

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Direktor: Prof. Dr. Klaus Eder)

**„Untersuchungen zur Rolle der *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) in der Regulation von Genen der
Schilddrüsenhormonsynthese“**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. oec. troph.

am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Dekanin: Prof. Dr. Ingrid-Ute Leonhäuser)

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Susanne Rothe

Gutachter: Prof. Dr. K. Eder
Prof. Dr. U. Wenzel

Gießen 2011

In Erinnerung an meine Mutter

Elke Rothe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<i>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</i>	IV
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Schilddrüsenhormonsynthese und ihre Bedeutung für den Metabolismus	1
1.2 SREBPs und ihre mögliche Rolle bei der Expression schilddrüsenassoziierter Proteine	3
1.3 Die Rolle des PPAR α in der Genexpression der SREBPs in der Schilddrüse	6
1.4 Zielstellung der Arbeit	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Materialien	9
2.1.1 Chemikalien	9
2.1.2 Geräte und Hilfsmittel	10
2.1.3 Puffer und Lösungen	11
2.1.3.1 Hormone und Zusätze für die Zellkultivierung und -stimulation	11
2.1.3.2 Medien für die Zellkultur	12
2.1.3.3 Puffer für SDS-PAGE und Western Blot	12
2.1.3.4 Puffer für Gelelektrophorese von RNA und DNA	13
2.2 Arbeiten mit FRTL-5-Zellen	13
2.2.1 Zellkultivierung	13
2.2.2 Passagieren und Aussäen	14
2.2.3 Inkubationsversuch mit TSH und Forskolin	14
2.2.3.1 Inkubation über 24 Stunden	14
2.2.3.2 Inkubation im Zeitverlauf	15
2.2.4 Inkubationsversuch mit 25-Hydroxycholesterol und Cholesterol unter Einfluss von TSH und Forskolin	15
2.2.4.1 Inkubation über 24 Stunden	15
2.2.4.2 Inkubation im Zeitverlauf	16
2.2.5 Inkubationsversuch mit WY 14,643	16
2.3 Arbeiten mit Schweinethyreozyten in Primärkultur	16
2.3.1 Isolierung und Kultivierung von primären Schweinethyreozyten	16
2.3.2 Inkubationsversuch mit 25-Hydroxycholesterol unter Einfluss von TSH und Forskolin	17
2.4 Proteingewinnung mit dem Nuclear Extract Kit	17
2.5 Proteinbestimmung mit dem BC Assay Protein Quantitation Kit	18
2.6 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	18
2.7 Western Blot	19
2.8 RNA-Isolierung und RNA-Konzentrationsbestimmung	22
2.9 cDNA-Synthese	22

2.10	RTD-PCR	23
2.11	Statistische Auswertung	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Einfluss von TSH und Forskolin auf die Genexpression von SREBPs in FRTL-5-Zellen nach 24-stündiger TSH-Restriktion	27
3.1.1	Einfluss von TSH auf die Genexpression der SREBPs und ihrer Zielgene nach 24-stündiger Inkubation	27
3.1.1.1	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1	27
3.1.1.2	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c	28
3.1.1.3	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2	29
3.1.1.4	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2	30
3.1.2	Einfluss von Forskolin auf die Genexpression der SREBPs und ihrer Zielgene nach 24-stündiger Inkubation	31
3.1.2.1	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1	31
3.1.2.2	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c	32
3.1.2.3	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2	33
3.1.2.4	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2	34
3.1.3	Einfluss von TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf	35
3.1.4	Einfluss von Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf	36
3.2	Einfluss einer Behandlung mit TSH und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol auf die Genexpression der SREBPs, der SREBP-Zielgene und von NIS und TPO in FRTL-5-Zellen	37
3.2.1	Inkubation mit TSH und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol über 24 Stunden	38
3.2.1.1	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1	38
3.2.1.2	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c	40
3.2.1.3	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2	42
3.2.1.4	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2	44
3.2.1.5	Einfluss auf die Genexpression des NIS	45
3.2.1.6	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration der TPO	46
3.2.2	Inkubation mit TSH und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol im Zeitverlauf	47
3.2.2.1	Einfluss von TSH und 25-Hydroxycholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf	47
3.2.2.2	Einfluss von TSH und Cholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf	50
3.3	Einfluss einer Behandlung mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol auf die Genexpression der SREBPs, der SREBP-Zielgene und von NIS und TPO in FRTL-5-Zellen	52
3.3.1	Inkubation mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol über 24 Stunden	52
3.3.1.1	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1	52
3.3.1.2	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c	54

3.3.1.3	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2	55
3.3.1.4	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2	57
3.3.1.5	Einfluss auf die Genexpression des NIS	59
3.3.1.6	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration der TPO	60
3.3.2	Inkubation mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol im Zeitverlauf	61
3.3.2.1	Einfluss von Forskolin und 25-Hydroxycholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf	62
3.3.2.2	Einfluss von Forskolin und Cholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf	64
3.4	Einfluss einer Behandlung mit TSH und 25-Hydroxycholesterol auf die Genexpression des SREBP-2, der Zielgene des SREBP-2 und von NIS in primären porcinen Thyreozyten	66
3.4.1	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2	67
3.4.2	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2	68
3.4.3	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration des NIS	69
3.5	Einfluss einer Behandlung mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol auf die Genexpression des SREBP-2, der Zielgene des SREBP-2 und von NIS in primären porcinen Thyreozyten	70
3.5.1	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2	70
3.5.2	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2	71
3.5.3	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration des NIS	72
3.6	Einfluss einer Behandlung mit TSH und WY 14,643 auf die Genexpression der SREBPs, der SREBP-Zielgene und von NIS und TPO in FRTL-5-Zellen	73
3.6.1	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration des CPT-1a	73
3.6.2	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1	74
3.6.3	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c	75
3.6.4	Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2	76
3.6.5	Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2	77
3.6.6	Einfluss auf die Genexpression des NIS	78
3.6.7	Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration der TPO	79
4	Diskussion	81
4.1	Bedeutung der SREBPs für die Schilddrüsenhormonsynthese	81
4.1.1	Einfluss von TSH auf die Genexpression der SREBPs	81
4.1.2	Wirkungen von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol auf die SREBP-Genexpression in der Schilddrüse	87
4.1.3	Einfluss der SREBPs auf die Expression der schilddrüsenassoziierten Gene NIS und TPO	91
4.2	Bedeutung des PPAR α für die Genexpression der SREBPs in der Schilddrüse	94
4.3	Schlussfolgerungen	98
5	Zusammenfassung	99
6	Summary	101
7	Literaturverzeichnis	103

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle

Nr.	Titel	Seite
Tab. 1:	Zusammensetzung der Behandlungsmedien für die Inkubation mit 25-HC und Cholesterol	16
Tab. 2:	Zusammensetzung und Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE	19
Tab. 3:	Eigenschaften der Antikörper für den Western Blot	21
Tab. 4:	Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix je Reaktionsansatz	23
Tab. 5:	Eigenschaften der verwendeten Primer	25
Tab. 6:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c	29
Tab. 7:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	31
Tab. 8:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c	33
Tab. 9:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	35
Tab. 10:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c	41
Tab. 11:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c	42
Tab. 12:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	44
Tab. 13:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	45
Tab. 14:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c	54
Tab. 15:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c	55
Tab. 16:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	58
Tab. 17:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	59
Tab. 18:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	69
Tab. 19:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	72

Tab. 20:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c	76
Tab. 21:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2	78

Abbildung

Nr.	Titel	Seite
Abb. 1:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-1	28
Abb. 2:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2	30
Abb. 3:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-1	32
Abb. 4:	Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-2	34
Abb. 5:	Effekt einer Behandlung mit 10 mU/ml TSH über 6, 12, 24, 36 und 48 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen verschiedener Gene	36
Abb. 6:	Effekt einer Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin über 6, 12, 24, 36 und 48 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen verschiedener Gene	37
Abb. 7:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-1	40
Abb. 8:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2	43
Abb. 9:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des NIS	46
Abb. 10:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration der TPO	47
Abb. 11:	Effekt einer Behandlung mit 10 mU/ml TSH und 5 μ M 25-HC über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen verschiedener Gene	49
Abb. 12:	Effekt einer Behandlung mit 10 mU/ml TSH und 5 μ M Cholesterol über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen verschiedener Gene	51
Abb. 13:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-1	53
Abb. 14:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-2	57
Abb. 15:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des NIS	60
Abb. 16:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die relative mRNA-Konzentration der TPO	61
Abb. 17:	Effekt einer Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin und 5 μ M 25-HC über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen verschiedener Gene	64

Abb. 18:	Effekt einer Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin und 5 μ M Cholesterol über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen verschiedener Gene	66
Abb. 19:	Effekt einer Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2	68
Abb. 20:	Effekt einer Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration des NIS	69
Abb. 21:	Effekt einer Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-2	71
Abb. 22:	Effekt einer Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relative mRNA-Konzentration des NIS	72
Abb. 23:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration des CPT-1a	73
Abb. 24:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-1	75
Abb. 25:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2	77
Abb. 26:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des NIS	79
Abb. 27:	Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration der TPO	80

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALLN	N-acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (Calpain Inhibitor I)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninic Acid
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	cytosolische Fraktion
CO ₂	Kohlendioxid
CREs	cAMP responsive elements
CREB	cAMP responsive element binding protein
Ct	Cycle treshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dubelco´s Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynucleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	Formaldehyd
FAS	Fettsäuresynthase
FCS	fetal calf serum
GH	Somatotropin (growth hormone)
GPAT	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HB	Hypotonic Buffer
HBSS	Hank´s Buffered Salt Solution
HMGCoAR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IGF	insuline-like growth factor
Insigs	insulin induced genes
IP ₃	Inositol-3-Phosphat
IU	international units
LB	Lysis Buffer
LDL	low-density lipoprotein

Abkürzungsverzeichnis

LDLR	LDL-Rezeptor
LDS	Lithiumdodecylsulfat
mA	Miliamper
MK	Mevalonatkinase
mRNA	messenger RNA
mU	Miliunits
NCS	newborn calf serum
NF	nukleäre Fraktion
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
nm	Nanometer
NUE	NIS upstream enhancer
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PKA	Proteinkinase A
RNA	ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPS9	Ribosomales Protein S 9
RT	Raumtemperatur
RTD-PCR	realtime-detection PCR
RXR	retionoid X receptor
S1P/ S2P	Site-1-protease/ Site-2-protease
SCAP	SREBP-cleavage-activating-protein
SCD	Stearoyl-CoA-9-Desaturase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRE	sterol responsive element
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween
TC-H ₂ O	Tissue Culture Water
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPO	Thyroperoxidase
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor (thyroid hormone receptor)
TRE	TR responsive element
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSH	Thyreotropin (thyroidea stimulating hormone)
TTF-1, -2	thyroid transcription factor-1, -2
V	Volt
25-HC	25-Hydroxycholesterol

1 Einleitung

1.1 Die Schilddrüsenhormonsynthese und ihre Bedeutung für den Metabolismus

Forschungen zur Schilddrüse und ihrem Einfluss auf den Metabolismus wurden bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts durchgeführt (*Henderson 1897, Hutchinson 1898, King 1909*). Die Erforschung der molekularen Grundlagen der Hormonsynthese und –wirkung erfolgte erst Jahrzehnte später und dauert bis heute an.

Vermittelt durch die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T_3) und dem Prohormon Thyroxin (T_4), spielt die Schilddrüse bei der Regulation des Intermediärstoffwechsels eine zentrale Rolle. Ihre Wirkung besteht in einer allgemeinen Aktivierung des Stoffwechsels, die in einer Steigerung des Grundumsatzes und folglich einem erhöhten Energieverbrauch resultiert. Neben der Steigerung der enteralen Glucoseabsorption, der hepatischen Glycogenolyse und Gluconeogenese sowie der Proteinsynthese wird auch der Fettstoffwechsel durch eine Aktivierung der Lipolyse beeinflusst (*Schmidt et al. 2005*). Daneben spielen Schilddrüsenhormone bei der Ausreifung des Nervensystems, der Skelettmuskulatur und der Lungen im Embryo und Neugeborenen eine sehr wichtige Rolle (*Stubbe et al. 1986, Pasquini et al. 1994*). Bekannt sind außerdem eine kreislaufsteigernde Wirkung und eine Förderung der neuromuskulären Erregbarkeit (*Schmidt et al. 2005*). Ein Mangel oder eine Überversorgung mit Schilddrüsenhormonen kann folglich zu einer übermäßigen Belastung des Organismus führen. Einer genauen Anpassung des Hormonbedarfes an die jeweilige Stoffwechsellage kommt so eine große Bedeutung zu.

Die Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese erfolgt in einem negativen *feedback*-Mechanismus, vermittelt durch die verschiedenen im Verlauf der thyreotropen Achse sezernierten Hormone an die jeweils übergeordneten Zentren. Die Schilddrüsenhormonsynthese wird über die hypothalamische und hypophysäre Hormonfreisetzung induziert. Durch die vom Hypothalamus ausgehende Freisetzung von Thyreoliberin (TRH, *Thyreotropin-Releasing-Hormone*) werden die Zellen der Adenohypophyse zur Exkretion von Thyrotropin (TSH, *Thyroidea Stimulating Hormone*) stimuliert. Durch TSH wird zum einen Schilddrüsenwachstum und -differenzierung und zum anderen die Schilddrüsenhormonsynthese gesteigert. Die TSH-Wirkung wird durch Bindung an den TSH-Rezeptor, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor an der basolateralen Membran der Thyreozyten hervorgerufen (*Parmentier et al. 1989, Kero et al. 2007*). Dabei kommt es zu einer Aktivierung des Adenylatzyklase-cAMP-Weges und der IP_3 / Ca_2 -Kaskade (*Ambesi-Impimbato et al. 1980, Roger und Dumont 1984, Laurent et al. 1987, Raspé et al.*

1991, Allgeier et al. 1994, Van Sande et al. 2006). Wie bereits zu Beginn angeführt, erfolgt die Regulation dieser Hormonkaskade durch einen negativen *feedback*-Mechanismus, welcher von der Schilddrüsenhormonkonzentration im Plasma beeinflusst wird. So bewirken TSH und T₃ eine verminderte Thyreoliberinsekretion des Hypothalamus. Nach dem Prinzip der Endprodukthemmung blockieren die freigesetzten Schilddrüsenhormone und TSH auch ihre eigene Biosynthese (Prummel et al. 2004).

