bindet nun T3 an den Rezeptor, ändert dieser seine Konformation und bindet nicht mehr an die p85 α Untereinheit der PI3K. Diese von Lyn phosphorylierte und so aktivierte p85 α kann dann daher vom TR β dissoziieren und der PI3K-Signalweg wird aktiviert.

Moeller et al. (2005) konnten zeigen, dass TR β via PI3K die Expression des Hypoxia-inducible-factor (HIF)-1 α steigert. Indirekt werden so auch die Zielgene des HIF1 α durch T3 über diesen nichtkanonischen Wirkungsmechanismus reguliert, wie Glucosetransporter 1 (GLUT1), „platelet-type phosphofruktokinase“ (PFKP) und Monocarboxylasetransporter 4 (MCT4). Über Versuchsreihen mit Inhibition der PI3K-Signalkaskade sowie der MAPK-Signalkaskade mittels LY294002 bzw. PD98059 konnte gezeigt werden, dass T3 über die PI3K-Signalkaskade die Expressierung von diesen drei Zielgenen steigert. Eine Inhibition der MAPK-Signalkaskade führte zu keiner signifikanten Verringerung der Expression, während die Inhibition von der PI3K-Signalkaskade eine deutliche Verringerung der Expression zeigte. Alle drei Zielgene nehmen wichtige Rollen im Glucosemetabolismus des Menschen ein (Glucoseaufnahme, Glykolyse und Lactatexport).

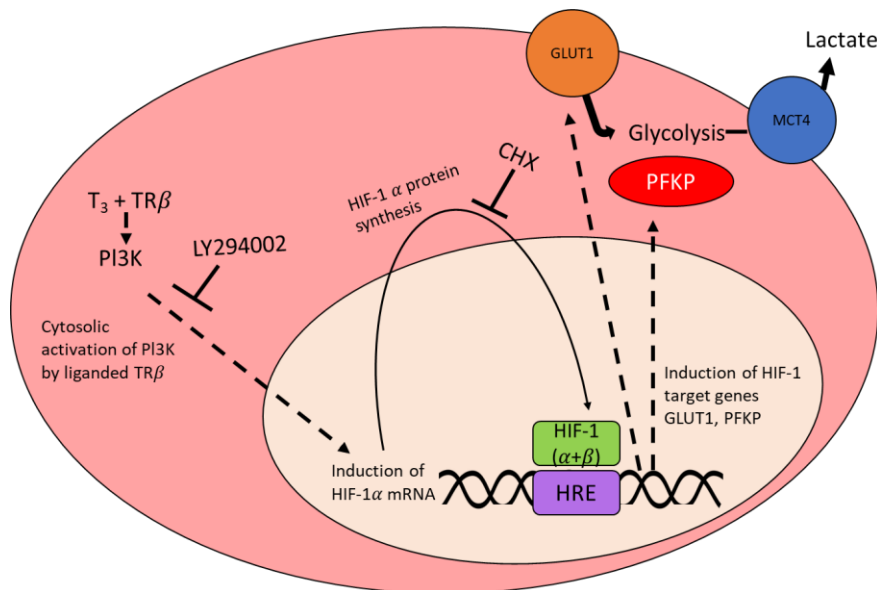


Abbildung 2: Non-canonical bzw. nicht-klassische Wirkungsweise des TRβ. In Verbindung mit T₃ aktiviert der TRβ im Zytosol die Phosphatidylinositol-3-kinase, welche wiederum die Expression von HIF-1α und weiteren Zielgenen steigert; modifiziert nach Moeller et al. 2005

2.2.3 Physiologische Wirkungen

Um die physiologische Wirkung der beiden TRs TRα und TRβ genauer zu untersuchen, wurden Experimente mit Knockout-Mäusen durchgeführt.

Die Gruppe um Fraichard et al. (1997) generierte die TRα^{-/-}-Mutante, welche sich dadurch auszeichnet, TRα1 und TRα2 nicht bilden zu können, jedoch aber die verkürzten Splicing-Varianten TRαΔ1 und TRαΔ2. Durch Einfügen einer Kassetten bestehend aus dem LacZ- sowie des NeoR-Gens im Exon 2, direkt hinter dem Start-Codon, wurde die TRα Translation blockiert, aber nicht vollständig. Die Mutation führte zwar zu einem Knock-Out des TRα1 und TRα2, aber der interne Promoter in Intron 7, der für die kürzeren Splicing-Varianten codiert, blieb intakt. Der Phänotyp dieser Variante zeichnete sich durch eine schwere postnatale Entwicklungsstörung in der Form von Längenwachstum, Gewichtsverlust und Tod nach 3-4 Wochen aus. Die TRα^{0/0}-Mutante, generiert von Wikström und seinem Team 1998, also fast zeitgleich mit Fraichard et al. (1997), zeigte dagegen einen anderen Phänotyp. Da er eine Mutation im Exon 9 erzeugte, wurden gar keine Produkte des THRA-Gen-locus gebildet, d.h. auch keine delta-Varianten. Exon 9 ist die Region, die für den alternativen Splicing-Vorgang des TRα1, TRα2 sowie der

splicing-Varianten verantwortlich ist. Bemerkenswerterweise waren diese Mäuse überlebensfähig (Wikstrom et al., 1998). Die Splicing-Varianten werden im Kapitel 2.2.4 genauer beschrieben.

Durch eine Substitution des Exon 3 mit einer ACN-Kassette (eine festgelegte Abfolge aus DNS-Sequenzen), welche dann später wieder aus dem Allel mittels Enzymen entfernt wird, wurde die $TR\beta^{-/-}$ -Mutante generiert. Durch diese Mutation verlieren die Proteine aus diesem gebildeten Genlocus ihre DBD und ihre Ligand-Binde-Domäne (das gilt für die Transkriptionsvarianten $TR\beta 1$, $TR\beta 2$ und $TR\beta 3$). Der Phänotyp ist gekennzeichnet durch Entwicklungsstörungen der Cochlea, Retina sowie durch eine gestörte TSH-Expression in der Hypophyse (Shibusawa et al., 2003a).

Um die klassische und nicht-klassische TR-Wirkung getrennt voneinander untersuchen zu können, wurden spezielle Mutanten generiert. Über eine Mutation in der DBD innerhalb der P-Box des ersten Zink-Fingers, verlor der $TR\beta$ (und auch der $TR\alpha$ aufgrund von fast identischer Aminosäureabfolge in diesem Abschnitt) die Fähigkeit an die DNS zu binden. Seine Interaktion mit Cofaktoren und die Bindung von T3 blieb jedoch erhalten ($TR\beta^{GS/GS}$ -Mutant, $TR\alpha^{GS/GS}$ -Mutant) (Shibusawa et al., 2003a) (Hönes et al., 2017). Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen KO-Mäusen ($TR\beta^{-/-}$ und $TR\alpha^{-/-}$) konnten somit erstmals Rückschlüsse auf den jeweiligen Mechanismus (klassisch vs. nicht-klassisch bzw. canonical vs. non-canonical) gezogen werden.

Da in dieser Arbeit die Expressionsvarianten des $TR\alpha$ untersucht wurden, wird im folgenden Teil die physiologischen Eigenschaften des $TR\alpha$ weiter beschrieben.

Die Arbeit von Hönes et al. (2017) hat über Vergleiche der Mausmutanten ($TR\alpha^{GS/GS-}$; $TR\alpha^{0/0-}$; $TR\beta^{GS/GS-}$; TRWT-Mutante) gezeigt, dass die Knochenentwicklung über den klassischen Weg des $TR\alpha$ vermittelt wird, da die Phänotypen der $TR\alpha^{0/0-}$ und der $TR\alpha^{GS/GS}$ -Mutante sich nicht in ihren ossären Defiziten (Länge, Mineralisierung) unterscheiden haben. Die Veränderungen der Knochen mit sekundärer Ossifikation, vermehrter trabekulärer Struktur sowie verfrühtem Epiphysenschluss ähnelten der knöchernen Struktur, wie man sie bei einem T3-Mangel beobachten kann.

Über das gleiche Prinzip konnte dargestellt werden, dass die Herzfrequenz über den nicht-klassischen Weg des $TR\alpha$ am ehesten extrinsisch reguliert wird. Im Gegensatz zu den $TR\alpha^{0/0-}$ -Mutanten war die Herzfrequenz in der $TR\alpha^{GS/GS}$ -Mutante nicht heruntergesetzt.

Jedoch zeigte sich in ex vivo-Experimenten kein Unterschied der Herzfrequenz, weshalb man eine Wirkung über das vegetative Nervensystem vermutet.

2.2.4 TR α -Varianten

Erstmals wurden die TR α -Varianten in Embryozellen des Huhns nachgewiesen (Bigler and Eisenman, 1988). Der Gruppe um Chassande et al. (1997) gelang es, zwei dieser alternativen Splicing-Varianten in Säugetierzellen bzw. in Mauszellen nachzuweisen und genauer zu beschreiben - TR $\alpha\Delta 1$ und TR $\alpha\Delta 2$.

Über die Insertion eines Plasmids, welches das Lac Z-Gen beinhaltet, in Exon 2 nach der zweiten Base des ATG-Start-Codons, wurde das c-erbA α -Gen inaktiviert (c-erbA $\alpha^{-/-}$). Über mehrere Versuchsreihen konnte der interne Promoter in Intron 7 des c-erbA α -Gens, welcher für zwei Transkripte fungiert, identifiziert werden. Die anschließende Sequenzanalyse zeigte eine hohe Homologie zu menschlichen Zellen. Über Realtime-Polymerasechainreaction (RT-PCR) konnte die RNS des TR $\alpha\Delta 1$ und TR $\alpha\Delta 2$ sowohl in den vorbehandelten TR $\alpha^{-/-}$ - und WT Embryostamm (ES)-Zellen nachgewiesen werden. Bezüglich der Translation konnte respektiv festgestellt werden, dass die Startcodons (Basentriplet 43 und 52) und das Leseraster identisch zu denen des TR $\alpha 1$ und des TR $\alpha 2$ sind. Somit stellen die beiden Varianten N-terminale verkürzte Versionen der beiden ursprünglichen Rezeptoren dar (s. Abb. 1 B). Sie haben jedoch im Gegensatz dazu keine DBD, keine HR und die LBD ist nur unvollständig erhalten (Chassande et al., 1997).

2.2.4.1 TR $\alpha\Delta 1$

Die Expression des TR $\alpha\Delta 1$ ist differenzierungs- und gewebeabhängig. Am meisten wird er im Lungengewebe, ES-Zellen sowie im Magen-Darm-Trakt exprimiert.

Die wahrscheinliche Größe beträgt 4,5 kB, welches ein ca. 16000 Da großes Polypeptid bildet. Die Startsequenzpositionen innerhalb des TRHA-Gens lauten 256/259. Die Halbwertszeit beträgt ca. 1 Stunde. Die Lokalisation des Proteins wurde über in situ Immunfluoreszenz bestimmt mittels No. 21 Antibody, welcher gegen ein c-terminales Epitop des TR $\alpha 1$ und des TR $\alpha 2$ (und somit auch die Δ -Varianten erkennt) gerichtet war

(Chassande et al., 1997). Die Lokalisation des TR α Δ 1 wurde von Chassande und seinem Team innerhalb des Kerns als auch des Zytoplasmas beschrieben.