Neben dem TSH spielt im Rahmen der frühen Schilddrüsenzeldifferenzierung auch die Interaktion der Transkriptionsfaktoren Pax8, TTF-1 und TTF-2 (*Thyroid Transcription Factor-1* und *-2*) eine zentrale Rolle (Van Renterghem et al. 1996, Pasca di Magliano et al. 2000, Mascia et al. 2002, Di Palma et al. 2003). Diese Transkriptionsfaktoren werden in Zellen verschiedener Gewebe exprimiert. Die Kombination dieser drei Faktoren in der Schilddrüse ist jedoch einzigartig für den Organismus (Damante et al. 2001).

Zwei für die Hormonsynthese wichtige Proteine sind der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) und die Thyroperoxidase (TPO), deren Genexpression durch TSH über die cAMP-Kaskade gesteigert wird (Chazenbalk et al. 1987, Gérard et al. 1988 und 1989, Vassart und Dumont 1992, Kogai et al. 1997). Im Rahmen dieser Kaskade aktiviert cAMP die Proteinkinase A (PKA). Diese phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP responsive element binding protein*). Die Transkription des NIS unterliegt der Kontrolle des *NIS upstream enhancers* (NUE) im NIS-Promotor. Dieser enthält eine *CRE-like*-Sequenz (*cAMP responsive element*) und Bindungsstellen für TTF-1 und Pax8. Pax8 und CREB aktivieren dann gemeinsam die Transkription des NIS (Taki et al. 2002, Chun et al. 2004). Auch im TPO-Promotor wurden Bindungsstellen für TTF-1, TTF-2 und Pax8 nachgewiesen. Unklar ist hingegen, wie cAMP die Transkription der TPO aktiviert, da im TPO-Promotor keine CRE-Sequenzen identifiziert werden konnten (De la Vieja et al. 2000).

Die Schilddrüsenhormonsynthese findet in den Thyreozyten (Follikelepithelzellen) statt, die das Follikellumen mit dem darin enthaltenen Kolloid umschließen. Da Iod essenzieller Bestandteil der Schilddrüsenhormone ist, sind die Schilddrüsenfunktion an sich und die systemischen Wirkungen der Hormone von einer adäquaten Iodzufuhr abhängig (De la Vieja et al. 2000). Die Erforschung der Iodaufnahme in die Schilddrüsenzellen auf molekularer Ebene wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Nancy Carrasco mit der Isolierung der cDNA des NIS und dessen Charakterisierung (Dai et al. 1996) entscheidend vorangetrieben. Der NIS, der neben der Schilddrüse auch in Speicheldrüsen, Darmmukosa und der laktierenden Milchdrüse exprimiert wird, ist ein Transmembrantransportprotein in der basolateralen Membran der Thyreozyten. Er katalysiert sekundär-aktiv die Aufnahme von Iodid und Natriumionen in die Follikelepithelzellen und ermöglicht so den ersten Schritt in der Biosynthese der Hormone T₃ und T₄. Über die Na⁺/K⁺-ATPase wird der dazu erforderliche

Na⁺-Konzentrationsgradient aufgebaut (*Carrasco 1993, Eskandari et al. 1997, Levy et al. 1998, De la Vieja et al. 2000, Tazebay et al. 2000, Spitzweg et al. 2002, Dohan et al. 2003*). Die TPO ist ein glycosiliertes Membranprotein in der apikalen Membran der Thyreozyten (*Pachucki et al. 2004, Ris-Stalpers und Bikker 2010*) und gehört, wie auch das Thyroglobulin, zu den schilddrüsenpezifischen Proteinen, deren Gene nur in der Schilddrüse exprimiert werden (*Brown et al. 2000*). Die TPO katalysiert die Oxidation von Iodid mit Hilfe von H₂O₂ (Wasserstoffperoxid), die Bindung des oxidierten Iodids an die Tyrosinreste des Thyroglobulins und die Verbindung der iodinierten Tyrosine (Mono- und Diiodtyrosin) zu den Hormonen T₃ und T₄ (*Taurog 1970, Nunez und Pommier 1982*). Die Iodiniierung der Tyrosinreste des Thyroglobulins erfolgt im Follikellumen an der apikalen Membran der Thyreozyten. Zur Freisetzung der wirksamen Hormone müssen sie aus dem Kolloid durch Pinocytose wieder in die Schilddrüsenepithelzelle aufgenommen werden. Durch lysosomalen Abbau werden schließlich die Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ freigesetzt und können in die Blutbahn abgegeben werden (*Rehner und Daniel 2002*). Über die Bindung an Schilddrüsenhormonrezeptoren (TRs) wird die Wirkung von T₃ auf den Stoffwechsel vermittelt. TRs gehören aufgrund von Sequenzhomologien zur Familie der nukleären Rezeptoren, denen auch die Steroid-, Retinsäure- und Vitamin D-Rezeptoren zugeordnet werden können (*Evans 2005*). Die drei bisher beschriebenen Formen des TR wirken als Transkriptionsfaktoren. TRα1 und TRβ1 werden in den Zielgeweben der Schilddrüsenhormone exprimiert. Studien zum TRβ2 zeigten, dass diese Form bisher nur in Hypothalamus und Adenohypophyse beschrieben werden konnte (*Hodin et al. 1990, Cook et al. 1992, Ribeiro 2008*). TRs werden durch T₃ aktiviert, heterodimerisieren mit RXRs (*retinoid X receptor*) und binden schließlich an TREs (*TR responsive elements*) im Promoterbereich der jeweiligen Zielgene (*Oetting und Yen 2007*).

1.2 SREBPs und ihre mögliche Rolle bei der Expression schilddrüsenassoziierter Proteine

Die Fett- und Cholesterollhomöostase wird in Säugerzellen von einer Familie membrangebundener Transkriptionsfaktoren reguliert, die als *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) bezeichnet werden. Sie aktivieren direkt die Expression von über 30 Genen für Synthese und Aufnahme von Cholesterol, Fettsäuren, Triglyceriden und Phospholipiden (*Horton et al. 2002*). Die in dieser Arbeit näher betrachteten Isoformen SREBP-1c und SREBP-2 sind zwei der drei Isoformen, die in Säugerzellen exprimiert werden. Die Gene für die Isoformen sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert: das Gen für SREBP-1 liegt auf dem menschlichen Chromosom 17, das Gen für SREBP-2 dagegen auf Chromosom 22 (*Brown und Goldstein 1997*). Durch verschiedene

Transkriptionsstartpunkte im Promotor des SREBP-1-Gens, die für verschiedene erste Exons kodieren, können die Isoformen SREBP-1a und SREBP-1c transkribiert werden (*Hua et al. 1995, Shimomura et al. 1997 a, Brown und Goldstein 2009*). SREBP-1a ist ein Aktivator aller SREBP-responsiven Gene. Die Wirkungen der anderen zwei Isoformen, welche die Hauptformen in der Leber und anderen Geweben darstellen (*Shimomura et al. 1997 b*), sind spezifischer. So aktiviert das SREBP-1c alle Gene, die für die Enzyme der Fettsäuresynthese codieren (lipogene Enzyme), z.B. die Fettsäuresynthase (FAS). Das SREBP-2 aktiviert dagegen Gene für die Cholesterolsynthese und die Cholesterolaufnahme, z.B. die HMG-CoA-Reduktase (HMGCoAR) und den LDL-Rezeptor (*Sheng et al. 1995, Horton et al. 1998, Stoeckmann et al. 2002*).

SREBPs gehören zur Familie der *basic helix-loop-helix-leucine zipper*-Transkriptionsfaktoren (bHLH-Zip). Im Unterschied zu anderen bHLH-Zip-Proteinen werden sie aber als inaktive Vorstufen (Precursor) gebildet, die als integrale Membranproteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebunden vorliegen. Jeder SREBP-Precursor ist aus drei Domänen aufgebaut: (a) eine NH₂-terminale Domäne, welche die bHLH-Zip Region zum Binden an die DNA enthält; (b) zwei transmembranäre Segmente; (c) eine COOH-terminale Domäne. Der COOH-terminale Bereich bildet dabei Komplexe mit dem *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP) aus, das als Sterolsensor dieses Systems fungiert (*Brown und Goldstein 1997, Goldstein et al. 2002, Horton et al. 2002*). Um die als Transkriptionsfaktor agierende NH₂-terminale Domäne freizusetzen, bedarf es einer Aktivierung der SREBP-Vorstufen, an der das SCAP maßgeblich beteiligt ist (*Matsuda et al. 2001*). Bei einer geringen intrazellulären Sterolkonzentration bildet das SCAP mit der COOH-terminalen Domäne des SREBP-Precursors einen Komplex und wird in COP II -Vesikel verpackt zum Golgi-Apparat transportiert. Dort wird durch zwei proteolytische Spaltungen durch die *Site-1-Protease* (S1P), eine membrangebundene Serinprotease und die *Site-2-Protease* (S2P), eine membrangebundene Zinkmetalloproteinase, die NH₂-terminale bHLH-Zip Domäne freigesetzt. Diese Domäne, auch als nukleäres SREBP (nSREBP) oder aktives SREBP bezeichnet, gelangt schließlich in den Zellkern, wo sie an *sterol responsive elements* (SREs) in den Promotorregionen von Zielgenen bindet und so deren Transkription induziert (*Sakai et al. 1996, Horton et al. 2002, Rawson 2003*). Steigt dagegen die Sterolkonzentration in der Zelle an, z.B. durch Cholesterol oder Oxysterole, unterbleibt der Transport des SCAP-Precursor-Komplexes, durch eine Bindung des SCAP an Insigs (*Insulin-induced genes*), welche in der ER-Membran lokalisiert sind (*DeBose-Boyd et al. 1999, Nohturfft et al. 1999, Espenshade et al. 2002, Yabe et al. 2002, Yang et al. 2002, Sun et al. 2005*).

Wie bereits in Punkt 1.1 erwähnt wurde, ist ein Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormonen und dem Fett- und Cholesterolfstoffwechsel bekannt. Besonders die

Auswirkungen einer Hypo- und Hyperthyreose wurden durch viele Studien erforscht. *Ness et al. (1990)* konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Hypothyreose zu einer Hypercholesterinämie führt, da die mRNA- und Proteinkonzentration des LDL-Rezeptors gesenkt wurde. Durch die Gabe von Thyroxin konnte diese Hypercholesterinämie aber behandelt werden (*Illingworth et al. 1981*). Diesem Effekt liegt die Beobachtung zu Grunde, dass die Konzentration von SREBP-2-mRNA und die Konzentration des reifen SREBP-2 durch Substitution von Schilddrüsenhormonen ansteigen. Vermittelt wird dies durch eine direkte Aktivierung des SREBP-2-Promotors durch den TR, welcher an ein TRE im 5'-flankierenden Bereich des Gens bindet (*Shin und Osborne, 2003*). In welcher Weise die Schilddrüsenhormone auf die Expression des SREBP-1c Einfluss nehmen, wurde bis heute kontrovers diskutiert. So konnten *Zhang et al. (2003)* eine Konzentrationserhöhung des reifen SREBP-1c in Hepatozyten durch T₃ aufzeigen. Dagegen wurde von *Hashimoto et al. (2006)* eine Herabregulation des SREBP-1c-Promotors und der SREBP-1c-mRNA-Konzentration durch T₃ und den TR festgestellt.

Ob aber auch umgekehrt die SREBPs Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese nehmen können, war bis heute noch nicht Gegenstand der Forschung. Voraussetzung dafür ist die Beantwortung der Frage, ob die Gene der SREBPs in den Schilddrüsenzellen exprimiert werden. Dieser Nachweis konnte bereits durch Vorversuche am Institut erbracht werden. Als Stimulus dieser Genexpression wurde das TSH vermutet, das seine Wirkung über cAMP vermittelt. Es stellt den primären Wachstumsfaktor in der Schilddrüse dar. Gestützt wird diese These durch Studien in denen gezeigt wurde, dass Wachstumsfaktoren wie der *platelet-derived growth factor* (PDGF), der *epidermal growth factor* (EGF) und der *insulin-like growth factor* (IGF), eine Akkumulierung von SREBPs in Zellkernen verschiedener Zellen induzieren (*Swinnen et al. 2000, Demoulin et al. 2004*). Darüber hinaus zeigten *Grieco et al. (1990)*, dass TSH einen stimulierenden Effekt auf die Genexpression sowie die Aktivität der HMGCoAR in Schilddrüsenepithelzellen hat, die ja bekanntermaßen ein Zielgen des SREBP-2 ist (*Horton et al. 2002*). Sie vermuteten ebenfalls, dass die Wirkung des TSH durch cAMP vermittelt wird, konnten den Wirkmechanismus aber noch nicht aufklären. Daher wurden im Vorfeld der Arbeit Promotoranalysen des SREBP-1c und SREBP-2 der Ratte mit der „MatInspector software“ (Genomatix) durchgeführt. Dabei wurden für das SREBP-1c an Position -1600, -1644 und -2047 und für das SREBP-2 an Position -159, -301 und -491 oberhalb des Transkriptionsstartpunktes putative CREs identifiziert (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Eder). Daher könnte es möglich sein, dass die Transkription der SREBP-Gene durch die Bindung eines CREB an CREs in den Promotoren der SREBPs induziert wird. Nachdem dann durch *Parmar und Kar (2007)* im Anschluss an die Verfütterung einer hypercholesterinämischen Diät verminderte Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum beobachtet wurden, zog unsere

Arbeitsgruppe einen Link zu den SREBPs in Betracht, da diese durch in Abhängigkeit zur Cholesterolkonzentration reguliert werden.

1.3 Die Rolle des PPAR α in der Genexpression der SREBPs in der Schilddrüse

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) stellen eine durch Liganden aktivierbare Transkriptionsfaktorfamilie dar, die zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren zählt (Dreyer et al. 1993, Desvergne und Wahli 1999). Bisher wurden drei verschiedene Isoformen charakterisiert: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ (Schoonjans et al. 1997). Sie werden in verschiedenen Geweben exprimiert und haben unterschiedliche Funktionen. Nach Heterodimerisierung mit dem RXR wirken sie als Transkriptionsaktivatoren durch Bindung an PPREs (*peroxisome proliferator response elements*) (Issemann et al. 1993). Diese PPREs sind vor allem in den regulatorischen Regionen von Genen, die für Proteine des Fett- und Energiestoffwechsels codieren zu finden. Der PPAR α wird besonders stark in Geweben mit erhöhter β -Oxidation von Fettsäuren, z.B. in der Leber, exprimiert und dient somit der Energiebereitstellung (Mandard et al. 2004, Yessoufou und Wahli 2010). Diese Wirkung wird z.B. im Fastenzustand beobachtet, wobei der PPAR α durch freie Fettsäuren aktiviert wird. Weitere Liganden des PPAR α sind oxidierte Fette sowie Fibrate wie Clofibrat, Fenofibrat und das Fibrat-Analogen WY 14,643, die als hypolipidämische Medikamente zum Einsatz kommen (Staels et al. 1998, Michalik et al. 2006).

In einigen Studien konnte durch die Verfütterung oxidiertes Fett eine Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion mit daraus resultierenden erhöhten Plasmakonzentrationen an freiem und totalem Thyroxin beobachtet werden (Eder et al. 2000, Eder et al. 2002, Skufca et al. 2003). Die zu Grunde liegenden Mechanismen konnten bislang noch nicht vollständig erklärt werden. Vermutet wurden bisher ein direkter Einfluss der Lipidperoxidationsprodukte der Diät auf die Genexpression von NIS und TPO (Skufca et al. 2003) oder ein gestörter Freisetzungsmechanismus der Schilddrüsenhormone (Eder et al. 2002). Sollte es sich bei NIS und TPO jedoch um Zielgene der SREBPs handeln, könnten die beobachteten Effekte auch auf eine Aktivierung der SREBPs durch den PPAR α zurückzuführen sein. Verschiedene Studien konnten bereits eine Beeinflussung der SREBP-Genexpression durch den PPAR α in verschiedenen Untersuchungsmodellen aufzeigen, wenngleich die daraus abgeleiteten Daten sehr heterogen waren (Hashimoto et al. 1995, Guo et al. 2001, Koch et al. 2007). In der Schilddrüse wurden derlei Untersuchungen bisher noch nicht durchgeführt. In einer Studie sollte nun festgestellt werden, ob eine Aktivierung des PPAR α in der Schilddrüse tatsächlich eine Transkriptionsaktivierung der SREBPs bewirkt.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Zusammenfassend bestand die Zielsetzung der hier vorgestellten Arbeit darin, die sich sowohl aus eigenen Vorarbeiten als auch aus Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen ableitenden Fragestellungen zu überprüfen.

- (1) Studien von *Grieco et al. (1990)* und *Bifulco et al. (1990 und 1995)* lieferten mit Genexpressionsanalysen von HMG-CoA-Reductase und LDL-Rezeptor erste Hinweise auf die Existenz von SREBPs in Schilddrüsenzellen. Durch Stimulationsversuche mit TSH und 8-Br-cAMP konnten z.B. gesteigerte Enzymaktivitäten der HMG-CoA-Reductase ermittelt werden. Darüber hinaus konnten putative CREs in den Promotoren der SREBP-Gene im Vorfeld dieser Arbeit identifiziert werden.

Daher sollte im ersten Teil dieser Arbeit **Hypothese 1** nachgegangen werden, die besagt, dass TSH die Genexpression der SREBPs und die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren steigert, wobei dieser Effekt vermutlich über die Aktivierung der cAMP-Kaskade vermittelt wird.

- (2) Ob die SREBPs in Schilddrüsenzellen neben ihren bekannten Wirkungen auf den Fett- und Cholesterolfstoffwechsel in Schilddrüsenzellen noch weitere Funktionen ausüben, sollte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden. *Parmar und Kar (2007)* konnten durch die Verabreichung einer cholesterolreichen Diät (CCT-Diät) an Ratten bereits eine Senkung der Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum beobachten.

Dies veranlasste uns die **Hypothese 2** zu formulieren, nach der NIS und TPO mögliche Zielgene der SREBPs sind, da eine gesteigerte oder verminderte Aktivierung der SREBPs zu Veränderungen auf Transkript- und Proteinebene von NIS und TPO führen könnten.

Um die ersten beiden Hypothesen zu bestätigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro*-Versuche mit FRTL-5-Zellen, einer Zelllinie der Ratte, die auf TSH als Wachstumsstimulus angewiesen ist und auch sonst den normalen Stoffwechsel einer Schilddrüsenzelle mit der Fähigkeit zur Hormonsynthese zeigt (*Ambesi-Impiombato 1980, Kimura et al. 2001*) sowie Primärkulturen von Schweinethyreozyten durchgeführt. Dabei wurden sowohl Analysen auf Transkriptebeine mittels RTD-PCR (*realtime-detection-PCR*) als auch auf Proteinebene (Western Blot) durchgeführt. Die Zellen wurden mit TSH und Forskolin behandelt, wobei beide Substanzen zu einem cAMP-Anstieg in den Zellen führen. Um die Beeinflussung der mRNA-Konzentration und Proteinsynthese von NIS und TPO durch SREBPs aufzuzeigen, wurden die Zellen zusätzlich mit Cholesterolf und 25-Hydroxycholesterolf (25-HC) behandelt.

Damit wurde die Ausreifung der SREBPs unterdrückt, was zu einer verminderten relativen mRNA- und Proteinkonzentration von NIS und TPO führen sollte.

- (3) Auf den Ergebnissen der ersten beiden Teile der Arbeit aufbauend, sollten im dritten Teil Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie sich eine Aktivierung des PPAR α auf die Genexpression der SREBPs und darüber hinaus auch auf NIS und TPO auswirken könnte. *Knight et al. (2005)* stellten bereits gesteigerte relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1-Zielgenen in der Leber im Anschluss an eine WY-Inkubation fest und führten dies auf eine gesteigerte Aktivierung des SREBP-1 zurück. Weiterhin konnte in einer Studie von *Luci et al. (2006)* an Schweinen beobachtet werden, dass durch eine Verfütterung von Clofibrat u.a. die relativen mRNA-Konzentrationen von NIS und TPO in der Schilddrüse gesteigert wurden.

Dies veranlasste uns in **Hypothese 3** zu postulieren, dass eine Aktivierung des PPAR α in der Schilddrüse mit einer Aktivierung der SREBPs einhergeht und zu gesteigerten Expressionen von NIS und TPO auf mRNA- und Proteinebene führt.

Zur Bestätigung der dritten Hypothese wurden FRTL-5-Zellen mit dem synthetischen PPAR α -Agonisten WY 14,643 behandelt. Die anschließenden Analysen der relativen mRNA- und Proteinkonzentrationen sollten dann erstmalig erhöhte Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP-2, NIS und TPO in Schilddrüsenzellen aufzeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien (alphabetische Reihenfolge)

Chemikalie	Hersteller, Land
25-Hydroxycholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
5-fach Puffer (cDNA-Synthese)	Fermentas GmbH, Deutschland
5x Green GoTaq® Flexi Buffer	Promega GmbH, Deutschland
ALLN, Calpain Inhibitor I	Enzo Life Sciences GmbH, Deutschland
Antibiotikum-Antimykotikum-Mix	GIBCO, Invitrogen GmbH, Deutschland
APS	Carl Roth GmbH, Deutschland
Bicinchoninsäure Assay Reagent A/ BC Assay Protein Quantitation Kit	Uptima Interchim, Frankreich
Broad Range Protein Molecular Weight Markers	Promega GmbH, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH, Deutschland
Cholesterol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Collagenase, CLS II	Biochrom AG, Deutschland
DEPC	Carl Roth GmbH, Deutschland
DMEM (1g/l Glucose)	GIBCO, Invitrogen GmbH, Deutschland
DMSO Hybri-Max	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
dNTPs	GeneCraft, Deutschland
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, USA
Gentamicin	GIBCO, Invitrogen GmbH, Deutschland
Glutamax	GIBCO, Invitrogen GmbH, Deutschland
Glycin, analytical grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ham's F12 Medium	Biochrom AG, Deutschland
HBSS	Biochrom AG, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix for Bio-Rad iCycler™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
LDS	Carl Roth GmbH, Deutschland

Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Deutschland
Methanol	VWR, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH, Deutschland
NCS	Biochrom AG, Deutschland
Nuclear Extract Kit	Active Motif Europe, Belgien
Oligo-dT-18 Primer	Eurofins MWG Operon, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, Deutschland
peqGOLD Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Deutschland
RevertAid™ Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Fermentas GmbH, Deutschland
Roti-Load®, Proteinauftragspuffer, reduzierend	Carl Roth GmbH, Deutschland
Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH, Deutschland
Somatostatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
TC-H ₂ O (Ultra Pure Water)	Biochrom AG, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tris, research grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
TRIzol® Reagent	Invitrogen GmbH, Deutschland
Trypsin/EDTA	GIBCO, Invitrogen GmbH, Deutschland
TSH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tween® 20 pure	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
WY 14,643	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel (alphabetische Reihenfolge)

Geräte, Hilfsmittel	Hersteller, Land
BIO RAD Mini Trans-Blot® Cell, Tank-Blot-System	Bio-Rad Laboratories, USA
Bio Trace™ NT, Pure Nitrocellulose Blotting Membran Blotpapier	Pall Corporation, USA
CELLSTAR® Gewebekulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Bio-Rad Laboratories, USA
CELLSTAR® Gewebekulturplatten 6-, 24-, 96-Wellformat	greiner bio-one GmbH, Deutschland
CELLSTAR® Tubes 15 ml, 50 ml	greiner bio-one GmbH, Deutschland
CO ₂ -Inkubator APT.line™ CB 150	BINDER GmbH, Deutschland
Fiber Pads (BIO RAD, Mini Trans-Blot®)	Bio-Rad Laboratories, USA
G:BOX (Lumineszenzimager)	SYNGENE, Großbritannien
GeneFlash (UV-Licht-Imager)	SYNGENE, Großbritannien

Heidolph Duomax 1030 (Schwenker)	Heidolph Instruments, Deutschland
HERAEUS Fresco 21 Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Deutschland
HERAEUS HERA Safe (Zellkulturbank)	Thermo Electron LED GmbH, Deutschland
HERAEUS SEPATECH Megafuge 1.0	Thermo SCIENTIFIC
Hofer SE 250 Mighty Small II	Amersham Biosciences (SF) Corp., USA
KS-15 (Rotationsschwenker)	Edmund Bühler GmbH, Deutschland
NanoQuant plate ^{1M}	TECAN Austria GmbH, Österreich
Plattenreader TECAN infinite M200	TECAN Austria GmbH, Österreich
Primo Vert (Mikroskop)	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Deutschland
Reagiergefäße, 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co., Deutschland
Rotorgene Q (RTD-PCR)	Qiagen
Thermocycler TProfessional BASIC	Biometra GmbH, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Deutschland
TS1 ThermoShaker	Biometra GmbH, Deutschland

2.1.3 Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Hormone und Zusätze für die Zellkultivierung- und stimulation

Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat:	0,5 mg lösen mit 5 ml TC-H ₂ O → Stocklösung 100 µg/ml	} Hormonkonzentration im 4-Hormoncocktail: - 1000 ng/ml Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat - 1000 pmol/ml Hydrocortison - 1000 ng/ml Somatostatin - 500 µg/ml Transferrin
Hydrocortison:	Stocklösung mit c = 4,845 mg/ml (1000 µmol/ml) herstellen (lösen in absolutem Ethanol)	
Somatostatin:	0,5 mg lösen mit 5 ml TC-H ₂ O → Stocklösung 100 µg/ml	
Transferrin:	Stocklösung mit 50 mg/ml herstellen (lösen in TC-H ₂ O)	
Insulin:	10 mg Insulin mit Mischung aus 10 ml TC-H ₂ O und 100 µl Eisessig lösen → Stocklösung 10 mg/ml	
TSH:	10 U TSH mit Mischung aus 100 µl TC-H ₂ O und 900 µl HBSS lösen → Stocklösung 10 U/ml	
Forskolin:	Stocklösung mit 10 µmol/ml herstellen (Forskolin in DMSO lösen)	

ALLN:	5 mg ALLN mit 200 µl DMSO lösen → Stocklösung 25 mg/ml
25-OH-Cholesterol:	zunächst 20 mM Stocklösung herstellen (25-Hydroxycholesterol in absolutem Ethanol lösen) → daraus 1 mM- und 5 mM-Stocklösungen herstellen
Cholesterol:	zunächst 20 mM Stocklösung herstellen (Cholesterol in absolutem Ethanol lösen) → daraus 1 mM- und 5 mM-Stocklösungen herstellen
WY 14,643:	100 mM Stocklösung herstellen (WY in DMSO lösen)

2.1.3.2 Medien für die Zellkultur

Medien für FRTL-5-Zellen:

Medium A:	Ham's F12 Medium mit 5% NCS (<i>Newborn Calf Serum</i>), 1:100 Antibiotikum-Antimykotikum-Mix, 10 nM Hydrocortison, 5 µg/ml Transferrin, 10 ng/ml Somatostatin und 10 ng/ml Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat, 10 µg/ml Insulin (= 5H-Medium)
Medium B:	Medium A supplementiert mit 10 mU/ml TSH (= 6H-Medium)
Medium C:	Medium A supplementiert mit 0,1% DMSO
Medium D:	Medium A supplementiert mit 10 nmol/ml Forskolin

Medien für primäre Schweinethyreozyten:

Verdauerpuffer:	HBSS versetzt mit 0,2% Collagenase Typ II und 5 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O
Waschmedium:	DMEM mit 1% Glutamax und 0,5% Gentamicin
Kulturmedium:	DMEM mit 10% FCS, 1% Glutamax und 0,5% Gentamicin

2.1.3.3 Puffer für SDS-PAGE und Western Blot

Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris pH 6,8
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris pH 8,8
APS:	0,1 g einwiegen und mit 900 µl Reinstwasser lösen
SDS (10%-ig):	1 g SDS einwiegen und mit 10 ml Reinstwasser lösen
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 3,5 mM SDS pH 8,3 kontrollieren

Transferpuffer (nach Laemmli 1970):	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol
Transferpuffer (nach Kaminski et al. 1994):	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol, 0,05% LDS pH 8,3 kontrollieren
Ponceau S	0,25 g Ponceau S, 500 µl Essigsäure, 46,5 ml Reinstwasser
1x TBST:	50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,2% Tween 20 pH 7,5

2.1.3.4 Puffer für Gelelektrophorese von RNA und DNA

DEPC-Wasser:	0,1% DEPC in Reinstwasser lösen, 24 h im Wasserbad bei 37°C inkubieren, autoklavieren
10x FA-Gelpuffer:	200 mM Mops, 50 mM Na-Acetat x 3H ₂ O, 0,5 M EDTA pH 7
1x FA-Gel-Laufpuffer:	50 ml 10x FA-Gelpuffer, 10 ml 37% Formaldehyd, 440 ml DEPC-Wasser
50x TAE-Puffer:	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) auffüllen auf 1 Liter (Reinstwasser) pH 7,8
1x TAE-Puffer:	40 ml 5x TAE-Puffer, 1960 ml Reinstwasser

2.2 Arbeiten mit FRTL-5-Zellen

2.2.1 Zellkultivierung

Die adhären wachsenden FRTL-5-Zellen, bezogen von CLS Cell Lines Service (Passage 21), wurden in 75 cm²-Gewebekulturflächen im CO₂-Inkubator APT.line™ CB 150 bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Zusammensetzung des Mediums für diese Zelllinie richtete sich nach den Angaben der ATCC (*American Type Culture Collection*). Das für die Kultivierung genutzte Medium B wurde vor jedem Passagieren und Mediumwechsel frisch aus folgenden Zusätzen und Hormonen hergestellt: Ham's F12 Medium mit 5% NCS (*Newborn Calf Serum*), 1:100 Antibiotikum-Antimykotikum-Mix, 10 mU/ml TSH, 10 µg/ml Insulin, 10 nM Hydrocortison, 5 µg/ml Transferrin, 10 ng/ml Somatostatin und 10 ng/ml Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat. Dabei wurden Hydrocortison, Transferrin, Somatostatin und Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin-Acetat als 4-Hormoncocktail 1:100 verdünnt dem Medium zugesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sterilwerkbank HERAEUS HERA Safe durchgeführt.