Da von Bigler et al. 1992 beschrieben wurde, dass Teile des c-terminalen Endes des TR α 1 als Repressor der Transkription wirken, wurde von Chassande et al. (1997) ebenfalls diese Eigenschaft beim TR α Δ 1 untersucht. Über die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-ELISA-Methode zeigte sich in den Ergebnissen dieser Gruppe eine dosisabhängige inhibitorische Wirkung des TR α Δ 1 auf die Transkriptionssteigerung durch TR α 1 (Abb. 3). Die Arbeitsgruppe stellte ebenfalls heraus, dass für diese Wirkung das Protein gebildet werden muss (es reichte nicht, wenn die mRNA gebildet wurde). Anhand von verschiedenen, durch Mutation herbeigeführten, verkürzten Varianten des TR α Δ 1 konnte gezeigt werden, dass für die Inhibition die Aminosäuren 256-319 (N-terminal) entscheidend sind. Ebenfalls zeigte der TR α Δ 1 die größte inhibitorische Wirkung auf die TR α -Wirkung bei Co-Transfektion des hormone-response-elements (HRE) des DR4-Typs. Der Mechanismus der Inhibition des TR α Δ -1 konnte von Chassande et al. nicht eindeutig geklärt werden.

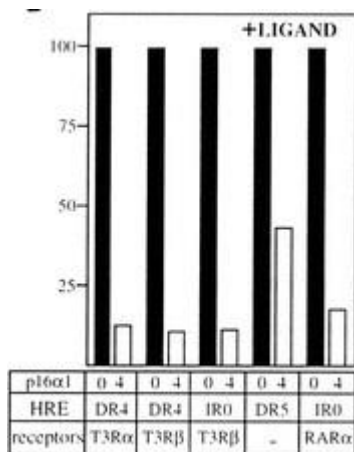


Abbildung 3: Chassande et al. 1997: Effekt der TR α Δ 1 (p16 α 1) auf TR α 1 (T3R α), TR β 1 (T3R β) und RAR α gemessen mittels CAT-Elisa. Transfiziert wurden jeweils 1 mg des jeweiligen Plasmids und 4 mg des TR α Δ 1-Plasmids. Die Zellen wurden im Vorfeld mit 10^{-7} M T3 inkubiert.

2.2.4.2 Vermutete Rolle der TR α Δ -1-Variante

In Experimenten mit Knockoutmäusen konnte die physiologische Bedeutung der Delta-Varianten und Hinweise auf deren Funktionen gezeigt werden. Es zeigte sich, dass TR $\alpha^{-/-}$ Mäuse (Mutanten, die nur die Deltavarianten ausbilden können, jedoch nicht TR α 1 oder TR α 2) kurze Zeit nach dem Abstillen sterben. Der Phänotyp ist charakterisiert durch ein, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, niedrigerem Gewicht und histologischen Veränderungen im Intestinaltrakt, Knochengewebe und einer hypoplastischen Schilddrüse. Im Intestinaltrakt konnte im Gegensatz zu Wildtypmäusen eine kleinere Anzahl an Villi und Epithelzellen festgestellt werden. Die Knochenstruktur stellte sich mit geringerem Mineralisierungsgrad, einer höheren Anzahl an Chondrozyten und einer ungeordneten Strukturierung dar. Die Spiegelmessungen von TSH, fT4 und fT3 ergaben bei den TR $\alpha^{-/-}$ Mäusen stark erniedrigte Konzentrationen. Nach einer exogenen Gabe von T3 über eine Woche konnten die TR $\alpha^{-/-}$ Mäuse jedoch überleben und es zeigte sich, dass die fehlende Ausreifung ab der fünften Woche in Teilen nachgeholt wurde. Außerdem zeigte sich eine Normalisierung der Schilddrüsenhormonproduktion (Fraichard et al., 1997).

Der Phänotyp der TR $\alpha^{0/0}$ -Mutante von Wikström zeigte im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine 20% verringerte Herzrate sowie Veränderungen der Erregungsweiterleitung im EKG. Die Körpertemperatur war um ca. 0,5° C verringert. Diese Veränderungen persistierten auch nach Stimulation mit T3. Die Mäuse zeigten ein sonst unauffälliges Verhalten und waren zeugungsfähig (Wikström et al., 1997).

Aufgrund dieser Beobachtungen, v.a. wegen des mildereren Phänotyps der TR $\alpha^{0/0}$ -Mäuse, bei denen die Deltavarianten fehlen, wurde vermutet, dass die Deltavarianten bei Abwesenheit des intakten TR α 1 und des TR α 2 einen entscheidenden (bezogen auf das Überleben negativen) Einfluss bei der Ausreifung der intestinalen Organe sowie des Knochengewebes besitzen. Außerdem wirken sie sich auf den Hormonspiegel aus, was in Summe letztendlich zum Tode führe (Gauthier et al., 1999; Plateroti et al., 2001).

Des Weiteren wird vermutet, dass das TR α Δ 1-Protein ebenfalls in der Lage dazu sein soll, die Ligand abhängige Aktivierung des RAR α zu inhibieren, aber nur wenn er als RAR-RXR-Heterodimer vorliegt.

Das TR α Δ 1-Protein soll sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert sein, trotz fehlender Kernlokalisationssequenz.

Es wurde vermutet, dass der TR α Δ 1 einen Coaktivator, der für die Aktivierung der Transkription nötig ist, bindet und damit die Transkription verhindert. Ob dieser Schritt im Zytoplasma oder im Kern abläuft, konnte nicht geklärt werden (Chassande et al., 1997). Wie genau dieser Mechanismus der Inhibierung erfolgen soll ist nicht genauer beschrieben. Die Inhibierung der Transkription soll im Kern erfolgen, obwohl der TR α Δ 1 keine DBD besitzt.

Gauthier et al. 2001 konnten in ihren Versuchen beobachten, dass die Aktivität der TR α Δ -Varianten nach Inaktivierung der TR α -Gene zugenommen hat. Bei weiteren Versuchen mittels Ko-Transfektion von Lactacystin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des TR α Δ 1 durch den TR α 1 über proteosomalen Abbau gehemmt wird.

3. Fragestellungen und Zielsetzung dieser Arbeit

Chassande und sein Team beschrieben 1997 erstmals die TR α Δ 1-Variante. Diese Variante habe eine inhibierende Wirkung auf die Transkription im Zellkern. Eine Knock-out-Maus, welche nur die Delta-Varianten des TR α bilden kann (s. TR $\alpha^{-/-}$ Maus, Fraichard et al.), verstirbt wenige Tage nach der Geburt ohne rettende T3-Gabe. Eine Knock-out-Maus, die wiederum keinen TR α bzw. seine Splicing-Varianten bilden kann (s. TR $\alpha^{0/0}$ Maus, Wikström et al.) ist dagegen überlebensfähig. Somit scheinen die Delta-Varianten einen entscheidenden Einfluss auf den Phänotyp zu haben.

Ziel dieser Arbeit ist der Frage nachzugehen, wie die TR α Δ 1-Variante mit einem stark veränderten Phänotyp (s. TR $\alpha^{-/-}$ Maus) einhergehen kann, ohne eine DNS-Bindedomäne zu besitzen, um im Kern die inhibitorische Wirkung zu entfalten. Dieser grundsätzliche Widerspruch sorgte für Zweifel an den bisherigen Ergebnissen und ist der Grund für diese Arbeit.

Um diese Diskrepanz genauer zu untersuchen, verwendeten wir moderne Verfahren (Luciferase-Assay, Konfokalmikroskopie) und beschäftigten uns mit den folgenden Fragen:

Lokalisation

Gelangt der TR α Δ 1 in den Kern, obwohl die Variante keine Kernlokalisationssequenz besitzt?

Funktion

Entfaltet der TR α Δ 1 eine inhibitorische Wirkung auf die Genexpression, obwohl er keine DNS-Bindedomäne besitzt?

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialliste

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller/Vertreiber
3,5,3'-Triiodothyronine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alexa Fluor™ Phalloidin-488	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Ammonium persulfat	Bio-Rad, München, Deutschland
Beta-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BlueJuice Loading Buffer (10x)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Dual-Glo® -Reagenz	Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Ethanol (technical grade)	Pharmacy, UK Essen, Essen, Deutschland
Schilddrüsen freies fetales Kalbserum (FCS)	vom Labor zur Verfügung gestellt
Gel Pilot 1 kb Ladder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gel Pilot 100 bp Plus Ladder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Immu-Mount	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Isopropanol (2-propanol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
JetPrime Buffer	Polyplus Transfection, Illkirch, Frankreich

JetPrime Reagenz	Polyplus Transfection, Illkirch, Frankreich
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, München, Deutschland
Milchpuder	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Minimum Essential Medium	C C pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nuclease freies Wasser	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphat buffered saline tablet	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Poly-L-Lysin 0,1 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein-Marker IX	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
Rotiphorese A	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese B	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodium hydroxide (NaOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Stop&Glo-Reagenz®	Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland
Triiodothyronine (T3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (0,25%) 25200	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

ZellShield	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
B-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

4.1.2 Technische Utensilien

Tabelle 2: Technische Utensilien

Gerät	Hersteller/Vetreiber
Biometra electrophorese chamber	Biometra, Jena, Deutschland
Bio-Rad SDS-PAGE chamber	Bio-Rad, München, Deutschland
Heracell 150i, Incubator	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Heraeus Fresco17	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Herasafe 2020, Safty Cabinet	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Incubator shaker innova42	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kern EMB 100-3	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
LeicaDMLB2 microscope	Leica, Wetzlar, Deutschland
Magnet stirrer IKA RH digital	IKA, Staufen, Deutschland
Mini-Protean®-Ständer	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini-Protean®-Glasplatten	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini-Protean®- Tetra cell Elektrodenkammer	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Konfokalmikroskop Elyra PS.1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Shaker WT 12	Biometra, Jena, Deutschland
SI-114A scale	Denver Instruments, Bohemia, USA

Sirius Luminometer	Berthold detection systems, Pforzheim, Deutschland
Skyscan 1172a	Bruker micro CT, Kontich, Belgien
Standard Power Pack P 25T	Biometra, Jena, Deutschland
Vacuubrand CVC 3000	Vacuubrand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Versadoc 4000MP	Bio-Rad, München, Deutschland
Vortex 4 Basic	IKA, Staufen, Deutschland

4.1.3 Antikörper

Tabelle 3: Register von primären und sekundären Antikörpern

Antikörper/ Nukleotid	Konzentration	Katalog-Nr.	Hersteller/Vertreiber
M2-Antikörper	1:1000	F1804	Sigma-Aldrich
Cy3 HRP anti-maus	1:1000	AS008	ABclonal
Cy5-labeled DR 4 Oligonukleotid			Von Hoenes GS zur Verfügung gestellt

4.1.4 Verwendete Plasmide

Tabelle 4: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Antibiotische Resistenz
TR α 1-pcDNA3	Expressionsvektor für humanen TR α 1	AmpR
TR α 1-pcDNA3 <i>c-flag</i>	Expressionsvektor für humanen TR α 1 mit spezifischer <i>c-flag</i> Aminosäuresequenz	AmpR
TR α 1 Δ 1-pcDNA3	Expressionsvektor für humane TR α 1 Δ 1-Variante	AmpR
TR α 1 Δ 1-pcDNA3 <i>c-flag</i>	Expressionsvektor für humane TR α 1 Δ 1-Variante mit spezifischer <i>c-flag</i> Aminosäuresequenz	AmpR

TRαG291R-pcDNA3	Expressionsvektor für humane TRαG291R Variante	AmpR
RXR	Expressionsvektor für humanen Retinoid-X-Rezeptor	AmpR
DR+4-Firefly Luciferase Reporter	DR+4 regulierter Luciferase Reportervektor	AmpR
RL-TK Renilla Luciferase	Expressionsvektor für Renilla-Firefly Luciferase	AmpR

Das Plasmid des RXR und andere wurden freundlicherweise unserem Labor von Prof. Dr. Refetoff zur Verfügung gestellt.