2.2.2 Passagieren und Aussäen

Die Zellen wurden einmal pro Woche nach den Empfehlungen der ATCC passagiert. Das verbrauchte Medium wurde entfernt, die Zellen mit HBSS gewaschen und im Anschluss für eine Minute mit Trypsin/EDTA 0,05% im Inkubator inkubiert. Anschließend wurde pures Ham's F12 Medium zugegeben, die Zellen resuspendiert und bei 900 rpm (HERAEUS SEPATECH Megafuge 1.0) für 5 min bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit vollständig supplementierten Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Die Gesamtzellzahl wurde mit der folgenden Gleichung ermittelt:

$$C_z = X * 10^4 * V$$

C_z : Zellzahl

X: Zellzahl in 0,1 μ l

V: Verdünnungsfaktor

Im Anschluss wurde die gewünschte Zellzahl von $0,1 * 10^6$ Zellen pro Well in 24-Wellplatten und $0,2 * 10^6$ Zellen pro Well in 6-Wellplatten sowie $1,2 * 10^6$ Zellen in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen in den 24-Wellplatten wurden für die Analyse der Genexpression mittels RTD-PCR und die Zellen der 6-Wellplatten für die Proteinanalyse durch Western Blot herangezogen.

2.2.3 Inkubationsversuch mit TSH und Forskolin

2.2.3.1 Inkubation über 24 Stunden

Bei diesem Inkubationsversuch wurden die FRTL-5-Zellen wie in Punkt 2.2.2 ausgesät. Vor der Behandlung wurden die Zellen 24 h mit einem Hungermedium, entsprechend dem Medium A (5H-Medium), behandelt. Am Folgetag erfolgte die Behandlung ohne und mit 10 mU/ml TSH bzw. 10 nmol/ml Forskolin (Medien A bis D) für 24 h. Die TSH- und Forskolinstocklösungen mit Konzentrationen von 10 U/ml und 10 μ mol/ml wurden dabei 1:1000 mit Medium verdünnt eingesetzt. Da Forskolin in DMSO gelöst vorlag, wurde ein Teil

der Kavitäten DMSO als Kontrolle behandelt. DMSO wurde ebenfalls 1:1000 mit Medium verdünnt und in einer Konzentration von 0,1% eingesetzt.

2.2.3.2 Inkubation im Zeitverlauf

Um zu überprüfen, wie sich die erwarteten Effekte nach verschiedenen Inkubationszeiten verhalten, wurden die FRTL-5-Zellen im Anschluss an die 24 stündige Hungerphase mit den Medien A bis D über verschiedene Zeiträume (6, 12, 24, 36 und 48 h) inkubiert. Die Effekte wurden mittels RTD-PCR analysiert.

2.2.4 Inkubationsversuch mit 25-Hydroxycholesterol und Cholesterol unter Einfluss von TSH und Forskolin

2.2.4.1 Inkubation über 24 Stunden

Bei diesem Inkubationsversuch wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70-80% mit den Behandlungsmedien A bis D versetzt, nachdem Sie zuvor mit HBSS gewaschen wurden. Die Zusammensetzung der Behandlungsmedien ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Für die Analyse der Genexpression wurde mit zwei Konzentrationen der verwendeten Sterole, jeweils 1 μM und 5 μM 25-Hydroxycholesterol (25-HC) und Cholesterol, gearbeitet, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit des erwarteten Effektes aufzeigen zu können. Die Stocklösungen der Sterole mit Konzentrationen von 1 mM und 5 mM wurden 1:1000 mit Medium verdünnt eingesetzt. Da die Sterole in absolutem Ethanol (99,9%) gelöst wurden, wurde bei der Kontrollgruppe Ethanol 1:1000 mit Medium verdünnt und einer Konzentration von 0,1% eingesetzt.

Für die Proteinanalyse wurden die Zellen nur mit 5 μM 25-HC und 5 μM Cholesterol behandelt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Behandlungsmedien für die Inkubation mit 25-HC und Cholesterol

	Inkubationszusätze
Medium A (ohne TSH)	a) mit 0,1% Ethanol (Kontrolle) b) mit 1 μ M und 5 μ M 25-HC c) mit 1 μ M und 5 μ M Cholesterol
Medium B (mit 10 mU/ml TSH)	a) mit 0,1% Ethanol (Kontrolle) b) mit 1 μ M und 5 μ M 25-HC c) mit 1 μ M und 5 μ M Cholesterol
Medium C (ohne Forskolin)	a) mit 0,1% Ethanol (Kontrolle) b) mit 1 μ M und 5 μ M 25-HC c) mit 1 μ M und 5 μ M Cholesterol
Medium D (mit 10 nmol/ml Forskolin)	a) mit 0,1% Ethanol (Kontrolle) b) mit 1 μ M und 5 μ M 25-HC c) mit 1 μ M und 5 μ M Cholesterol

2.2.4.2 Inkubation im Zeitverlauf

Analog dazu wurden die FRTL-5-Zellen über 6, 12 und 24 h mit den Medien A bis D inkubiert und mit 0,1% Ethanol (Kontrolle) und 5 μ M 25-HC bzw. 5 μ M Cholesterol behandelt. Anschließend wurden die Effekte auf mRNA-Ebene mittels RTD-PCR analysiert.

2.2.5 Inkubationsversuch mit WY 14,643

Die Aussaat der FRTL-5-Zellen erfolgte in 6-Wellplatten mit $0,2 \cdot 10^6$ Zellen pro Well. Wenn eine Konfluenz von ca. 70% erreicht war wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit den Behandlungsmedien für 24 h inkubiert. Für die Behandlung wurden die Medien A und B mit 100 μ M WY 14,643 bzw. 0,1% DMSO (Kontrolle) supplementiert, da WY 14,643 in DMSO gelöst wurde. Daraus ergaben sich vier Behandlungsgruppen: Kontrolle ohne TSH, WY ohne TSH, Kontrolle mit TSH und WY mit TSH.

2.3 Arbeiten mit Schweinethyreozyten in Primärkultur

2.3.1 Isolierung und Kultivierung von primären Schweinethyreozyten

Die Isolierung der Thyreozyten erfolgte nach einem Protokoll von *Pocar et al. (2006)*. Die vom Schlachthof Gießen bezogenen Schilddrüsen wurden in eiskaltem HBSS-Puffer transportiert und am Institut weiter bearbeitet. Die Schilddrüsen wurden von anhaftendem

Bindegewebe befreit und zu Stücken von ca. 2 mm Kantenlänge zerkleinert. Diese wurden mehrmals mit HBSS gewaschen und mittels Zentrifugation bei 100 g (HERAEUS SEPATECH Megafuge 1.0) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in auf 37°C vorgewärmten Verdaupuffer für 30 min auf einem beheizbaren Magnetprüher inkubiert. Nach mehrmaligem pipettieren und der Filtration durch eine Nylonmembran wurde die Zellsuspension zentrifugiert (100g, 1 min) und sechs Mal mit Waschmedium gewaschen. Nachdem das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert wurde, wurden die Zellen in 6-Wellplatten und 25 cm²-Zellkulturflächen verteilt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 2-3 Tagen war eine Konfluenz von 80% erreicht und die Zellen konnten mit den vorgesehenen Substanzen behandelt werden.

2.3.2 Inkubationsversuch mit 25-Hydroxycholesterol unter Einfluss von TSH und Forskolin

Wie bereits die FRTL-5-Zellen wurden auch die Schweinethyreozyten mit 25-HC behandelt. Dem Kulturmedium ohne und mit 10 mU/ml TSH bzw. 10 nmol/ml Forskolin wurde dabei 5 µM 25-HC zugesetzt und die Zellen für 24 h inkubiert. Dem Medium der Kontrollgruppe wurde Ethanol in einer Konzentration von 0,1% zugesetzt.

2.4 Proteingewinnung mit dem Nuclear Extract Kit

Im Anschluss an die verschiedenen Inkubationen wurden die Zellen unter Verwendung des Nuclear Extract Kits aufgeschlossen und die cytosolische und nukleäre Proteinfraction (CF und NF) gewonnen. Dabei wurde nach den Empfehlungen des Herstellers gearbeitet. Die Volumina der eingesetzten Puffer, in denen die cytosolische und nukleäre Fraktion gelöst wurden, wurden an die verwendete Zelllinie angepasst. So konnten Lysate gewonnen werden, die eine ausreichend hohe Proteinkonzentration enthielten, um sie im Anschluss für die SDS-PAGE zu verwenden.

Im Falle der FRTL-5-Zellen wurden die Zellen von je zwei Wells einer 6-Wellplatte gepoolt. Zur Gewinnung der cytosolischen Fraktion wurde das Zellpellet mit jeweils 100 µl *Hypotonic Buffer* (HB) resuspendiert, zentrifugiert (14.000 g, HERAEUS Fresco 21 Centrifuge) und der Überstand als cytosolische Fraktion abgenommen. Das verbleibende Pellet wurde mit jeweils 20 µl *Complete Lysis Buffer* (LB) resuspendiert, zentrifugiert (14.000 g, HERAEUS Fresco 21 Centrifuge) und der Überstand als nukleäre Fraktion abgenommen.

Um einer gesteigerten Degradation der SREBPs vorzubeugen, erhielten die Zellen in Anlehnung an Studien von Brown und Goldstein (*Hua et al. 1996*) 3 h vor Zellaufschluss 25

$\mu\text{g/ml}$ ALLN (N-acetyl-Leu-Leu-Norleucinal), einen Calpain Inhibitor, welcher den weiteren Abbau der SREBPs hemmt.

2.5 Proteinbestimmung mit dem BC Assay Protein Quantitation Kit

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der gewonnenen Lysate wurde mit dem Bicinchoninsäure *Assay Reagent A* (BCA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode beruht auf einer Farbkomplexbildung zwischen BCA und einer 4%-igen Kupfer-(II)-Sulfatlösung. Der nach der Reduktion der Kupferionen von Cu^{2+} zu Cu^+ gebildete Farbkomplex hat sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm (Nanometer).

Um die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben bestimmen zu können, wurden BSA-Standards (Rinderserumalbumin) unterschiedlicher Konzentrationen (0, 25, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 $\mu\text{g/ml}$) mitgeführt.

In einer Doppelbestimmung wurden jeweils 25 μl der Standards und die Lysate, 1:25 mit Reinstwasser verdünnt, in die Kavitäten einer 96-Wellplatte pipettiert, mit je 200 μl der Reaktionslösung (BCA: CuSO_4 = 50:1, V:V) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Mittels eines Absorptionsscans im Wellenlängenbereich von 540 nm bis 595 nm wurde die Absorption am Plattenreader TECAN infinite M200 gemessen und mit Hilfe einer erstellten Standardgerade die Proteinkonzentration der Zelllysate in $\mu\text{g/ml}$ berechnet.

2.6 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die SDS-PAGE dient der analytischen Auftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld. Die dafür genutzten Gelsysteme bestehen aus polymerisiertem und quervernetztem Acrylamid. Während der Elektrophorese, unter Verwendung der Gelelektrophoresekammer Hoefer SE 250 Mighty Small II, wandern die Proteingemische durch Poren im Gel, deren Größe von der Konzentration an monomeren Acrylamid und N, N'-Methylen-Bis-Acrylamid bestimmt wird. Bei den durchgeführten Versuchen wurden 7,5%-ige bzw. 9%-ige Trenngele verwendet, je nach Größe des nachzuweisenden Proteins. Die bei dieser diskontinuierlichen Gelelektrophorese verwendeten Sammel- und Trenngele setzen sich aus verschiedenen Komponenten (Reinstwasser, 40%-igem Acrylamid, Sammel- bzw. Trenngelpuffer, 10%-igem SDS, APS und TEMED) zusammen. Nach Anfertigung der Trenn- und Sammelgele wurde die Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer befüllt und die Proben appliziert.

Das Probenvolumen setzte sich aus Proteinlysate (entsprechend einer bestimmten Menge an Protein) und Probenauftragspuffer (Roti-Load[®], Proteinauftragspuffer, reduzierend) zusammen, welches mit *Hypotonic Buffer* (für CF) bzw. *Lysis Buffer* (für NF) auf ein Gesamtvolumen von 20 μl ergänzt wurde. Die genaue Zusammensetzung und Aufbereitung

der Proben für den Nachweis der verschiedenen Proteine ist Tabelle 2 zu entnehmen. Zur späteren Identifikation der zu untersuchenden Proteine wurden zwei Proteinmarker mitgeführt (Broad Range Protein Molecular Weight Markers und PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Die Auftrennung der Proben erfolgte im Sammelgel bei 100 V und 12 mA, im Trenngel bei 200 V und 20 mA.

Tabelle 2: Zusammensetzung und Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE

Protein	Probenzusammensetzung (für eine Probe)	Probenaufbereitung
SREBP-1 Nachweis in CF und NF	<ul style="list-style-type: none"> - Probenvolumen für 20 µg Protein - Volumen an HB bzw. LB zum Ergänzen auf 15 µl - 5 µl Roti-Load® 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min bei 95°C im TS1 ThermoShaker denaturieren
SREBP-2 Nachweis in CF und NF	<ul style="list-style-type: none"> - Probenvolumen für 20 µg Protein - Volumen an HB bzw. LB zum Ergänzen auf 15 µl - 5 µl Roti-Load® 	<ul style="list-style-type: none"> - 5 min bei 95°C im TS1 ThermoShaker denaturieren
NIS Nachweis in CF	<ul style="list-style-type: none"> - Probenvolumen für 10 µg Protein - Volumen an HB zum Ergänzen auf 10 µl - 10 µl Roti-Load® 	<ul style="list-style-type: none"> - 30 min bei 37°C im TS1 ThermoShaker inkubieren

2.7 Western Blot

Der Western Blot ist eine immunologische Technik und dient dem Nachweis eines bestimmten Proteins, aus dem in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteingemisch. Über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld wurden die Proteine aus der Polyacrylamidmatrix eluiert und auf eine Polymerschicht aus Nitrocellulose übertragen. Dafür wurde ein Tankblotsystem (BIO RAD Mini Trans-Blot® Cell) verwendet und der Blot nach Anleitung des Herstellers aus in Transferpuffer getränkten Nitrocellulosemembranen (Bio Trace™ NT, Pure Nitrocellulose Blotting Membran), *Fiber Pads* (BIO RAD, Mini Trans-Blot®), Blotpapier und dem Gel zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 100 V und 360 mA. Für die SREBP-Blots wurde der Transferpuffer nach *Laemmli (1970)* und für den NIS-Blot der Transferpuffer nach *Kaminski et al. (1994)* verwendet.

Um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran zu überprüfen, wurden die Membranen mit Ponceau S angefärbt. Bevor die Membranen mit den

entsprechenden primären und sekundären Antikörpern (AK) gegen die jeweiligen Proteine hybridisiert wurden, wurden die freien Bindungsstellen der Membran über Nacht mit 5% Milchpulver in TBS-T (*Tris Buffered Saline Tween*) bei 4°C blockiert. Die Blots wurden mit ECL-Kits für 5 min bei RT entwickelt. Die Methode beruht auf Chemilumineszenz, wobei durch eine Peroxidase, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, ein im ECL enthaltenes Substrat umgesetzt und Licht emittiert wird. Die Blots wurden mit dem G:Box (Lumineszenzimager, SYNGENE) und dem Programm Gene Snap (SYNGENE) betrachtet und mit dem Programm Gene Tools (SYNGENE) ausgewertet. Die Eigenschaften der angewandten Antikörper sind Tabelle 3 zu entnehmen. Der primäre Antikörper für den Nachweis des NIS-Proteins wurde uns freundlicherweise von Prof. Carrasco zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Eigenschaften der Antikörper für den Western Blot

Protein	Molekulargewicht	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
SREBP-1	Precursor: ca. 125 kDa aktive Form: ca. 60-70 kDa	Mouse monoclonal anti-SREBP-1 (ab3259) ¹ 1:100	anti-mouse ³ 1:50.000
SREBP-2	Precursor: ca. 125 kDa aktive Form: ca. 70 kDa	Rabbit polyclonal anti-SREBP-2 (ab30682) ¹ 1:200	anti-rabbit ⁴ 1:50.000
NIS	ca. 87 kDa	Rabbit polyclonal high affinity anti-NIS ² 1:2000	anti-rabbit ⁴ 1:7500
β-Actin	ca. 42 kDa	Mouse monoclonal anti-β-Actin (ab6276) ¹ 1:5000	anti-mouse ³ 1:50.000

¹Abcam, Cambridge, England

²Levy, Carrasco et al. 1997

³Jackson Immuno Research, USA

⁴Sigma, Missouri, USA

2.8 RNA-Isolierung und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zunächst wurde das Behandlungsmedium aus den Zellkulturplatten entfernt und die Platten bei -80°C eingefroren.

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurde unter Verwendung des TRIzol® Reagent nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde je 150 µl Trizol in die eisgekühlten Kavitäten einer 24-Wellplatte pipettiert und für 3 min bei RT inkubiert. Nach der Überführung der Trizollösung in 1,5 ml Eppendorftubes, wobei je zwei Well einer 24-Wellplatte gepoolt wurden, erfolgte die Zugabe von Chloroform. Das Homogenat wurde durch Schütteln gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Nach einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 14.500 g und 4°C (HERAEUS Fresco 21 Centrifuge) wurde der klare, RNA-haltige Überstand in neue Eppendorftubes überführt und die darin enthaltene RNA mit Isopropanol präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation (14.500 g, 10 min, 4°C) wurden die resultierenden RNA-Pellets mit 75%-igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA-Pellets wurden mit je 20 µl DEPC-Wasser gelöst, 10 min bei 60°C und 900 rpm im Thermomixer comfort inkubiert und bei -80°C gelagert.

Mit Hilfe der NanoQuant plate™ konnte die Konzentration der RNA-Proben in ng/µl am TECAN infinite M200 bei 260 nm bestimmt werden. Außerdem wurde die Ratio aus den Absorptionen der Wellenlängen bei 260 nm und 280 nm gebildet, um einen Anhaltspunkt für den Reinheitsgrad der RNA-Proben zu erhalten. Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Den 1,2%-igen Agarosegelen (0,6 g Agarose, 5 ml 10x FA-Gelpuffer und 42,5 ml DEPC-H₂O) wurde nach dem Aufkochen und auf Abkühlen auf 65°C noch 2 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain zum Visualisieren der RNA-Banden und 2,5 ml 37% Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel für 30 min in 1x FA-Gel-Laufpuffer equilibriert. Abschließend wurden die vorbereiteten Proben (4 µg RNA, add 10 µl DEPC-Wasser, 2 µl RNA-Ladepuffer; 3 min bei 900 rpm und 65°C inkubieren) in die Geltaschen appliziert und für 45 min bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines GeneFlash UV-Licht-Imagers (SYNGENE).

2.9 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese dient dem Umschreiben von genau 1,2 µg der totalen isolierten einsträngigen RNA in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA). Dabei wird die in einem Volumen von 5 µl DEPC-Wasser verdünnte RNA mit je 20 µl eines Mastermixes versetzt, der u.a. die für das Umschreiben benötigten Oligo-dT-Primer, dNTPs und das Enzym Reverse Transkriptase enthält. Die genaue Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 4

aufgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler (Biometra) für 1 h bei 42°C und wurde anschließend bei 72°C (10 min) abgestoppt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Mastermix je Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen (in µl)
Oligo-dT-18 Primer; 100 mM	1
5-fach Puffer	5
dNTP; 10 mM	1,25
DEPC-Wasser	12,45
RevertAid™ Reverse Transkriptase; 200 U/µl	0,3

2.10 RTD-PCR

Die PCR dient der Vervielfältigung zu untersuchender DNA-Abschnitte (Zielgene) mit Hilfe spezifischer Primer. Diese Amplifizierung erfolgt in drei, sich zyklisch wiederholenden Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, *Annealing* (Anlagerung der Primer) und *Extension* (Verlängerung der Primer). Als Primer werden zwei einsträngige DNA-Moleküle (Oligonucleotide) verwendet, die komplementär zu bestimmten Abschnitten der zu untersuchenden Zielgene sind. Nach der Denaturierung der cDNA lagern sich die Primer an die vorliegenden DNA-Einzelstränge an und werden mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und dNTPs (Desoxynucleotiden) verlängert. Die so synthetisierten DNA-Doppelstränge stehen dann im nächsten Zyklus wieder zur Vervielfältigung zur Verfügung. Bei der RTD-PCR kann die Entstehung der doppelsträngigen DNA über die Detektion eines Fluoreszenzsignals durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes beobachtet werden, wobei die Stärke des Signals nach jedem Elongationsschritt bei allen Proben gemessen wurde.

Für die RTD-PCR wurde mit dem KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix for Bio-Rad iCycler™ nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Der Mastermix für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen: 7,2 µl DEPC-Wasser, 10 µl KAPA™ SYBR® FAST QPCR MasterMix, 0,4 µl Primer *forward* (10 µM) und 0,4 µl Primer *reverse* (10 µM). Zu diesem Mix von 18 µl wurden dann je 2 µl cDNA pipettiert.

Als Haushaltsgene wurden bei Messungen in FRTL-5-Zellen das β-Actin, bei Messungen in primären porcinen Thyreozyten das ribosomale Protein S 9 (RPS-9) herangezogen, deren Expression gleichmäßig und unabhängig von verschiedenen Behandlungen der Zellen ist. Die Eigenschaften der verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgeführt. Anhand der C_T-Werte (*cycle threshold*) wurden die Amplifikationskurven mit dem Programm RotorGene 6000 (Corbett Research, Australien) ausgewertet.

Mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde die relative mRNA-Konzentration berechnet:

$$\Delta\Delta C_t = C_t \text{beta-Actin} - C_t \text{Zielgen}$$

Über die Berechnung der Ratio (Expressionsrate) der Zielgene konnte ein Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe erfolgen.

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta\Delta C_t}$$

Abschließend wurden die PCR-Produkte auf Qualität und Größe mittels einer DNA-Gelelektrophorese überprüft. Den 1,2%-igen Agarosegelen (2,25 g Agarose, 150 ml 1x TAE-Puffer) wurden nach dem Aufkochen und Abkühlen auf 65°C 4 µl GelRed Nucleic Acid Gel Stain zugegeben. Nach dem Gießen und Aushärten des Gels wurde dieses für ca. 30 min in 1x TAE-Puffer equilibriert und die Proben aufgetragen. Je 20 µl PCR-Produkt wurden mit 4 µl 5x Gelladepuffer (5x Green GoTaq® Flexi Buffer) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt und das Gel im Anschluss unter UV-Licht (GeneFlash) analysiert.

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Primer

Spezies	Gen	Primersequenz		Produktgröße (bp)	Annealingtemperatur (°C)	NCBI Gene Bank
Ratte	SREBP-1c	For: GGAGCCATGGATTGCACATT	Rev: AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA	191	60 °C	AF286470.2
	SREBP-2	For: CTGACCACAATGCCGGTAAT	Rev: CTTGTGCATCTTGGCATCTG	204	60 °C	NM_001033694.1
	FAS	For: AGGTGCTAGAGGCCCTGCTA	Rev: GTGCACAGACACCTTCCCAT	281	60 °C	X62888.1
	SCD	For: GTACTACAAGCCTGGCCTC	Rev: CACCCAGGGAACAGGAT	227	60 °C	NM_139192.2
	GPAT	For: CAGCGTGATTGCTACCTGAA	Rev: CTCTCCGTCCTGGTGAGAAG	194	60 °C	U36771.2
	LDLR	For: ACAGTGCCTCCCAAGTCCAA	Rev: GCAAATGTGGATCTCGTCTC	221	60 °C	NM_175762.2
	HMGCoAR	For: CGAGCAAGTGATTACCCTGA	Rev: GTCTTGTTTTCAGTCTGGAT	223	60 °C	NM_013134.2
	MK	For: TGGAGTGTGAGCGCGTGCTG	Rev: CCTGCGCCAGTCAGCTTGCT	187	60 °C	NM_031063.1
	NIS	For: GCTGTGGCATTGTCATGTTT	Rev: TGAGGTCTTCCACAGTCACA	219	60 °C	NM_052983.2
	TPO	For: CAGGTGTTGAGAAGCAGTTG	Rev: CTTTGAAAGCTGTAGCCAGG	255	60 °C	NM_019353.1
	CPT-1a	For: GCAAAGTGTGCGCAGACCT	Rev: CATCTTCCATGCAGCAGGGA	170	60 °C	NM_031559.2
	β-Actin	For: GACCTCTATGCCAACACAGT	Rev: CACCAATCCACACAGAGTAC	154	60 °C	NM_031144.2
Schwein	SREBP-2	For: CGCTCGGAATCCTGCTGTG	Rev: GGTGCGGGTCCGTGTCGTG	103	60 °C	DQ_020476.1
	LDLR	For: TGCGAAGATATCGACGAGTG	Rev: TACGGTCCAGGGTCATCTTC	196	60 °C	AF_118147.1
	HMGCoAR	For: GGTCAGGATGCGGCACAGAACG	Rev: GCCCCACGGTCCCGATCTCTATG	127	60 °C	S_79678.1
	MK	For: CTGTGGCCTTGAACCTGAGA	Rev: CTGCTGGATGCCAATGTTTG	92	60 °C	XM_001929184.1
	NIS	For: CATGAAGGCTGTGATCTGGA	Rev: GTGGTTCTTGGCAAGCTCAA	130	60 °C	NM_214410.1
	RPS9	For: GTCGCAAGACTTATGTGACC	Rev: AGCTTAAAGACCTGGGTCTG	327	60 °C	Caa23101 (EMBL)

Abkürzungen: SREBP-1c, -2 (*sterol regulatory element-binding protein-1c, -2*); FAS (Fettsäuresynthase); SCD (Stearoyl-CoA-9-Desaturase); GPAT (Glycerin-3-Phosphat-Acyltransferase); LDLR (*low-density-lipoprotein-Rezeptor*); HMGCoAR (HMG-CoA-Reduktase); MK (Mevalonatkinase); NIS (Natrium-Iodid-Symporter); CPT-1a (Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1a); TPO (Thyropoxidase); RPS9 (Ribosomales Protein S 9); bp (Basenpaare); For (*forward*); Rev (*reverse*)

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels *one-way* Anova mit der MINITAB-Software (Minitab, State Collage, USA). Unterschieden sich die Mittelwerte signifikant ($P < 0,05$) erfolgte ein multipler Mittelwertvergleich mit dem Fisher Test. Als Signifikanzgrenze galt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($P < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von TSH und Forskolin auf die Genexpression von SREBPs in FRTL-5-Zellen nach 24-stündiger TSH-Restriktion

In diesem Versuch wurde an FRTL-5-Zellen der Effekt einer TSH- bzw. Forskolinbehandlung nach vorausgegangener 24-stündiger TSH-Restriktion auf die Genexpression der SREBPs auf Transkript- und Proteinebene untersucht. Um die vermutete intrazelluläre Wirkungsvermittlung von TSH über cAMP zu bestätigen, wurden die zunächst mit TSH durchgeführten Inkubationen durch die Inkubation mit Forskolin ergänzt, da Forskolin ein synthetischer Agonist der cAMP-Kaskade ist. Zunächst wurden Inkubationen über 24 h durchgeführt.

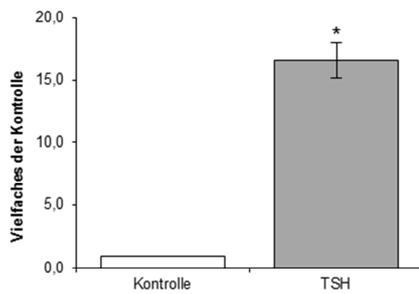
3.1.1 Einfluss von TSH auf die Genexpression der SREBPs und ihrer Zielgene nach 24-stündiger Inkubation

3.1.1.1 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1

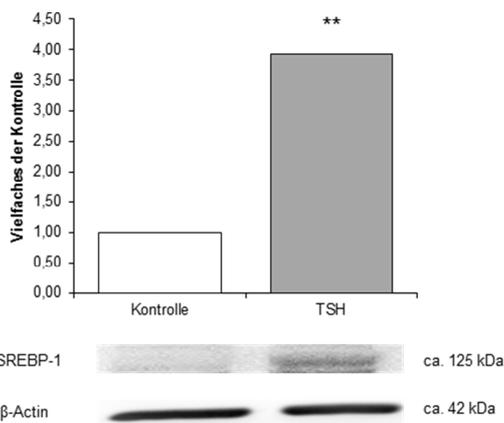
Die 24-stündige Behandlung von FRTL-5-Zellen mit dem Hormon TSH führte nach einer vorausgegangenen 24-stündigen TSH-Restriktion zu einem Anstieg der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c um das 16-fache ($P < 0,05$; Abb. 1A).