4.1.5 Verwendete Kits

Tabelle 5: Kits

Kit	Katalog-Nr.	Hersteller/Vertreiber
Dual-Glo® Luciferase Assay System	E2920	Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	27104	Qiagen, Hilden, Deutschland
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	E0554	BioLabs® inc. , Frankfurt, Deutschland

4.1.6 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 6: Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Hersteller/Vertreiber
0,2 ml PCR soft tubes	Biozym Biotech Trading, Wien, Österreich
0,5 ml reaction tubes	Biozym Biotech Trading, Wien, Österreich
1,5 ml reaction tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2 ml reaction tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2 - 50 ml Pipetten (Cellstar)	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
8 ml tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

24 well Zellkulturplatte	Techno Plastic Products AG, Schweiz
50 ml CELLSTAR® Polypropylen Röhren	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
96-well white bottom plates	4titude, Berlin, Deutschland
96-well clear bottom plates	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
Cannula	
Cellstar 6 well, Tissue cultured treated	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
Cellstar dish 100 x 20 mm, non TC- Petri	Greiner bio-one, Essen, Deutschland
Combs 1,0 mm (10 well), 1,5 mm/ (15-well)	Bio-Rad, München, Deutschland
Coverslips 13 mm im Durchmesser	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Filterpapier	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Kammerobjektträger	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, USA
Microvette	Sarsted, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1 -10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Roti®-Fluoro PVDF membrane, pore size 0.2 µm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.1.7 Primer

Tabelle 7: Primer

Gen	Sequenz	Schmelztemperatur in °C
TRα	Forward (F): 5'-ATGGAGATCATGTCCCTGCGG-3'	61°
	Reverse (R): 5'-TCACTTCAATTCCATCCAGGATG-3'	57°

4.2 Methoden

4.2.1 Herstellung der TR α Δ 1-c-flag-Variante via Mutagenese PCR und TR α -c-flag-Plasmids

Als Ausgangsplasmid diente hier das TR α -c-flag-Plasmid, welches im wissenschaftlichen Labor der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel (AG Möller) bereits vorhanden war.

Das TR α Δ 1-c-flag-Plasmid wurde über eine Mutagenese-PCR mit der bereits vorhandenen TR α -c-flag-Variante als Template hergestellt. Über zwei Primer, die an die beiden Startcodons Methionin 1 und 256 binden, konnte die gewünschte verkürzte Variante des TR α generiert werden. Um die Mutagenese PCR durchzuführen, wurde das Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit von BioLabs® verwendet und die Schritte im beiliegenden Protokoll befolgt. Als Primer wurden 5'-ATGGAGATCATGTCCCTGCGG-3' (Methionin Position 256) und 5'-TCACTTCAATTCATCCAGGATG-3' (Methionin Position 1) verwendet. Um die Plasmide aufzureinigen und zu isolieren, wurde das Qiaprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen® verwendet. Vorgegangen wurde wie im Protokoll des Kits beschrieben, bis auf eine Änderung bei Schritt 10. Anstatt 50 μ l EB-Puffer wurden 35 μ l verwendet, um die Konzentration zu erhöhen. Anschließend erfolgte die DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop®. Danach erfolgte die Probenverdünnung mit H₂O und das Verschicken der Proben mit dazugehörigem Barcode zu dem Sequenzierdienstleister SeqLab Sequence Laboratories GmbH. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Die Ergebnisse wurden mittels SnapGene® Viewer 2.8.3 analysiert und die Proben mit einer nachgewiesenen TR α Δ 1-c-flag Variante ausgewählt.

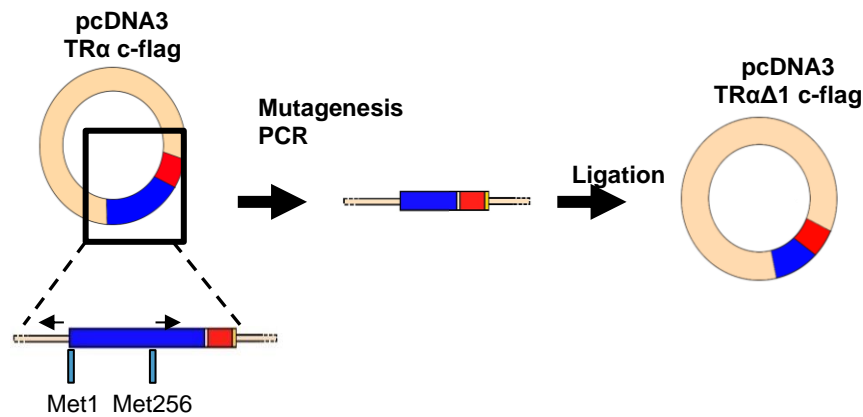


Abbildung 4: Erzeugung der c-FLAG TRαΔ1-Variante via Mutagenese-PCR und TRα c-FLAG-Plasmids; Blau – TRα Gensequenz bzw. nach Mutagenese PCR TRαΔ1 Gensequenz, Rot - c-FLAG Gensequenz. Durch zwei Primer, die an den beiden Methioninpositionen binden, wird das benötigte TRαΔ1 c-Flag Plasmid erzeugt.

4.2.2 Zellkultur

Verwendet wurden neben Hela-Zellen unter anderem die HEK293, NIH3T3, CV-1 sowie die HEPG2 – Zellreihen. Die Zellen wurden im Stickstofftank bei -80°C aufbewahrt und transportiert. Zellen wurden mit passendem Medium (Hela – MEM, HEK293 – DMEM, NIH3T3 – RPMI, CV-1 – MEM, HEPG2 – DMEM) jeweils mit 10% FCS angereichert auf Petrischalen bei 37°C kultiviert. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellen aufgeteilt, um eine geeignete Homöostase sowie Zellproliferation zu gewährleisten. Zuvor wurde unter mikroskopischer Sicht der Zustand der Zellen und deren Proliferation kontrolliert.

Die Zellen wurden wie folgt aufgeteilt: Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und danach mit 500 μl Trypsin vom Untergrund der Petrischale gelöst. Nach geeigneter Verdünnung wurden diese dann wieder im entsprechenden Medium + 10% FCS verteilt und erneut bei 37°C inkubiert. Um einer bakteriellen Superinfektion vorzubeugen, wurde das Medium mit Gentamicin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ versetzt. Um optimale Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden keine Zellpassagen über der zehnten Passage verwendet.

4.2.3 Dual-Luciferase-Assay

Durch Einbringung zweier zusätzlicher Gene, welche für eine Firefly-Luciferase und für eine Renilla-Luciferase codiert, ist es möglich, die Expression dieses Gens zu bestimmen in Relation zu einer internen Kontrolle. Das Gen für die Firefly-Luciferase wird nach dem Promotor des zu untersuchenden Gens mittels Transfektion eingebracht. Das Gen für die Renilla-Luciferase wird von einem Promotor gesteuert, der eine stabile Expression liefert. Die Luciferase setzt bei Reaktion mit Sauerstoff Licht frei, welches über ein Photometer gemessen werden kann. Da fast die gesamte freiwerdende Energie in Form von Licht ausgestrahlt wird, ist dieses Verfahren sehr sensitiv. Nach Zugabe eines Reagenzes wird die Renillaaktivität gemessen und in Relation gesetzt. Dies dient dazu, um den Erfolg der Transfektion zu messen. Somit kann man Rückschlüsse von der gemessenen Lichtstärke auf die Exprimierung des gesuchten Gens ziehen.

4.2.3.1 Behandlung der Zellen für Luciferase-Assay

Die Zellen wurden in geeigneter Zellzahl pro well (bei Hela-Zellen 60.000/well) in einer 24-well-Zellkulturplatte ausgesät und mit entsprechendem Medium passend zur Zellreihe (s. o.) sowie Schilddrüsenhormonfreies – 10 % FCS angesetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und mikroskopischer Kontrolle wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem Medium + schilddrüsenhormonfreiem 10 % FCS optimale Bedingungen für die Transfektion der Zellen geschaffen (s. 4.2.3.2.). Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37 °C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt sowie ein Teil der Zellen mit 10 nM T3 stimuliert bzw. in der gleichen Konzentration eine Kontrolllösung hinzugegeben. Nach wiederum weiteren 24 h Inkubation bei 37°C erfolgte die eigentliche Durchführung des Luciferase-Assay mithilfe des Dual-Glo[®] Luciferase Assay Systems (s. 4.2.3.3.).

4.2.3.2 Transfektion für Luciferase-Assay

Mithilfe der Transfektion kann Fremd-DNS in eukaryotische Zellen eingebracht werden. Dies kann auf verschiedenen Wegen geschehen z.B. chemisch, biologisch oder physikalisch. In dieser Arbeit wurde die Transfektion mit JetPRIME® Buffer/Reagenz von Polyplus transfection durchgeführt, wobei es sich um eine Lipofektion handelt. Hierbei erfolgt die Einbringung des Vektors über Anheftung bzw. Einschluss in Liposomen. Durch die Verwendung von kationischen Lipiden besteht eine gewisse toxische Eigenschaft des Transfektionsreagenzes und somit ist darauf zu achten, die richtige Anzahl an Zellen und die geeignete Menge an Reagenz hinzuzugeben. Als Orientierung diente hier das JetPRIME® Protokoll. Verwendet wurden 60.000 Zellen pro well (Hela-Zellreihe). Insgesamt wurde pro Well 100 ng DNS hinzugegeben. Pro Transfektionsansatz wurden 6 Wells verwendet. Pro Well wurden insgesamt 5 µl Volumen hinzugegeben.