Neben einer gesteigerten Transkription des SREBP-1c-Gens durch TSH, konnte auch eine gesteigerte Translation mit erhöhten relativen Proteinkonzentrationen beobachtet werden. So wurde die relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-1 durch die 24-stündige TSH-Behandlung um etwa das 4-fache, im Vergleich zur Kontrolle ohne TSH-Behandlung, gesteigert ($P < 0,001$; Abb. 1B). Weiterhin konnte in Anwesenheit von TSH die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 um das 30-fache gesteigert werden ($P < 0,05$; Abb. 1C).

A SREBP-1c (mRNA)



B SREBP-1 (Precursorform)



C SREBP-1 (aktive Form)

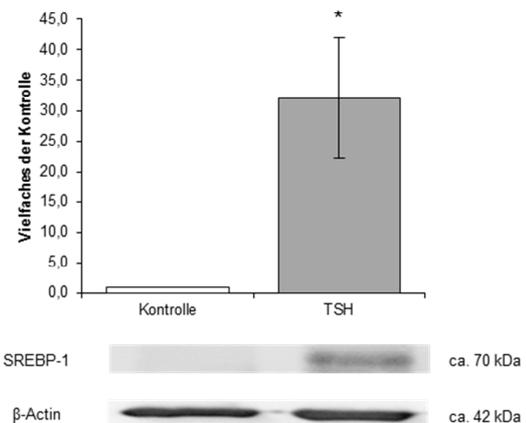


Abb. 1: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,001$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection-PCR* quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-1; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.1.1.2 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c

Wie in Tab. 6 dargestellt, führte eine Behandlung mit TSH zu 40% bzw. 16% erhöhten relativen mRNA-Konzentrationen von FAS und GPAT ($P < 0,05$).

Die relative mRNA-Konzentration der SCD wurde durch TSH numerisch um 30% gegenüber der Kontrolle vermindert. Diese Änderungen der Expression von Zielgenen des SREBP-1c fielen vergleichsweise schwach aus.

Tab. 6: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c.

Gen	Kontrolle	TSH
FAS	1,00 ± 0,00	1,40 ± 0,03 *
SCD	1,00 ± 0,00	0,68 ± 0,70
GPAT	1,00 ± 0,00	1,16 ± 0,04 *

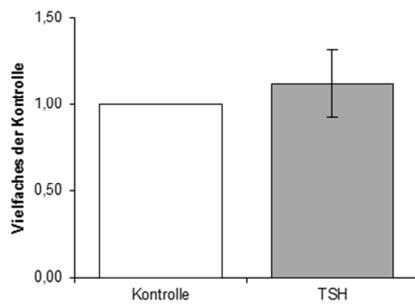
Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.1.1.3 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2

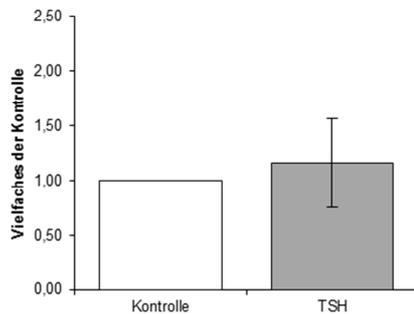
Die Behandlung von FRTL-5-Zellen mit TSH führte nach 24 h zu keinem Unterschied der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe (Abb. 2A).

Die relative Proteinkonzentration des SREBP-2-Precursors blieb durch die Behandlung mit TSH ebenfalls unbeeinflusst (Abb. 2B). Dagegen konnte die aktive Form des SREBP-2 in Anwesenheit von TSH um ca. 90% im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden (P<0,05; Abb. 2C).

A SREBP-2 (mRNA)



B SREBP-2 (Precursorform)



C SREBP-2 (aktive Form)

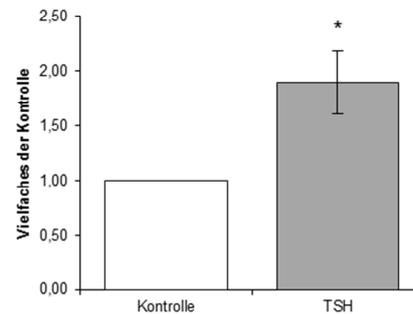


Abb. 2: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.1.1.4 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2

Die relativen mRNA-Konzentrationen des LDLR und der HMGCoAR konnten durch die Behandlung mit TSH um das 10-fache bzw. das 2,7-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert werden (P<0,05). Das Zielgen MK wies keine signifikante Änderung ihrer relativen mRNA-Konzentration auf (Tab. 7).

Tab. 7: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

Gen	Kontrolle	TSH
LDLR	1,00 ± 0,00	9,96 ± 1,26 *
HMGCoAR	1,00 ± 0,00	2,70 ± 0,61 *
MK	1,00 ± 0,00	1,02 ± 0,08

Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

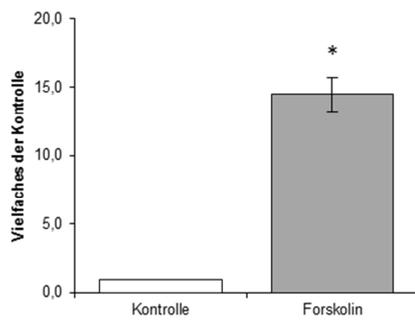
3.1.2 Einfluss von Forskolin auf die Genexpression der SREBPs und ihrer Zielgene nach 24-stündiger Inkubation

3.1.2.1 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1

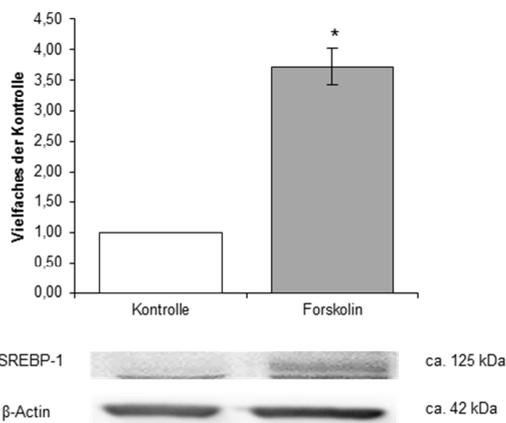
Wie in Abb. 3A zu sehen ist, führte auch die 24-stündige Behandlung mit dem synthetischen cAMP-Agonisten Forskolin zu einem Anstieg der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c um das 15-fache (P<0,05).

Eine Behandlung mit Forskolin führte ebenfalls zu einem etwa 4-fachen Anstieg der relativen Proteinkonzentration des SREBP-1-Precursors (P<0,05; Abb. 3B). Weiterhin konnte die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 um das ca. 95-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden (Abb. 3C).

A SREBP-1c (mRNA)



B SREBP-1 (Precursorform)



C SREBP-1 (aktive Form)

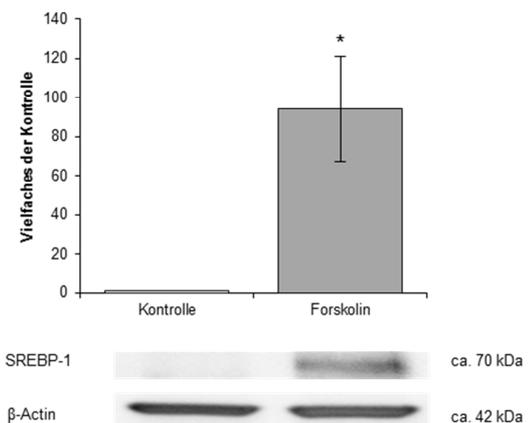


Abb. 3: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection-PCR* quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-1; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.2.1.2 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c

Wie Tab. 8 zeigt, führte auch eine Behandlung mit Forskolin zu einer leichten Steigerung der relativen mRNA-Konzentration der FAS um ca. 40% ($P < 0,05$). Die relativen mRNA-Konzentrationen der SCD und GPAT blieben durch die Behandlung unbeeinflusst.

Tab. 8: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c.

Gen	Kontrolle	Forskolin
FAS	1,00 ± 0,00	1,38 ± 0,06 *
SCD	1,00 ± 0,00	0,81 ± 0,02
GPAT	1,00 ± 0,00	0,96 ± 0,31

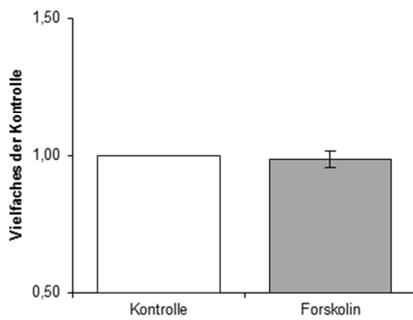
Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.2.1.3 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2

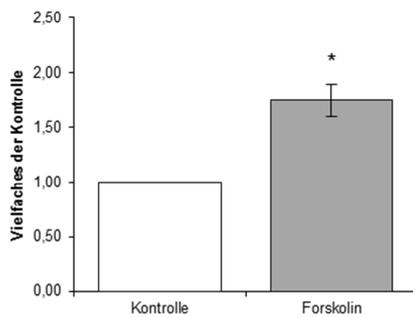
Ebenso wie TSH führte auch Forskolin zu keinem Anstieg der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 (Abb. 4A).

Dagegen führte die Behandlung mit Forskolin zu einem Anstieg der relativen Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2 auf das 1,8-fache im Vergleich zur Kontrolle (P<0,05; Abb. 4B). Die aktive Form des SREBP-2 konnte durch Forskolin ein um das 4-fache gesteigert werden (P<0,05; Abb. 4C).

A SREBP-2 (mRNA)



B SREBP-2 (Precursorform)



C SREBP-2 (aktive Form)

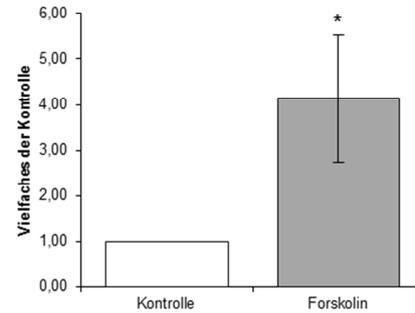


Abb. 4: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-2. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection-PCR* quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.1.2.4 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2

Eine Behandlung mit Forskolin im Anschluss an eine 24-stündige TSH-Restriktion führte zu einem Anstieg der relativen mRNA-Konzentration des LDLR um das 10-fache (P<0,05) und der HMGCoAR um das 2,5-fache (P<0,001), wie in Tab. 9 dargestellt ist. Die Transkription der MK blieb unbeeinflusst.

Tab. 9: Effekt einer 24-stündigen TSH-Restriktion und anschließender 24-stündiger Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

Gen	Kontrolle	Forskolin
LDLR	1,0 ± 0,0	10,7 ± 4,00 *
HMGCoAR	1,00 ± 0,00	2,46 ± 0,00 **
MK	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,10

Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 2 unabhängigen Experimenten (n=2); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* = P<0,05; ** = P<0,001; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.1.3 Einfluss von TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf

Da die 24-stündigen TSH- und Forskolinbehandlungen zum Teil nur geringe Effekte auf die relativen mRNA-Konzentrationen bewirkten, sollte überprüft werden, ob zu früheren oder späteren Zeitpunkten möglicherweise deutlichere Effekte zu beobachten sind. Daher wurden die Inkubationen anschließend in Zeitverlaufsstudien über 6 bis 48 h wiederholt.

Die Inkubation der FRTL-5-Zellen mit TSH über 6, 12, 24, 36 und 48 h im Anschluss an eine 24-stündige TSH-Restriktion zeigte für das SREBP-1c bis zum Zeitpunkt 24 h eine zeitabhängige Steigerung der relativen mRNA-Konzentration auf das maximal 13-fache im Vergleich zur Kontrolle auf (P<0,05; Abb. 5A). Ähnliche Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c zeigten sich zu den späteren Zeitpunkten (P<0,05). Die relativen mRNA-Konzentrationen von FAS und GPAT, Zielgene des SREBP-1c, wurden nach 6-stündiger Inkubation mit TSH auf das 2,3-fache bzw. 1,9-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht (P<0,05; Abb. 5B-C). Zu den späteren Zeitpunkten über 12, 24, 36 h traten keine Effekte auf.

Die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 wurde nach 6- und 48-stündiger Inkubation mit TSH auf das ca. 1,3-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert (P<0,05; Abb. 5D). Zu den anderen Zeitpunkten konnten keine Effekte beobachtet werden. Für die Zielgene des SREBP-2 konnten zu allen erfassten Zeitpunkten Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration beobachtet werden (P<0,05). Die relative mRNA-Konzentration des LDLR stieg dabei zeitabhängig an, das Maximum wurde nach 48 h mit einer Steigerung auf das 18-fache im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (P<0,05; Abb. 5E). Auch für die HMGCoAR konnte die maximale Steigerung der relativen mRNA-Konzentration nach 48 h um das ca. 3,8-fache beobachtet werden (P<0,05; Abb. 5F).

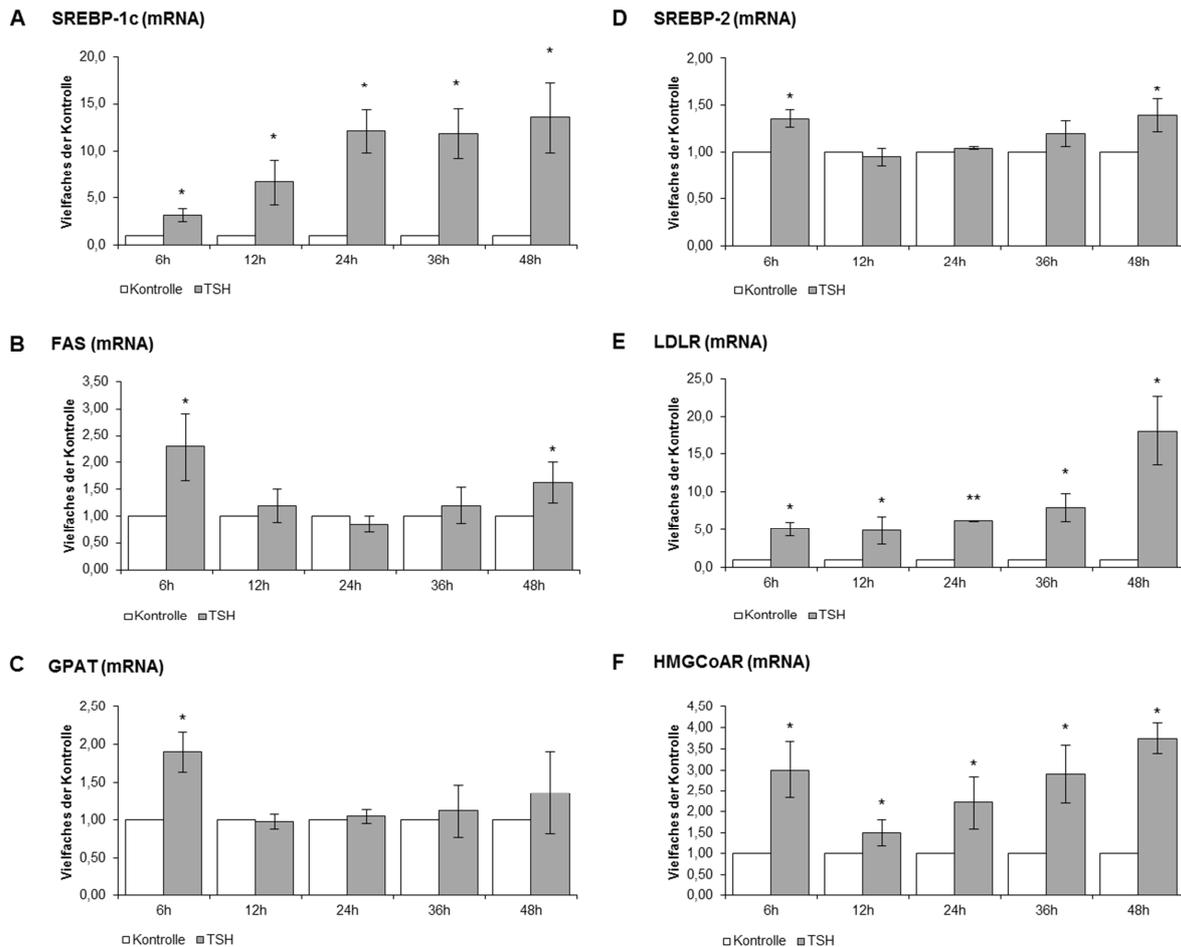


Abb. 5 A-F: Effekt einer Behandlung mit 10 mU/ml TSH über 6, 12, 24, 36 und 48 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP-2 und deren Zielgenen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,001$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.1.4 Einfluss von Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf

Ähnlich dem Inkubationsversuch mit TSH führte auch die Behandlung mit Forskolin zu einer zeitabhängig gesteigerten relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c (Abb. 6A). Die Steigerung um das 14-fache im Vergleich zur Kontrolle war nach 48 h maximal ($P < 0,05$). Die Zielgene FAS und GPAT erreichten die maximale Steigerung nach 6-stündiger Forskolinbehandlung um das 2,8-fache bzw. 2,3-fache im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$; Abb. 6B-C). Längere Inkubationen mit Forskolin resultierten in geringeren Steigerungen oder blieben ohne Effekt.

Infolge der Forskolinbehandlung wurde auch die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 nach 6 h maximal um das 2-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert ($P < 0,05$; Abb. 6D).

Die relative mRNA-Konzentration des LDLR wurde zeitabhängig gesteigert ($P < 0,05$; Abb. 6E). Die relative mRNA-Konzentration der HMGCoAR wurde im beobachteten Zeitraum um das 2- 3,3-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert ($P < 0,05$; Abb. 6F).

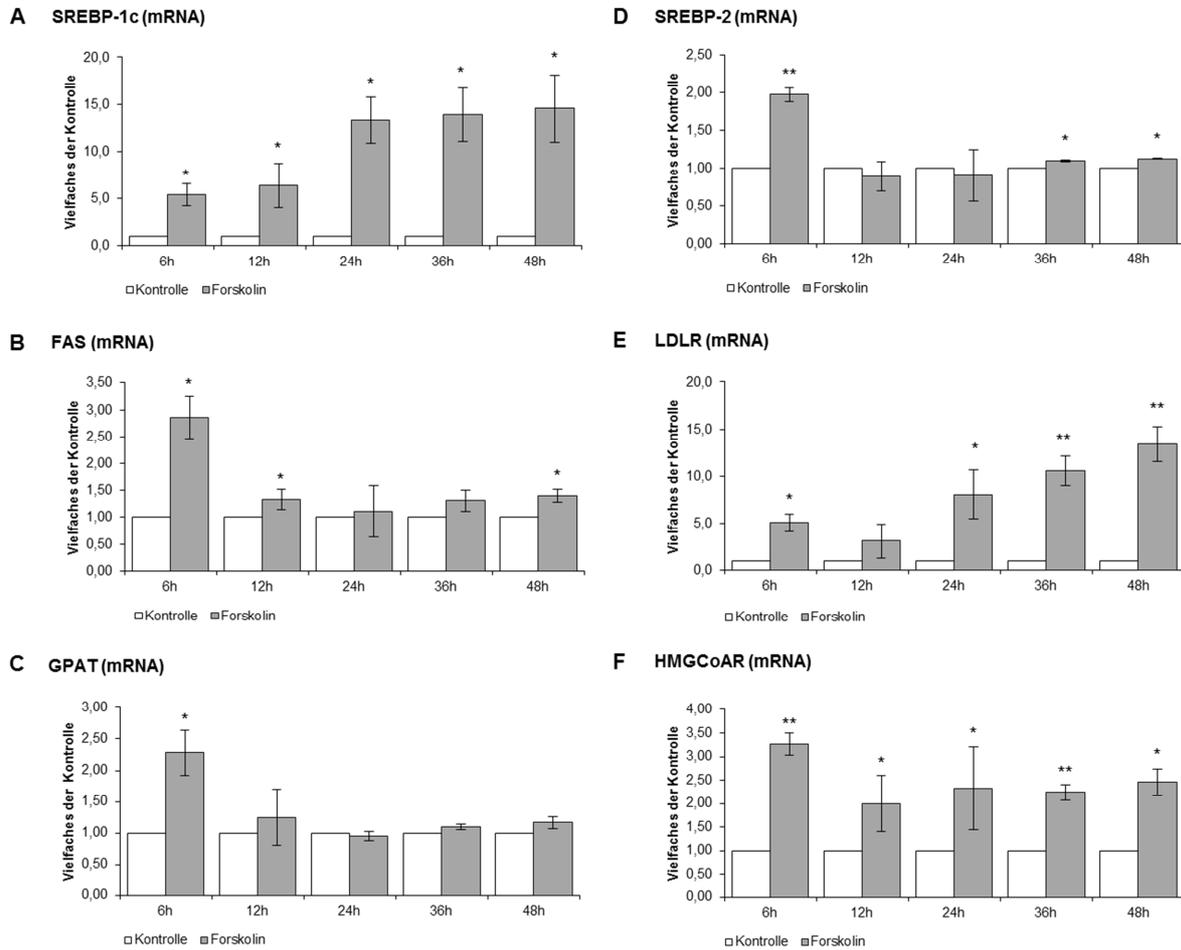


Abb. 6 A-F: Effekt einer Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin über 6, 12, 24, 36 und 48 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP-2 und deren Zielgenen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); * kennzeichnet signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,001$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.2 Einfluss einer Behandlung mit TSH und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol auf die Genexpression der SREBPs, der SREBP-Zielgene und von NIS und TPO in FRTL-5-Zellen

Die Ergebnisse dieses Versuchskomplexes sollen Aufschluss darüber geben, ob die für die Schilddrüsenhormonsynthese bedeutsamen Proteine NIS und TPO durch die Transkriptionsfaktorfamilie der SREBPs beeinflusst werden. Über die Behandlung der FRTL-5-Zellen mit Cholesterol (Chol) und 25-Hydroxycholesterol (25-HC) sollte die Aktivität der

SREBPs vermindert werden um so eine mögliche Beeinflussung der Genexpression von NIS und TPO auf Transkriptionsebene und Proteinebene zu untersuchen. Bei der Inkubation der Zellen wurde auf eine vorherige 24-stündige TSH-Restriktion verzichtet, um den Stress für die Zellen durch die eigentliche Behandlung zu minimieren. Da für die TPO keine passenden primären Antikörper zur Verfügung standen, konnte keine Analyse ihrer relativen Proteinkonzentration mittels Western Blot durchgeführt werden.

3.2.1 Inkubation mit TSH und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol über 24 Stunden

3.2.1.1 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1

Wie in Abb. 7A zu sehen ist, führte eine 24-stündige Behandlung mit TSH zu einer gesteigerten relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c um das ca. 15-fache ($P < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle (Vgl. zwischen Säule 1 und 4). Durch die zusätzliche Behandlung mit 1 μM und 5 μM 25-HC konnte die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c im Vergleich zur Behandlung ohne das Oxysterol zusätzlich gesteigert werden. Dabei waren in Abwesenheit von TSH konzentrationsabhängige Zunahmen der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c zu beobachten ($P < 0,05$). In Anwesenheit von TSH waren die konzentrationsabhängigen Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen numerisch.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Inkubation mit Chol und TSH in Abb. 7B, konnte man feststellen, dass auch bei dieser Inkubation die Behandlung mit TSH zu einer um das ca. 12-fache erhöhten relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c führte ($P < 0,05$). In Abwesenheit und Anwesenheit von TSH konnten konzentrationsabhängige Veränderungen der relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c durch die Behandlung mit 1 μM bzw. 5 μM Chol festgestellt werden ($P < 0,05$). Im Vergleich zu Abb. 7A wird aber deutlich, dass Chol zu weniger stark ausgeprägten Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c führt, als eine Behandlung mit den gleichen Konzentrationen an 25-HC.

Betrachtet man nun die ergänzenden Untersuchungen der relativen Proteinkonzentrationen im Western Blot, konnten die Ergebnisse für die Precursorform des SREBP-1 die Ergebnisse von der mRNA-Ebene bestätigen. Wie in Abb. 7C zu sehen ist, wurde durch eine 24-stündige Inkubation der FRTL-5-Zellen mit TSH die relative Proteinkonzentration der Precursorform um das 2,8-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert ($P < 0,05$; Vgl. der Säulen 1 und 4). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass durch die Behandlung mit 25-HC die relativen Proteinkonzentrationen des SREBP-1-Precursors sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von TSH im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (ohne

Sterolbehandlung) gesteigert werden konnten (Steigerungen um das ca. 4,5-fache bzw. 7-fache, $P < 0,05$). Durch die Behandlung mit Chol konnte nur bei Abwesenheit von TSH eine Steigerung auf das 1,3-fache im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden ($P < 0,05$).

Wie schon bei der Precursorform ist auch bei der aktiven Form des SREBP-1 in Abb. 7D zu erkennen, dass die relative Proteinkonzentration durch die Behandlung mit TSH um das 7-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde ($P < 0,05$; Vgl. der Säulen 1 und 4). Die zusätzliche Behandlung mit 5 μM 25-HC bzw. Chol führte in Abwesenheit von TSH zu Verminderungen der relativen Proteinkonzentration auf das 0,5-fache und 0,7-fache der relativen Proteinkonzentration der Kontrolle ($P < 0,05$). In Anwesenheit von TSH konnten durch 25-HC und Chol ebenfalls verminderte relative Proteinkonzentrationen im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle beobachtet werden ($P < 0,05$). Die Behandlung mit 25-HC bewirkte dabei eine stärkere Reduktion der relativen Proteinkonzentration als eine Behandlung mit Chol.

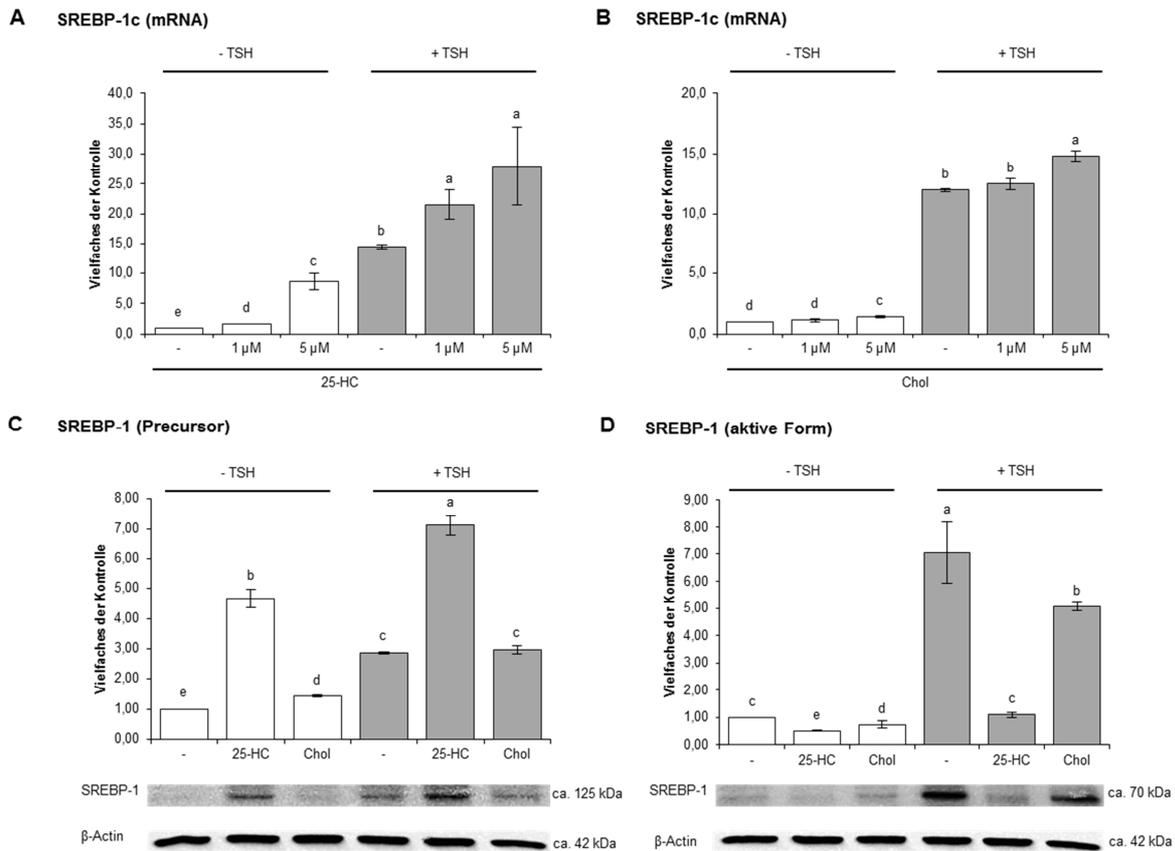


Abb. 7: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d,e} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P<0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- Sterol) wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c nach Behandlung mit 25-HC und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c nach Behandlung mit Chol und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **C.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-1 nach Behandlung mit 5 μ M 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **D.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 nach Behandlung mit 5 μ M 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.2.1.2 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, konnten bei allen untersuchten Zielgenen Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen durch eine Behandlung mit TSH im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. So wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von FAS und GPAT leicht auf das 1,5-fache, die der SCD auf das ca. 7,5-fache der reaktiven mRNA-Konzentration der Kontrolle gesteigert ($P<0,05$). Unter dem Einfluss von 25-HC konnten in Abwesenheit von TSH die relativen mRNA-Konzentrationen der FAS dosisabhängig vermindert werden. Die relative mRNA-Konzentration der GPAT wurde im Gegensatz dazu

durch 5 μM 25-HC leicht gesteigert ($P < 0,05$). Für die SCD konnten numerische Steigerungen beobachtet werden. In Gegenwart von TSH wurde die relative mRNA-Konzentration der FAS ebenfalls vermindert ($P < 0,05$). Für die GPAT und SCD konnten Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen durch 25-HC beobachtet werden ($P < 0,05$). Diese unerwarteten Steigerungen stehen im Gegensatz zu den Befunden des reifen SREBP-1, dessen relative Proteinkonzentration durch 25-HC vermindert wurde.