Nachdem die Zellen optimal vorbereitet wurden (s. 4.2.3.1.), erfolgte die Zugabe der Transfektionsreagenzien und der Plasmide. Der Vorgang wurde unter der Zellbank durchgeführt, um eine mögliche Kontaminierung der Zellen zu verhindern. Es wurde ein Mastermix angesetzt mit 19,8 µl JetPRIME® Buffer, 0,5 µl RL-TK und 0,57 µl DR4 pro Transfektionsansatz. Dann folgte je nach Versuchsansatz die Zugabe von 0,79 µl TR α -, TR- Δ -1- und TR291-Plasmiden bzw. im Verhältnis 1 (TR α) zu 4 (TR α Δ 1; TR291) zusammen mit 9,9 µl JetPRIME® Buffer. Um zu gewährleisten, dass in jedem Well die DNS-Menge gleich ist, haben wir in unseren Experimenten gegebenenfalls die entsprechende Menge des Leer-DNA-Vektor pcDNA3 hinzugefügt (3,17 µl). Nach Zugabe von 1,4 µl JetPRIME® pro Transfektionsansatz wurden die Ansätze für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl aus dem jeweiligen Mastermix pro Well wurde die 24-well-Platte für 4 h bei 37 °C inkubiert.

4.2.3.3 Durchführung des Luciferase-Assays

Die Durchführung des Luciferase-Assays erfolgte mithilfe des Dual-Glo® Luciferase Assay Systems/Kit und nach dessen Protokoll.

Vor der Durchführung der Messung wurden die verwendeten Reagenzröhrchen auf Eigenfluoreszenz überprüft (oberes Limit war hierbei 300 RLU/s). Die vorbehandelten Zellen (s. 4.2.3.1.) wurden nach Absaugung des Mediums gewaschen und mit 500 µl 37°C warmen PBS gewaschen. Dieses wurde abgesaugt und erneut 100 µl PBS hinzugegeben. Als nächstes wurden 100 µl des Dual-Glo® -Reagenz hinzugegeben und die 24-well-Platte in Alufolie gewickelt, welche dann auf dem Schüttler für 10 min bei RT belassen wurde. Danach füllten wir je 100 µl aus jedem Well in ein Reagenzröhrchen. Zur Verhinderung von Fremdeinstrahlung wurde der Arbeitsplatz zuvor entsprechend abgedunkelt. Das Reagenzröhrchen wurde mittels Vortexer durchmischt, worauf die erste Messung folgte. Bei dieser wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase mittels Sirius Luminometer gemessen. Daraufhin wurde 50µl Stop&Glo-Reagenz® hinzugegeben, erneut durchmischt und abgedunkelt bei RT 10 min inkubiert. Es erfolgte die zweite Messung, die Auskunft über die Aktivität der Renilla-Luciferase gibt. Die firefly luciferase-Lumineszenz wurde pro well in Relation zu der Renilla luciferase-Lumineszenz gesetzt, um Unterschiede in der Transfektionseffektivität auszugleichen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel-Programm von Windows und GraphpadPrism 9 von Graphpad Software, Inc..

4.2.4 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung beruht auf nachfolgendem vereinfachtem Prinzip: Auf das zu untersuchende Gewebe bzw. Zellen wird nach einigen Waschschritten und Blockieren von unspezifischen Epitopen durch BSA, ein spezifischer mono- oder multiklonaler Primärantikörper gegeben. Nachdem dieser an das gesuchte Protein binden konnte, folgt nach weiteren Waschschrritten die Zugabe des Sekundärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt. Das Enzym sorgt dann in einer Enzym-Substrat-Reaktion für die Entstehung eines Farbstoffes. Der Farbstoff kann nun durch bestimmtes Licht unter dem

Mikroskop angeregt werden und emittiert Licht. In dieser Arbeit wurde Fluorophor bei 548 nm angeregt und das emittierte Licht hatte eine Wellenlänge von 561 nm.

4.2.4.1 Behandlung der Zellen für Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen der HeLa-Zellreihe wurden gesondert, auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät. Dafür wurden 500 µl der 0,001% Poly-L-Lysin-Lösung in je eine Vertiefung einer 24-well-Platte gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Darauf folgten drei Waschschriffe der Plättchen mit 500 µl H₂O sowie ein weiteres Mal mit 500 µl PBS-Lösung. Es folgte das Aussäen der Zellen mit 50.000 HeLa-Zellen pro well (100.000 Z/ml) in 500 µl MEM-Medium mit 10% FCS-Zusatz. Die Zellen wurden über 24h bei 37°C inkubiert, um das Anwachsen auf den Deckplättchen zu gewähren.

Am Folgetag folgte die Transfektion der Zellen nach JetPrime-Protokoll bzw. mit den Plasmiden des TRαWT mit c-flag und des TRαΔ1 mit c-flag.

24 h nach der Transfektion erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 500 µl MEM sowie die Fixierung der Zellen durch die Zugabe von 500 µl 8 % Formalin (in PBS) pro well. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen erneut dreimal mit 500 µl/well PBS gewaschen. Die anschließende Permeabilisation der Zellen gelang durch die Zugabe von 500 µl 0,1% Triton X-Lösung (in PBS), gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei RT und zwei Waschschriffen mit 500 µl PBS-Lösung für je mindestens 5 min. Nach diesen Schritten erfolgte das Blocken der unspezifischen Bindungen mit 5% BSA in PBS-Lösung mit 0,3 M Glycin für 60 min bei RT. Nach Entfernen der Blocklösung erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers M2 (Sigma) 1:1000 verdünnt in 3% BSA in PBS-Lösung (300 µl/well) und Inkubation der Zellen bei 4°C über Nacht.

Am Folgetag wurden die Zellen dreimal mit TBS-T-Lösung für jeweils 5 min gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Cy3 in einer 1:1000 in 1% BSA in PBS-Lösung (300 µl/well) für eine Stunde bei RT, lichtgeschützt in Alufolie, inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 500 µl TBS-T-Lösung gewaschen. Das Zellskelett wurde mit Phalloidin gefärbt. Dafür inkubierten wir die Zellen für 20 min bei RT lichtgeschützt auf einem Shaker mit Phalloidin-488 (1:20 verdünnt in 1% BSA in PBS-Lösung; 100 µl/well). Erneut folgten drei Waschschriffe mit 500 µl TBS-T-Lösung/well und die Färbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). DAPI wurde 1:1000 verdünnt in einer

PBS-Lösung mit 100 µl/well hinzugegeben und lichtgeschützt 5 min auf dem Shaker bei RT inkubiert.

Die Zellen wurden ein letztes Mal dreimal mit TBS-T-Lösung (500 µl/well) gewaschen, bevor sie mit Mounting-Medium zwischen Deckgläschen und Objektträger fixiert wurden. Die Objektträger wurden bei 4°C in einem dunklen Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung und Aufnahme der Bilder mittels Zeiss ELYRA Konfokalmikroskops.

4.2.5 Western-Blot

Die Methode des Western-Blots wird genutzt zum quantitativen Nachweis von Proteinen. Über die Aufspaltung eines Proteingemischs (nach Ladung, Größe und anderen Eigenschaften) und die Übertragung von diesem auf eine Trägermembran (beispielsweise auf eine SDS-Page) können Proteine zusätzlich durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

4.2.5.1 Trennung der Proteine sowie Transfer auf PVDF-Membran

Für den Western Blot wurde ein Trenngel mit der Konzentration 12 % angemischt. Dieses wurde in den vorbereiteten Mini-Protean®-Ständer und die Mini-Protean®-Glasplatten gegossen. Oben auf das Gel wurde anschließend eine Schicht Isopropanol aufgetragen. Nachdem das Gel polymerisiert ist (ca. 40 min.), konnte das überflüssige Isopropanol abgegossen und das Sammelgel aufgegossen werden. Es folgte die Einsetzung des Kamms, um die nötigen Taschen für die Proteinlösung zu generieren. Wieder ließ man das Gel für ca. 30 min aushärten. Nun wurde die Mini-Protean® Tetra cell-Elektrodenkammer mit SDS-Puffer aufgefüllt und die Vorrichtung eingesetzt. Der Kamm wurde entfernt und 3 µl peqGold proteinmarker IX sowie 20 µg des TRαWT c-flag-Proteins und des TRαΔ1 c-flag-Proteins in die Taschen gegeben. Bei 80-100 V ließ man nun die Proteine für 90 min wandern.

Der Transfer der Proteine erfolgte via wet-blot-technique. Die PVDF-Membran wurde für 30 Sekunden in Ethanol aktiviert, um für die ausreichende Hydratisierung und somit

für die Penetranz des Transferpuffers zu sorgen. Der Transferpuffer wurde im Vorfeld auf 4°C gekühlt und die Membran darin gewaschen. Außerdem wurde die Blottingkammer mit dem Transferpuffer gefüllt. Die Kassette für den Proteintransfer wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf der roten Seite der Kassette wurde ein Schaumpad gelegt, darauf folgten drei Whatman-paper, die PVDF-Membran, das Gel, wieder drei Whatman-paper und zum Schluss wieder ein Schaumpad. Nach Zusammenklappen der Kassette wurde diese in die Blottingkammer gesetzt und bei 4°C über Nacht und bei 10 V belassen.

4.2.5.1.2 Inkubation der Membran mit Antikörpern und Visualisierung

Die Membran wird mit TBS-T-Puffer für 30 s gewaschen und anschließend mit 5% Magermilch/TBS-T-Puffer für 1 h bei RT auf dem Schüttler geblockt/inkubiert. Danach folgte nach Waschschritten mit TBS-T, die Inkubation mit dem M2-antiflag-Antikörper 10 µg/ml in 3% Magermilch/TBS-T-Puffer für 30 min auf dem Rotator bei RT. Es folgten weitere drei Waschschrritte mit TBS-T für je 5 min bei RT auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper HRP-Anti-Mouse (1:2000 in 4 ml 5% Magermilch) 2 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten mit TBST für je fünf min auf dem Schüttler bei RT, wurde die Membran in einer Plastikfolie abgedunkelt für 5 min mit dem ECL-Reagenz (im Verhältnis 1:1) bei RT inkubiert. Die ECL-Lösung wurde ausgestrichen und die Visualisierung erfolgte mittels VersaDoc MP4000.

4.2.6 Electro mobility shift assay (EMSA)

Mittels des EMSA können DNA/Protein-Interaktionen untersucht werden und ggf. auch die Bindungsaffinität (durch eine Verdünnungsreihe). Das Prinzip beruht darauf, dass DNA/Protein-Komplexe langsamer durch das elektrische Feld wandern und somit eine Laufweitenverschiebung zustande kommt. Die Banden können über verschiedene Methoden sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzmarkierung durch die Verwendung eines fluoreszierenden Oligonukleotids (Cy5) genutzt.

4.2.6.1 Durchführung des f-EMSA

Nach Gießen und Aushärten des Agarose-Gels wurden fünf Eppendorf-Reaktionsgefäße mit dem Bindungs-Reaktions-Gemisch, bestehend aus: 4 µl 5-fach Tris-Puffer, 2 µl 10-fach Reaktionspuffer, 2 µl 10-fach BSA-Lösung, 1 µl Poly-(dl:dC)Natriumsalz (1 µg/µl) und 4 µl H₂O, befüllt. Die Eppendorf-Gefäße wurden gevortext, um mögliche Luftblasen zu entfernen und folgende Proteinproben hinzugegeben:

- (1) 6 µl eines Kontrollproteins (empty vector; EV)
- (2) 6 µl des TRαWT
- (3) 2 µl des TRαWT + 2 µl des RXR + 2 µl des EV
- (4) 2 µl des TRαWT + 2 µl des RXR + 2 µl des TRαΔ1
- (5) 6 µl des TRαΔ1

Diese Ansätze wurden mit der Pipette vorsichtig durchmischt und für 15 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 µl Cy5-Antikörper verbunden mit der DR4-oligo-DNS-Sequenz pro Eppendorf-Gefäß. Nach Durchmischen mit der Pipette folgte die Inkubation für 30 min abgedunkelt bei RT. Nach 30 min wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die Proben und zusätzlich ein Laufmarker (BlueJuice) wurden nun in die Taschen des Agarose-Gels gegeben. Angeschlossen bei 100V lief das Gel ca. 30-45 min. Die Visualisierung erfolgte durch VersaDoc MP4000.

4.2.7. Statistische Analyse

Alle im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden als Mittelwert ± SEM (standard error of mean) angegeben. Als statistischer Test wurde eine one-way ANOVA mit Turkey's post-hoc Test durchgeführt. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als signifikant unterschiedlich erachtet, dies entspricht einem alpha Fehler von 5%. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2016 Version 16.0 sowie GraphPad Prism 9 (2020, GraphPad Software, Inc.).

5. ERGEBNISSE

5.1 Erzeugung einer TR α Δ 1-c-flag-Variante und deren Nachweis

Der 1997 von Chassande et al. bei der Identifizierung und Beschreibung der TR α Δ -Varianten genutzte Antikörper „Antibody No. 21“ ist gegen die TR α Peptide 229-325 gerichtet. Um die Lokalisationsbestimmung in der Zelle durchführen zu können, setzten wir in das Plasmid eine Genfrequenz (c-flag) ein, gegen welche ein spezifischer Antikörper vorliegt (M2-Antikörper). Wir konnten mittels Western Blot nachweisen, dass die Zellen unsere TR α Δ 1-c-flag-Variante (s. Kapitel 3) exprimieren und das Protein in der Zelle vorliegt (s. Abb. 5). Da der verwendete M2-Antikörper gegen die Aminosäurefrequenz des c-flags gerichtet ist und der TR α Δ 1 eine Masse von ca. 16kD besitzt, fanden wir die Bande auf der zu erwartenden Höhe (TR α WT c-flag-Variante zur Kontrolle bei ca. 55 kD). Somit haben wir einen spezifischen Antikörper, welcher ausschließlich gegen unser TR α Δ 1-c-flag Protein gerichtet ist.

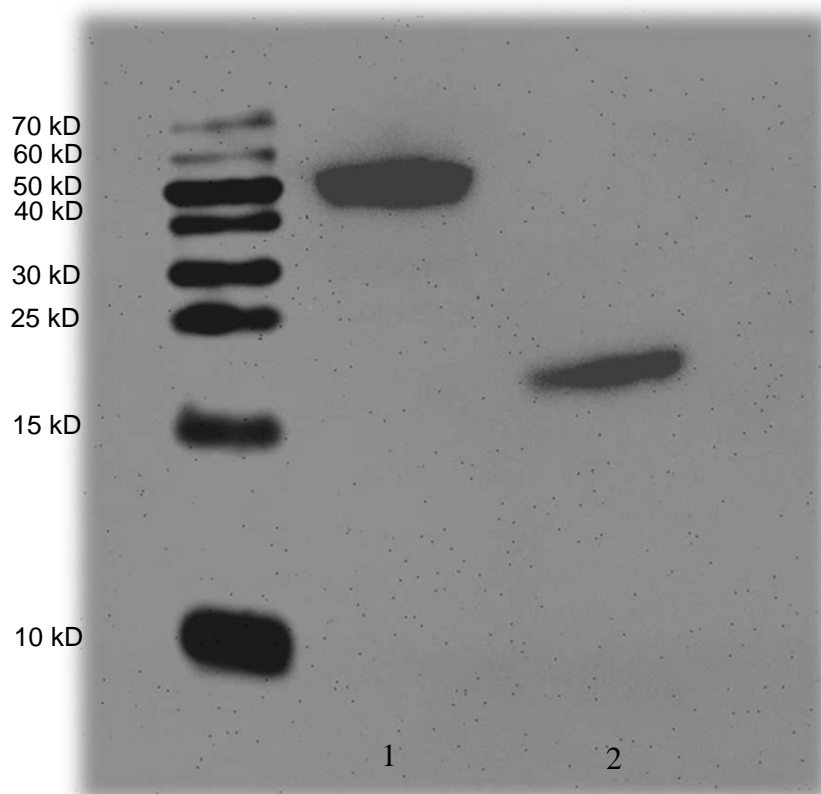


Abbildung 5: Western-Blot: **1:** TR α WT c-flag (ca. 43 kD); **2:** TR α Δ 1 c-flag (ca. 16 kD); Anti-FLAG M2® Antikörper

5.2 Wirkung des TR α Δ 1 auf die Genexpression

Chassande et al. beschrieben 1997 eine inhibierende Wirkung des TR α Δ 1 auf die Genexpression mittels CAT-Elisa.

In unseren Versuchen erfolgte die Bestimmung der Genexpression über Luciferase-Assay. Eine Stimulation der HeLa-Zellen, welche mit dem TR α WT-Plasmid transfiziert wurden, mit T3 führte zu einer signifikanten Zunahme der Luziferaseaktivität als Ausleseparameter der Luciferaseexpression gegenüber untransfizierten Zellen. Zur Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, welche mit dem TR α G291R-Plasmid transfiziert wurden. Dieses Protein hat eine nachgewiesene inhibierende Wirkung aufgrund des oben beschriebenen dominant negativen Effekts einer Mutation mit Behinderung der T3-Bindung. In unseren Versuchen zeigt sich, dass wenn TR α G291R alleine transfiziert wird, sich keine Steigerung der Luciferaseaktivität nach T3-Gabe zeigt. Werden TR α WT und TR α G291R jedoch zusammen transfiziert sieht man eine signifikante Hemmung nach T3-Gabe (dominant negativer Effekt, Kontrolle). Zellen, welche mit TR α Δ 1 transfiziert wurden, zeigten eine sehr geringe Genexpression nach T3-Stimulation. Wenn TR α WT und TR α Δ 1 zusammen transfiziert wurden, zeigte sich keine signifikante Inhibierung der Luciferaseaktivität nach T3-Gabe (s. Abb. 6).

In unseren Versuchen zeigte sich, dass die TR α Δ 1-Variante keinen inhibierenden Einfluss auf die Transkriptionsaktivität der TR α WT-Variante hat. Ebenfalls konnte allenfalls eine geringe Stimulierung der Luciferaseaktivität der TR α Δ 1-Variante durch T3-Zugabe beobachtet werden. Der Luciferase-Assay wurde auch unter Hinzugabe des RXR-Plasmids in Kotransfektion mit der TR α Δ 1-Variante durchgeführt. Es ließ sich auch hier keine Inhibierung des TR α WT beobachten (s. Abb. 7). Somit haben Fehlen oder Vorhandensein des RXR keinen Einfluss auf die Wirkung des TR α Δ 1 auf Transkriptionsebene.

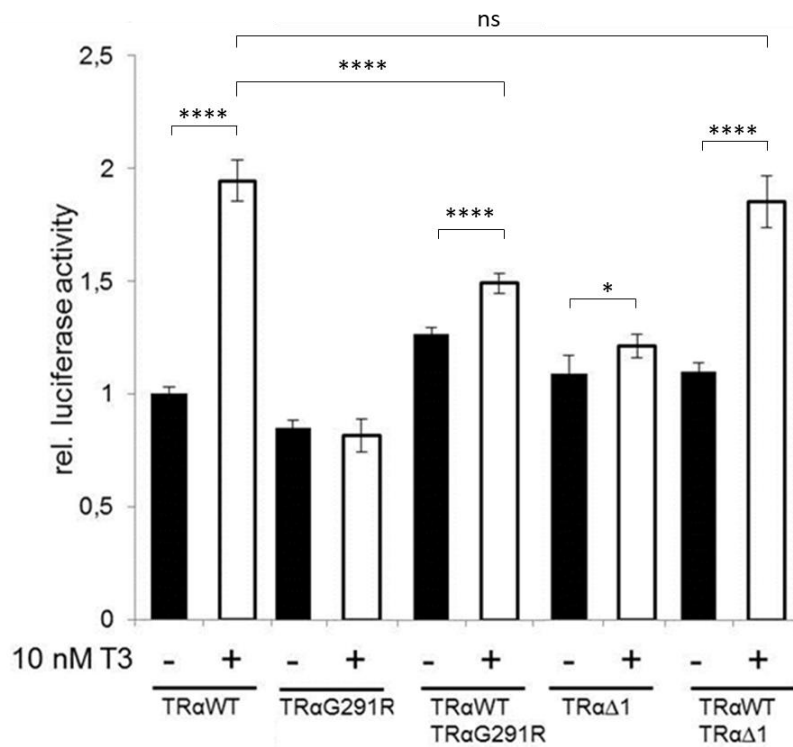


Abbildung 6: Relative Aktivität der Genexpression nach Transfektion und Stimulation mit T3. Luciferase-Assay. Transfiziert wurden HeLa-Zellen mit TRαWT, TRαG291R und TRαΔ1 sowie DR4. Koftransfektion erfolgte im Verhältnis 1:4 (TRαWT: TRαG291R/ TRαΔ1) (Schwarze Säulen). Stimulierung mit T3 erfolgte 24h nach Transfektion mit 10nM T3 (weiße Säulen). (n= 3; mean ± SEM; ANOVA und Tukey's post hoc test; ns=nicht signifikant, * P<0,05 **** P<0.0001)

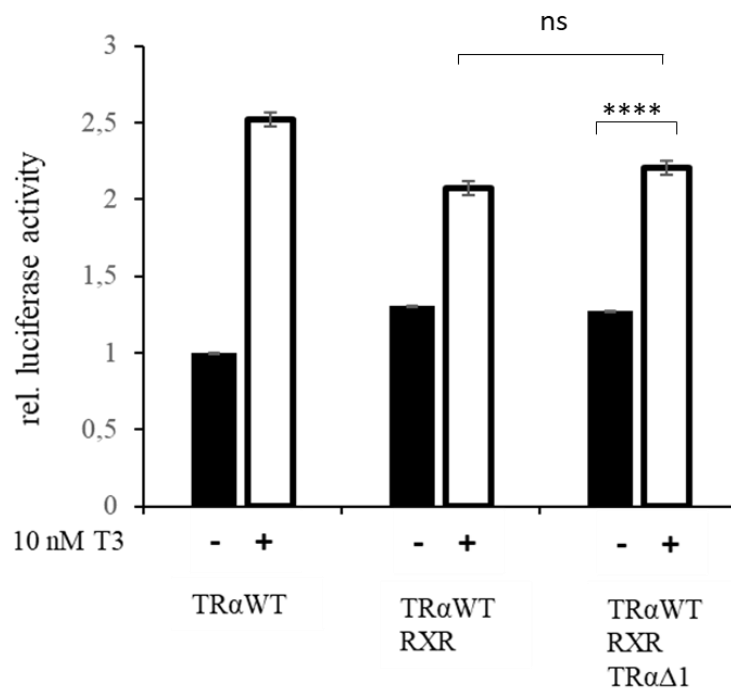


Abbildung 7: Relative Aktivität der Genexpression nach Transfektion und Stimulation mit T3. Luciferase-Assay. Transfiziert wurden HeLa-Zellen mit TRαWT, RXR und TRαΔ1 sowie DR4. Kotransfektion erfolgte im Verhältnis 1:1 bzw. 1:1:4 (TRαWT: RXR: TRαΔ1) (Schwarze Säulen). Stimulierung mit T3 erfolgte 24h nach Transfektion mit 10nM T3 (weiße Säulen). (n= 3; mean ± SEM; ANOVA und Tukey's post hoc test; ns=nicht signifikant, **** P<0.0001)

5.3 Lokalisation der TRαΔ1-c-flag-Variante in der Zelle

Laut Chassande et al. (1997) befindet sich der TRαΔ1 sowohl im Zytosol, als auch innerhalb des Kerns.

In unseren Versuchen wurden c-flag-Varianten der Plasmide verwendet, an die der M2-Antikörper sehr spezifisch bindet. Mithilfe eines Konfokalmikroskops wurde die intrazelluläre Lokalisation untersucht. Das Zytoskelett wurde mit Phalloidin-488 angefärbt und stellt sich grün dar. Der Zellkern wurde mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt und zeigt sich in blau. Der TRα-c-flag bzw. TRαΔ1-c-flag mittels Anti-M2 als Primär- und Anti-Cy3 als Sekundärantikörper angefärbt, stellt sich in rot dar.

Der TR α WT-c-flag mit vorhandener Kernlokalisationssequenz befindet sich fast ausschließlich im Kern (Abb. 8 A). Der TR $\alpha\Delta$ 1-c-flag dagegen, welcher keine Kernlokalisationssequenz besitzt, befindet sich vornehmlich im Zytosol (Abb. 8 B und C). Mit höherer Vergrößerung (Abb. 8 C) und vor allem bei Betrachtung der Schichtaufnahme durch das Konfokalmikroskop (Abb. 8 D) zeigt sich in Bezug auf die Lokalisation des TR $\alpha\Delta$ 1-c-flag eine klare Abgrenzung zwischen Kern und Zytosol. Der TR $\alpha\Delta$ 1-c-flag ist somit nicht im Zellkern vorhanden.

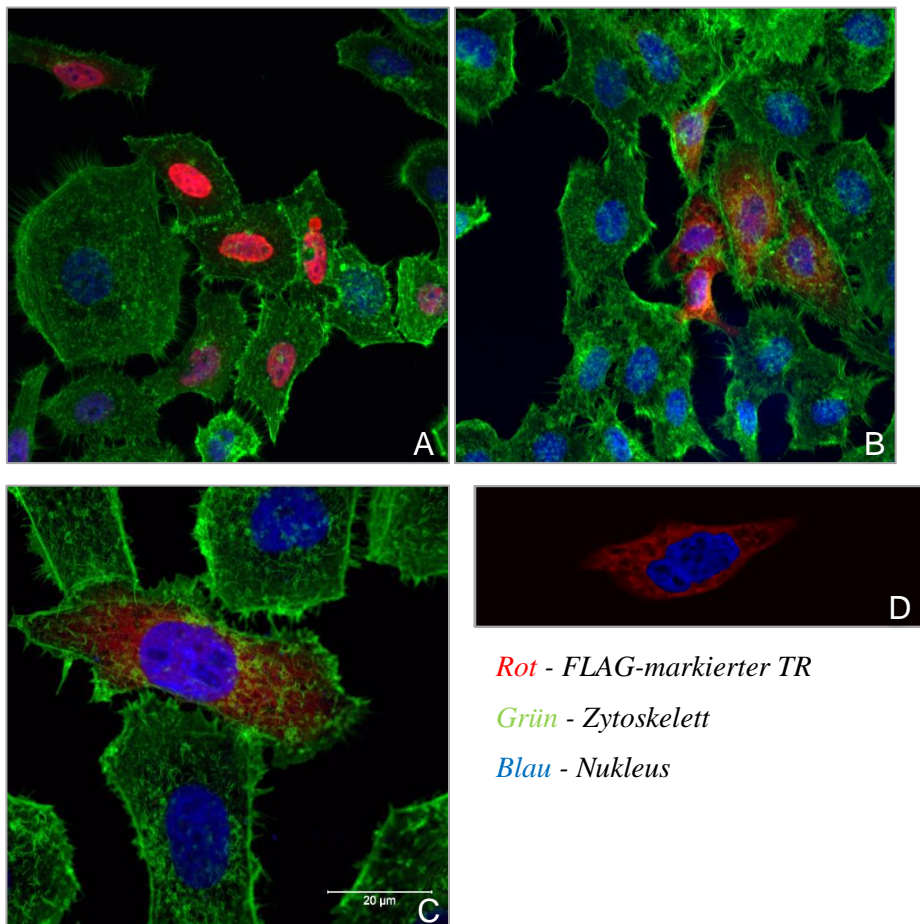


Abbildung 8: Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von TR $\alpha\Delta$ 1; Immunfluoreszenzfärbung (HeLa-Zellen) in 20- bzw. 100facher Vergrößerung. **A** TR α WT lokalisiert im Kern, **B** TR $\alpha\Delta$ 1 20x, **C** TR $\alpha\Delta$ 1 100x zytoplasmatisch lokalisiert mit Überlagerungen auf dem Kern, **D** Schichtaufnahme TR $\alpha\Delta$ 1 Lokalisation scharf begrenzt auf Zytosol; Exzitationswellenlänge 548 nm, Emissionswellenlänge 561 nm

5.4 DNA/Protein-Interaktionen zwischen TR α WT, TR α Δ 1 und RXR

Da TR α und RXR Heterodimere bilden (Williams et al., 1992), untersuchten wir mittels electric mobility shift assay (EMSA), ob eine Interaktion zwischen TR α Δ 1 und dem RXR stattfindet. Unser Ziel war es, zu untersuchen, ob der TR α Δ 1 über Heterodimerisierung mit dem RXR in den Kern gelangt oder durch Heterodimerisierung die Interaktion zwischen WT TR α und RXR stören könnte.

Als Negativkontrolle wurde ein Kontrollprotein (empty vector, EV) in den Versuchen mitgeführt. Man sieht, dass sich keine zusätzliche Bande bildet. In der nächsten Lane wurde eine Probe mit TR α WT aufgetragen. Man sieht die entsprechende zusätzliche, etwas höher laufende Bande. Es folgt eine Lane, in welcher TR α WT und RXR zusammen aufgetragen wurden. Es bildet sich neben der TR α WT-Bande eine zusätzliche Bande, welche die Komplexbildung mit dem RXR anzeigt. In der nächsten Lane wurden der TR α WT, der RXR und TR α Δ 1 zusammen aufgetragen. Man erkennt wieder die Bande für den TR α WT sowie die Bande, die den Komplex mit dem RXR anzeigt. Eine weitere Bande, die eine Komplexbildung zwischen TR α Δ 1 und RXR anzeigt, ist nicht vorhanden. Passend dazu erkennt man auf der nächsten Lane, auf welcher der TR α Δ 1 und der RXR zusammenaufgetragen wurden, keine Bande, welche eine Komplexbildung anzeigt (s. Abb. 9).

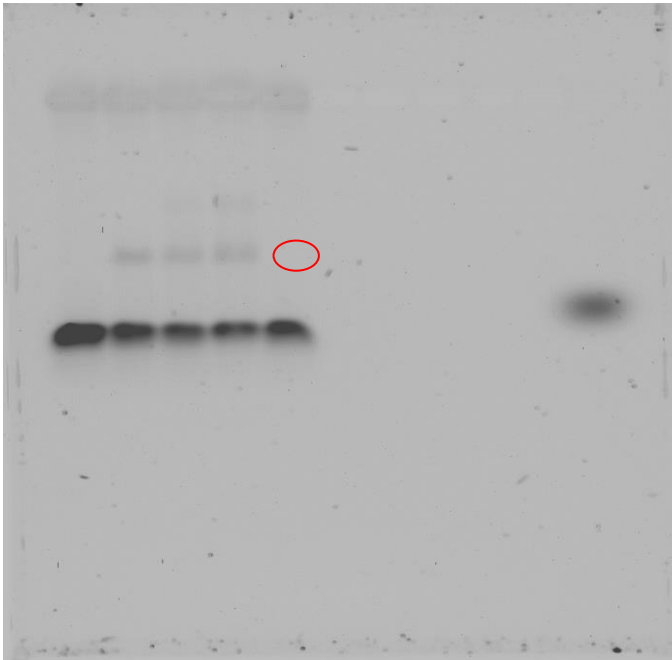


Abbildung 9: Interaktion des RXR mit TRαWT und TRαΔ1; aufgetragen auf die Lanes sind von links nach rechts: EV; TRαWT; WT + RXR; WT + RXR + Δ1 ; RXR + Δ1 (fehlende Bande mit rotem Kreis markiert) Gesamtvolumen d. Plasmide jeweils 6 μl

6. DISKUSSION

Über 20 Jahre war der Stand der Wissenschaft, dass die TR α Δ 1-Variante eine inhibierende Wirkung auf die Wirkungsweise des TR α 1 habe und unter anderem im Zellkern lokalisiert sei. Wir stellten dies infrage, da die TR α Δ 1-Variante über keine Kernlokalisationsfrequenz verfügt und auch somit die inhibierende Wirkung, die über Bindung an die DNS erfolgen sollte, schwer zu erklären war.

Bezüglich der Inhibierung verwendeten wir modernere Methoden. Anstatt der CAT-Elisa-Methode überprüften wir die Inhibierung mittels Luciferase-Assay, welcher um einiges sensitiver ist. Hierbei führten wir die Versuche sowohl mit als auch ohne c-flag-getaggtter TR α Δ 1-Variante durch, wobei die Ergebnisse unverändert blieben. Ebenfalls führten wir Versuche durch, bei welchen wir zusätzlich eine Co-Transfektion mit dem RXR-Plasmid vornahmen, um zu überprüfen, ob der TR α Δ 1 gebunden an den RXR-Rezeptor in den Kern gelangt und somit die inhibitorische Wirkung entfalten kann. Jedoch konnten wir auch hier keine inhibitorische Wirkung beobachten. Im electricity mobility shift assay konnten wir ebenfalls keine Wechselwirkung zwischen dem TR α Δ 1 und dem RXR-Rezeptor beobachten.

Um die Lokalisation zu überprüfen, erzeugten wir erst eine c-flag-Variante des TR α Δ 1, bei welcher das N-terminale-Ende unverändert blieb. Dieses soll entscheidend sein für die Inhibierung. Die Wahrscheinlichkeit, dass die c-flag-Markierung das Ergebnis der Lokalisation innerhalb der Zelle beeinflusst, ist gering. Die Markierung ist im Verhältnis zum Plasmid sehr klein und kann nicht mit einer Kernlokalisationssequenz interferieren, da der TR α Δ 1-WT diese nicht besitzt. Gänzlich ausschließen können wir einen Einfluss der Markierung jedoch nicht. Mit dieser c-flag-Variante konnten wir einen hochspezifischen Antikörper bei der Herstellung der Immunfluoreszenzbilder verwenden, im Gegensatz zu dem verwendeten Antikörper von vor 20 Jahren. Der damals verwendete Antikörper war weniger spezifisch, da er gegen eine Aminosäuresequenz gerichtet war, die auch beim TR α 1WT vorhanden ist. Somit war dieser Antikörper teils auch an den TR α 1-Rezeptor gebunden. Außerdem wurde, um die Immunfluoreszenzbilder zu ermitteln, ein Konfokalmikroskop benutzt. Hiermit war es nun möglich, eindeutig die Lokalisation der Signale auch in der 3. Ebene zu bestimmen und somit Überlagerungen (beispielsweise

über oder unter dem Zellkern) auszuschließen bzw. zu bestimmen. Wir konnten zeigen, dass ohne die Bestimmung in der 3. Ebene, die genaue Lokalisation schwierig ist. Durch die Überlagerung des Zellkerns kann man leicht zu der falschen Annahme gelangen, der TR $\alpha\Delta$ 1 wäre auch innerhalb dieses Zellkompartiments vorhanden. Durch die Schnittbildgebung jedoch war es uns möglich, diesen Sachverhalt zu widerlegen. Bei genauem Betrachten der Schnittbilder liegt das Protein eindeutig außerhalb des Zellkerns.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die physiologische Bedeutung des TR $\alpha\Delta$ 1 weitaus geringer ist als anfangs angenommen. In Knock-out-Maus-Modell-Versuchen jedoch, die nur TR $\alpha\Delta$ 1 und 2 exprimieren konnten, verstarben die Tiere innerhalb kurzer Zeit nach Geburt an einer gravierenden Hypothyreose. Eine Gabe von T3 verhinderte den Tod der Tiere (Fraichard et al., 1997). Ein Gedanke wäre, dass ohne die Präsenz des TR α oder auch des TR β ein Ungleichgewicht entsteht, welches für den Organismus eine toxische Wirkung besitzt. Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung bei KO-Mäusen, die weder TR α noch TR $\alpha\Delta$ -Varianten bilden können, aber trotzdem überlebensfähig sind. Hierbei gibt es eine These, dass der TR β teilweise Funktionen übernimmt (Wikström et al., 1997). Erwähnenswert ist, dass die TR α GS-Mutante überlebensfähig ist (Hönes GS et al., 2017). Diese Mutante zeichnet sich dadurch aus, zwar den TR α -Rezeptor und wahrscheinlich auch seine Splicing-Varianten bilden zu können, jedoch ohne die Fähigkeit an die DNS binden zu können. Ihr Phänotyp ähnelt eher der TR $\alpha^{0/0}$ -Maus von Wikström insbesondere bezüglich der Knochenstruktur und nicht der TR $\alpha^{-/-}$ -Maus von Fraichard. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die TR $\alpha\Delta$ -Produkte ihre inhibierende Wirkung, die höchstwahrscheinlich im Zytosol stattfindet, nicht entfalten können, da der TR α dort ebenfalls in physiologischer Konzentration vorliegt. Unsere Ergebnisse schließen nicht vollkommen aus, dass die TR $\alpha\Delta$ 1 und 2 -Varianten möglicherweise einen Coaktivator im Zytosol binden und dadurch interferieren. Die unterschiedlichen Phänotypen zwischen dem Mausmodell von Fraichard und Wikström könnten daraus resultieren, dass der TR α eine höhere Affinität besitzt oder in höheren Konzentrationen im Zytosol vorliegt, sodass die gänzliche Wirkung der TR $\alpha\Delta$ -Varianten sich nur in Abwesenheit des TR α entfaltet. Dies könnte dadurch geschehen, dass die gebundenen Cofaktoren durch die Delta-Varianten dann wiederum dem TR β fehlen, von welchem ja auch vermutet wird, Funktionen des TR α teilweise zu übernehmen.

Wie genau der TR α , Coaktivatoren und TR $\alpha\Delta 1$ und -2 sich im Zytosol gegenseitig beeinflussen und interagieren, müsste genauer untersucht werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

7.1 Physiologische Relevanz der TR α Δ 1-Variante

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und dem aktuellen Stand der Wissenschaft, scheint die Thyroidrezeptor (TR)- α Δ 1-Variante keine klare inhibierende physiologische Funktion zu besitzen.

Die TR α Δ 1-Variante besitzt keine Kernlokalisationssequenz. Ihre Lokalisation außerhalb des Zellkerns konnte mittels Konfokalmikroskop und spezifischem c-flag-Antikörper gezeigt werden.

Eine inhibitorische Wirkung konnte der TR α Δ 1-Variante nicht zugeordnet werden.

Es zeigte sich keine inhibitorische Wirkung im Luciferase-Assay, unabhängig von der Anwesenheit des Rezeptors für 9-cis Retinsäure (RXR)-Rezeptors. Dieses Ergebnis stützt die Lokalisation der TR α Δ 1-Variante außerhalb des Zellkerns, da dort die inhibitorische Wirkung beschrieben wurde. Gelangt der TR α Δ 1 nicht dorthin, kann er diese Wirkung auch nicht entfalten.

Somit bleibt nur ein sog. Cofaktor-Squelching als mögliche Erklärung für die Knock-out-Mausmodelle. Bei diesen Modellen fehlt dann teilweise der TR α , jedoch werden die Delta-Varianten gebildet. Die Mäuse versterben früh nach der Geburt. Für den verbliebenen TR β könnten die Transkriptionsfaktoren durch die TR α Δ 1-Variante im Zytosol gebunden und reduziert werden, was in letzter Instanz zum Tode der Mäuse führt.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Astapova, I., Lee, L.J., Morales, C., Tauber, S., Bilban, M., and Hollenberg, A.N. (2008). The nuclear corepressor, NCoR, regulates thyroid hormone action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 19544-19549.
2. Bassett, J.H., Harvey, C.B., and Williams, G.R. (2003). Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* *213*, 1-11.
3. Bigler, J., and Eisenman, R.N. (1988). c-erbA encodes multiple proteins in chicken erythroid cells. *Mol Cell Biol* *8*, 4155-4161.
4. Blum/Müller-Wieland (2020). *Klinische Pathophysiologie* (Thieme).
5. Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., and Samarut, J. (1997). Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol* *11*, 1278-1290.
6. Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Kedinger, M., Malaval, L., *et al.* (1997). The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J* *16*, 4412-4420.
7. Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J., and Samarut, J. (1999). Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J* *18*, 623-631.
8. Hadzic, E., Habeos, I., Raaka, B.M., and Samuels, H.H. (1998). A Novel Multifunctional Motif in the Amino-terminal A/B Domain of T3R α Modulates DNA

Binding and Receptor Dimerization*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 10270-10278.

9. Hollenberg, A.N., Monden, T., Flynn, T.R., Boers, M.E., Cohen, O., and Wondisford, F.E. (1995a). The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Molecular Endocrinology* 9, 540-550.

10. Hollenberg, A.N., Monden, T., and Wondisford, F.E. (1995b). Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem* 270, 14274-14280.

11. Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Brad Thompson, E., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.

12. Hönes, G.S., Rakov, H., Logan, J., Liao, X.-H., Werbenko, E., Pollard, A.S., Præstholm, S.M., Siersbæk, M.S., Rijntjes, E., Gassen, J., *et al.* (2017). Noncanonical thyroid hormone signaling mediates cardiometabolic effects in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E11323-E11332.

13. Jansson, M., Philipson, L., and Vennström, B. (1983). Isolation and characterization of multiple human genes homologous to the oncogenes of avian erythroblastosis virus. *Embo j* 2, 561-565.

14. Koenig, R.J., Warne, R.L., Brent, G.A., Harney, J.W., Larsen, P.R., and Moore, D.D. (1988). Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5031-5035.

15. Kuroda, G., Sasaki, S., Matsushita, A., Ohba, K., Sakai, Y., Shinkai, S., Nakamura, H.M., Yamagishi, S., Sato, K., Hirahara, N., *et al.* (2020). GATA2 mediates the negative

regulation of the prepro-thyrotropin-releasing hormone gene by liganded T3 receptor β 2 in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *PLoS One* *15*, e0242380.

16. Lazar, M. (1993a). Thyroid hormone receptors; multiple forms, multiple possibilities. In *Endocr Rev* *14*, pp. 348-399.

17. Lazar, M.A. (1993b). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* *14*, 184-193.

18. Makowski, A., Brzostek, S., Cohen, R.N., and Hollenberg, A.N. (2003). Determination of nuclear receptor corepressor interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* *17*, 273-286.

19. Martin, N.P., Marron Fernandez de Velasco, E., Mizuno, F., Scappini, E.L., Gloss, B., Erxleben, C., Williams, J.G., Stapleton, H.M., Gentile, S., and Armstrong, D.L. (2014). A rapid cytoplasmic mechanism for PI3 kinase regulation by the nuclear thyroid hormone receptor, TR β , and genetic evidence for its role in the maturation of mouse hippocampal synapses in vivo. *Endocrinology* *155*, 3713-3724.

20. Mavinakere, M.S., Powers, J.M., Subramanian, K.S., Roggero, V.R., and Allison, L.A. (2012). Multiple novel signals mediate thyroid hormone receptor nuclear import and export. *J Biol Chem* *287*, 31280-31297.

21. McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell* *108*, 465-474.

22. Mitsuhashi, T., Tennyson, G.E., and Nikodem, V.M. (1988). Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 5804-5808.

23. Moeller, L.C., Dumitrescu, A.M., and Refetoff, S. (2005). Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol Endocrinol* *19*, 2955-2963.
24. Nagaya, T., Madison, L.D., and Jameson, J.L. (1992). Thyroid hormone receptor mutants that cause resistance to thyroid hormone. Evidence for receptor competition for DNA sequences in target genes. *Journal of Biological Chemistry* *267*, 13014-13019.
25. Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M., and Schwabe, J.W. (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* *13*, 3209-3216.
26. NAKANO, K., MATSUSHITA, A., SASAKI, S., MISAWA, H., NISHIYAMA, K., KASHIWABARA, Y., and 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. *Biochemical Journal* *378*, 549-557.
27. Oppenheimer, J.H., and Schwartz, H.L. (1997). Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr Rev* *18*, 462-475.
28. Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Mariash, C.N., Kinlaw, W.B., Wong, N.C.W., and Freake, H.C. (1987). Advances in Our Understanding of Thyroid Hormone Action at the Cellular Level*. *Endocrine Reviews* *8*, 288-308.
29. Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.N., Samarut, J., and Chassande, O. (2001). Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol* *21*, 4761-4772.
30. Samuels, H.H., Forman, B.M., Horowitz, Z.D., and Ye, Z.S. (1988). Regulation of gene expression by thyroid hormone. *The Journal of clinical investigation* *81*, 957-967.

31. Sap, J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., and Vennström, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635-640.
32. Schueler, P.A., Schwartz, H.L., Strait, K.A., Mariash, C.N., and Oppenheimer, J.H. (1990). Binding of 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) and its Analogs to the in Vitro Translational Products of c-erbA Protooncogenes: Differences in the Affinity of the α - and β -Forms for the Acetic Acid Analog and Failure of the Human Testis and Kidney α -2 Products to Bind T3. *Molecular Endocrinology* 4, 227-234.
33. Segal, J., and Ingbar, S.H. (1981). Studies of the mechanism by which 3,5,3'-triiodothyronine stimulates 2-deoxyglucose uptake in rat thymocytes in vitro. Role of calcium and adenosine 3':5'-monophosphate. *J Clin Invest* 68, 103-110.
34. Segal, J., and Ingbar, S.H. (1985). In vivo stimulation of sugar uptake in rat thymocytes. An extranuclear action of 3,5,3'-triiodothyronine. *The Journal of clinical investigation* 76, 1575-1580.
35. Shibusawa, N., Hashimoto, K., Nikrodhanond, A.A., Liberman, M.C., Applebury, M.L., Liao, X.H., Robbins, J.T., Refetoff, S., Cohen, R.N., and Wondisford, F.E. (2003a). Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 588-597.
36. Shibusawa, N., Hashimoto, K., Nikrodhanond, A.A., Liberman, M.C., Applebury, M.L., Liao, X.H., Robbins, J.T., Refetoff, S., Cohen, R.N., and Wondisford, F.E. (2003b). Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 112, 588-597.
37. Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., and Liao, J.K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541.

38. Storey, N.M., Gentile, S., Ullah, H., Russo, A., Muessel, M., Erxleben, C., and Armstrong, D.L. (2006). Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 5197-5201.
39. Storey, N.M., O'Bryan, J.P., and Armstrong, D.L. (2002). Rac and Rho mediate opposing hormonal regulation of the ether-a-go-go-related potassium channel. *Curr Biol* *12*, 27-33.
40. Tagami, T., Yamamoto, H., Moriyama, K., Sawai, K., Usui, T., Shimatsu, A., and Naruse, M. (2010). Identification of a novel human thyroid hormone receptor β isoform as a transcriptional modulator. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *396*, 983-988.
41. Tone, Y., Collingwood, T.N., Adams, M., and Chatterjee, V.K. (1994). Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. *Journal of Biological Chemistry* *269*, 31157-31161.
42. Umesono, K., and Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* *57*, 1139-1146.
43. Vella, K.R., Ramadoss, P., Costa-e-Sousa, R.H., Astapova, I., Ye, F.D., Holtz, K.A., Harris, J.C., and Hollenberg, A.N. (2014). Thyroid Hormone Signaling *In Vivo* Requires a Balance between Coactivators and Corepressors. *Molecular and Cellular Biology* *34*, 1564-1575.
44. Vennström, B., and Bishop, J.M. (1982). Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus. *Cell* *28*, 135-143.
45. Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., and Evans, R.M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* *324*, 641-646.

46. Weiss, R.E., Forrest, D., Pohlenz, J., Cua, K., Curran, T., and Refetoff, S. (1997). Thyrotropin regulation by thyroid hormone in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Endocrinology* *138*, 3624-3629.
47. Wikstrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Baas, F., Forrest, D., Thoren, P., and Vennstrom, B. (1998). Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J* *17*, 455-461.
48. Williams, G.R. (2000). Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor β Isoforms. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 8329-8342.
49. Williams, G.R., Harney, J.W., Moore, D.D., Larsen, P.R., and Brent, G.A. (1992). Differential capacity of wild type promoter elements for binding and trans-activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Molecular Endocrinology* *6*, 1527-1537.
50. Yang, Z., Hong, S.-H., and Privalsky, M.L. (1999). Transcriptional Anti-repression: THYROID HORMONE RECEPTOR β -2 RECRUITS SMRT COREPRESSOR BUT INTERFERES WITH SUBSEQUENT ASSEMBLY OF A FUNCTIONAL COREPRESSOR COMPLEX*. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 37131-37138.
51. Yen, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* *81*, 1097-1142.
52. Yen, P.M. (2015). Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex biological responses: A look at health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* *29*, 517-528.

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 2: Technische Utensilien	22
Tabelle 3: Register von primären und sekundären Antikörpern.....	23
Tabelle 4: Plasmide	23
Tabelle 5: Kits	24
Tabelle 6: Verbrauchsgegenstände	24
Tabelle 7: Primer	25

10.ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: **A** Grundlegende Struktur der Thyroidrezeptoren: A/B = aminoternale Domäne; C = DNA-Bindedomäne; D = Kernlokalisationssequenz; E/F = Ligandbindedomäne; **B** Verschiedene Splicingvarianten der Thyroidrezeptoren α und β ; modifiziert nach Lazar 1993, Chassande et al. 1997 und Williams GR 2000..... 7

Abbildung 2: Non-canonical bzw. nicht-klassische Wirkungsweise des TR β . In Verbindung mit T3 aktiviert der TR β im Zytosol die Phosphatinositol-3-kinase welche wiederum die Expression von HIF-1 α und weiteren Zielgenen steigert; modifiziert nach Moeller et al. 2005 13

Abbildung 3: Chassande et al.1997: Effekt der TR $\alpha\Delta 1$ (p16 $\alpha 1$) auf TR $\alpha 1$ (T3R α), TR $\beta 1$ (T3R β) und RAR α gemessen mittels CAT-Elisa. Transfiziert wurden jeweils 1 mg des jeweiligen Plasmids und 4 mg des TR $\alpha\Delta 1$ -Plasmids. Die Zellen wurden im Vorfeld mit 1027 M T3 inkubiert..... 16

Abbildung 4: Erzeugung der c-FLAG TR $\alpha\Delta 1$ -Variante via Mutagenese-PCR und TR α c-FLAG-Plasmids; Blau – TR α Gensequenz bzw. nach Mutagenesis PCR TR $\alpha\Delta 1$ Gensequenz, Rot - c-FLAG Gensequenz. Durch zwei Primer, die an den beiden Methioninpositionen binden, wird das benötigte TR $\alpha\Delta 1$ c-Flag Plasmid erzeugt. 27

Abbildung 5: Western-Blot: **1:** TR α WT c-flag (ca. 43 kD); **2:** TR $\alpha\Delta 1$ c-flag (ca. 16 kD); Anti-FLAG M2[®] Antikörper..... 35

Abbildung 6: Relative Aktivität der Genexpression nach Transfektion und Stimulation mit T3. Luciferase-Assay. Transfiziert wurden HeLa-Zellen mit TR α WT, TR α G291R und TR $\alpha\Delta 1$ sowie DR4. Kotransfektion erfolgte im Verhältnis 1:4 (TR α WT: TR α G291R/ TR $\alpha\Delta 1$) (schwarze Säulen). Stimulierung mit T3 erfolgte 24h nach Transfektion mit 10nM T3 (weiße Säulen). (n= 3; mean \pm SEM; ANOVA und Tukey's post hoc test; ns=nicht signifikant, **** P<0.0001) 37

Abbildung 7: Relative Aktivität der Genexpression nach Transfektion und Stimulation mit T3. Luciferase-Assay. Transfiziert wurden HeLa-Zellen mit TR α WT, RXR und

TR α Δ 1 sowie DR4. Kotrans-fektion erfolgte im Verhältnis 1:1 bzw, 1:1:4 (TR α WT: RXR: TR α Δ 1) (Schwarze Säulen). Stimulierung mit T3 erfolgte 24h nach Transfektion mit 10nM T3 (weiße Säulen). (n= 3; mean \pm SEM; ANOVA und Tukey's post hoc test; ns=nicht signifikant, **** P<0.0001) 38

Abbildung 8: Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von TR α Δ 1; Immunfluoreszenzfärbung (HeLa-Zellen) in 20- bzw. 100facher Vergrößerung. **A** TR α WT lokalisiert im Kern, **B** TR α Δ 1 20x, **C** TR α Δ 1 100x zytoplasmatisch lokalisiert mit Überlagerungen auf dem Kern, **D** Schichtaufnahme TR α Δ 1 Lokalisation scharf begrenzt auf Zytoplasma; Exzitationswellenlänge 548 nm, Emissionswellenlänge 561 nm 39

Abbildung 9: Interaktion des RXR mit TR α WT und TR α Δ 1; aufgetragen auf die Lanes sind von links nach rechts: EV; TR α WT; WT + RXR; WT + RXR + Δ 1 ; RXR + Δ 1 (fehlende Bande mit rotem Kreis markiert) Gesamtvolumen d. Plasmide jeweils 6 μ l. 41

11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Chloramphenicol acetyltransferase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Binde-Domäne
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure (eng.: -acid)
DRIP	Vitamin D Rezeptor interagierenden Proteinen
DTT	Dithiothreitol
DUOX	Dualoxidase
ECL	Enhanced chemiluminescence
EMSA	Electro mobility shift assay
ES	Embryostammzellen
EV	Empty vector
FCS	fetales Kalbserum
GLUT1	Glucosetransporter 1
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAT	Histonacetylasen
HDAC	Histondeacetylasen
HIF1 α	Hypoxia-inducible-factor-1 α
HRE	hormone response elements
Kcnh2	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2
kDa	Kilodalton
KO-	Knock out-
LBD	Ligand-Binde-Domäne
MAPK	mitogen activated protein-Kinasen
MCT	Monocarboxyllattransporter
MEM	Minimum Essential Medium

Min	Minuten
NaOH	Sodium hydroxide
NCoR	nuclear receptor corepressor
PCR	Polychainreaction
PFKP	platelet-type phosphofructokinase
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-phosphate-3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	PIP3-dependent-kinase B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAR	Rezeptor für all-trans Retinsäure
RNA	Ribonukleinsäure (eng.: -acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime-Polymerasechainreaction
RXR	Rezeptor für 9-cis Retinsäure
s	Sekunden
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SRC	Steroid Receptor Coactivator
T3	Triiodthyronin
T4	Tetraiodthyronin
TH	Schilddrüsenhormone
TPO	Thyreoperoxidase
TR	Thyroid hormone receptor
TRAP	TR assoziierten Proteinen
TRE	Thyroid-Response-Element
TRH	Thyroidhormone releasing hormone
TSH	Thyreotropin
WT	Wildtyp

12. DANKSAGUNG

Danken möchte ich an erster Stelle Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Möller sowie Dr. rer. nat. Hönes für die Anregung zu diesem Thema und die tolle Betreuung.

Ein großer Dank geht auch an das Laborteam der AG-Möller, das mich in die Laborarbeit eingearbeitet hat und immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Gar nicht genug bedanken kann ich mich bei meiner Partnerin Selina Elfert, die mich beim Schreibprozess mit Anregungen und Korrekturlesen unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Als letztes möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Freisemester für die Laborarbeit nicht ohne weiteres möglich gewesen wäre. Ihnen widme ich diese Arbeit.

13. LEBENS LAUF

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