Tab. 10: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c.

25-HC	-TSH			+TSH		
	-	1 μM	5 μM	-	1 μM	5 μM
FAS	1,00 \pm 0,00 ^b	1,10 \pm 0,16 ^b	0,86 \pm 0,04 ^c	1,45 \pm 0,21 ^a	0,79 \pm 0,10 ^c	1,04 \pm 0,04 ^b
SCD	1,0 \pm 0,0 ^c	1,4 \pm 0,2 ^c	2,3 \pm 0,04 ^c	7,6 \pm 0,6 ^b	8,8 \pm 0,9 ^b	12,2 \pm 1,0 ^a
GPAT	1,00 \pm 0,00 ^d	0,97 \pm 0,13 ^d	1,18 \pm 0,10 ^c	1,56 \pm 0,04 ^b	1,70 \pm 0,03 ^b	2,46 \pm 0,18 ^a

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- 25-HC) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

Betrachtet man die in Tabelle 11 aufgeführten Ergebnisse der Inkubation mit Chol und TSH kann man erneut gesteigerte relative mRNA-Konzentrationen von FAS, SCD und GPAT durch eine Behandlung mit TSH über 24 h beobachten. Dabei wurde die relative mRNA-Konzentration der SCD auf ca. das 8-fache und die der GPAT auf das 1,6-fache durch TSH im Vergleich zur Kontrolle gesteigert ($P < 0,05$).

In Abwesenheit von TSH konnten durch die Cholesterolbehandlung keine Veränderungen der relativen mRNA-Konzentrationen der untersuchten Zielgene beobachtet werden. In Anwesenheit von TSH konnte durch Chol die relative mRNA-Konzentration der SCD unerwartet gesteigert werden ($P < 0,05$), wobei die Dosisabhängigkeit nur numerisch zu beobachten war. Die relative mRNA-Konzentration der GPAT wurde ebenso gesteigert, hier mit erkennbarer Dosis-Wirkungs-Beziehung ($P < 0,05$). Somit bestätigt sich auch hier, dass die regulatorische Potenz von Chol geringer ist als die des 25-HC.

Tab. 11: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c.

Chol	-TSH			+TSH		
	-	1 μ M	5 μ M	-	1 μ M	5 μ M
FAS	1,00 \pm 0,00 ^{c,d}	1,02 \pm 0,01 ^{c,d}	0,93 \pm 0,05 ^d	1,12 \pm 0,16 ^{b,c}	1,38 \pm 0,05 ^a	1,21 \pm 0,00 ^{a,b}
SCD	1,0 \pm 0,0 ^c	0,7 \pm 0,2 ^c	0,8 \pm 0,04 ^c	8,3 \pm 1,4 ^b	11,7 \pm 0,6 ^a	12,9 \pm 1,6 ^a
GPAT	1,00 \pm 0,00 ^c	1,15 \pm 0,06 ^c	1,28 \pm 0,09 ^{b,c}	1,62 \pm 0,09 ^b	1,73 \pm 0,38 ^b	1,99 \pm 0,05 ^a

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- Chol) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.2.1.3 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2

Eine Behandlung mit TSH führte zu einer Steigerung der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 um ca. 36% (P<0,05; Abb. 8A). Anders als beim SREBP-1c (Abb. 7A) führt hier die zusätzliche Behandlung mit 25-HC in Abwesenheit und Gegenwart von TSH zu verminderten relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 (P<0,05). In Abwesenheit von TSH konnten die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 um ca. 50% durch 1 μ M und 5 μ M 25-HC im Vergleich zur Kontrolle vermindert werden (P<0,05).

Auch in Abb. 8B ist der Effekt einer Behandlung mit TSH auf die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 zu erkennen. Die relative mRNA-Konzentration wurde hier um ca. 50% gesteigert (P<0,05). In Abwesenheit von TSH konnten keine Veränderungen der relativen mRNA-Konzentration durch 1 μ M bzw. 5 μ M Chol im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. In Gegenwart des TSH konnten dagegen die relativen mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle durch Chol um ca. 15% vermindert werden (P<0,05; Abb. 8B; Vgl. der Säulen 4 bis 6).

Zieht man die Ergebnisse des Western Blots hinzu, ist aus Abb. 8C zu ersehen, dass die relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2 durch die Behandlung mit TSH nur numerisch um ca. 30% im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden konnte. In Abwesenheit von TSH konnte einzig durch 5 μ M Chol eine Steigerung um ca. 60% (P<0,05) beobachtet werden (Vgl. der Säulen 1 und 3). In Gegenwart von TSH führten die zusätzlichen Behandlungen mit 25-HC und Chol dagegen zu keinen Veränderungen der relativen Proteinkonzentrationen gegenüber der gruppeninternen Kontrolle. Für die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2 (Abb. 8D) konnte der TSH-Effekt dagegen eine signifikante Steigerung um ca. 50% im Vergleich zur Kontrolle bewirken (P<0,05; Vergleich der Säulen 1 und 4). Weiterhin ist zu erkennen, dass durch die

zusätzlichen Behandlungen mit 25-HC und Chol Verminderungen der relativen Proteinkonzentration in Abwesenheit und Anwesenheit des TSH zu beobachten waren ($P < 0,05$). In Abwesenheit von TSH reduzierte 25-HC die relative Proteinkonzentration des aktiven SREBP-2 um ca. 70%, Chol bewirkte eine Reduktion um ca. 40%. Diese unterschiedliche Effektivität der beiden verwendeten Sterole konnte auch in Anwesenheit von TSH bestätigt werden.

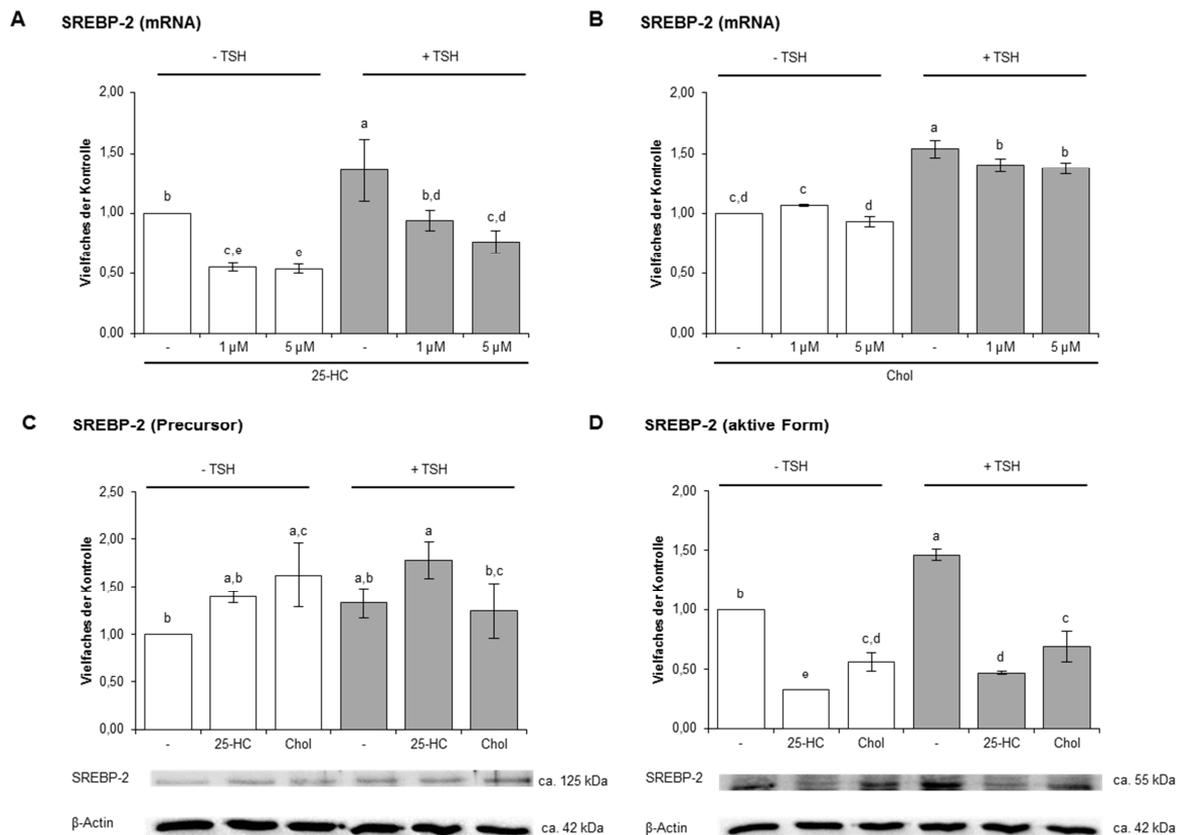


Abb. 8: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d,e} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- Sterol) wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 nach Behandlung mit 25-HC und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 nach Behandlung mit Chol und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **C.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2 nach Behandlung mit 5 μ M 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **D.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2 nach Behandlung mit 5 μ M 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.2.1.4 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2

Auch bei den Zielgenen des SREBP-2 konnten die relativen mRNA-Konzentrationen durch die Behandlung mit 10 mU/ml TSH im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden. Der LDLR wurde dabei auf das 7,7-fache, die HMGC_oAR auf das 2,9-fache und die MK leicht auf das 1,6-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert ($P < 0,05$, Tab. 12) Weiterhin wurden durch die zusätzliche Behandlung mit 1 μ M bzw. 5 μ M 25-HC in Abwesenheit von TSH Verminderungen der relativen mRNA-Konzentrationen aller Zielgene beobachtet ($P < 0,05$). In Anwesenheit des TSH wurden konzentrationsabhängige Verminderungen der relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR, HMGC_oAR und MK beobachtet ($P < 0,05$; Tab. 12).

Tab. 12: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

25-HC	-TSH			+TSH		
	-	1 μ M	5 μ M	-	1 μ M	5 μ M
LDLR	1,00 \pm 0,00 ^{b,c}	0,13 \pm 0,05 ^d	0,09 \pm 0,03 ^e	7,72 \pm 0,53 ^a	1,19 \pm 0,20 ^b	0,58 \pm 0,03 ^c
HMGC _o AR	1,00 \pm 0,00 ^d	0,65 \pm 0,18 ^e	0,55 \pm 0,07 ^e	2,86 \pm 0,07 ^a	1,58 \pm 0,10 ^b	1,19 \pm 0,12 ^c
MK	1,00 \pm 0,00 ^d	0,96 \pm 0,03 ^d	0,75 \pm 0,07 ^e	1,62 \pm 0,05 ^a	1,27 \pm 0,03 ^b	1,12 \pm 0,01 ^c

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d,e} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- 25-HC) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

Im Inkubationsversuch mit Chol und TSH wurden die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2 durch TSH im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls gesteigert ($P < 0,05$; Tab. 13) und bestätigen somit die Ergebnisse des in Tab. 12 dargestellten Versuchs (Inkubation mit TSH und 25-HC). Anders als durch 25-HC konnte durch 1 μ M bzw. 5 μ M Chol keine Verminderung der relativen mRNA-Konzentration von LDLR, HMGC_oAR und MK in Abwesenheit von TSH festgestellt werden. Auch in Gegenwart des TSH unterblieb bei LDLR und MK eine Verminderung der relativen mRNA-Konzentration. Einzig die HMGC_oAR konnte durch 5 μ M Chol im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle vermindert werden ($P < 0,05$, Tab. 13).

Tab. 13: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

Chol	-TSH			+TSH		
	-	1 μ M	5 μ M	-	1 μ M	5 μ M
LDLR	1,00 \pm 0,00 ^{b,c}	0,83 \pm 0,10 ^{b,c}	0,55 \pm 0,02 ^c	4,62 \pm 1,76 ^a	4,33 \pm 1,03 ^a	2,76 \pm 0,93 ^{a,b}
HMGCoAR	1,00 \pm 0,00 ^c	0,89 \pm 0,08 ^c	0,79 \pm 0,08 ^c	2,48 \pm 0,06 ^a	2,69 \pm 0,26 ^a	2,20 \pm 0,16 ^b
MK	1,00 \pm 0,00 ^b	0,92 \pm 0,04 ^b	0,88 \pm 0,01 ^b	1,31 \pm 0,19 ^a	1,33 \pm 0,30 ^a	1,35 \pm 0,26 ^a

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- Chol) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.2.1.5 Einfluss auf die Genexpression des NIS

Aus Abb. 9A ist zu ersehen, dass die relative mRNA-Konzentration des NIS durch die Behandlung mit TSH um das ca. 10-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden konnte (P<0,05). Darüber hinaus wurde in Abwesenheit von TSH durch 5 μ M 25-HC eine Reduktion der relativen mRNA-Konzentration des NIS auf das 0,5-fache der relativen mRNA-Konzentration der Kontrolle beobachtet (P<0,05). In Anwesenheit von TSH führte diese Dosis dagegen zu einer Steigerung (P<0,05).

Wie aus Abb. 9B hervorgeht, konnte auch bei dem Inkubationsversuch mit Chol und TSH die relative mRNA-Konzentration des NIS um das ca. 15-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden (P<0,05). Wie schon beim Inkubationsversuch mit 25-HC und TSH (Abb. 9A) bewirkte auch die Behandlung mit 1 μ M bzw. 5 μ M Chol keine Verminderungen der relativen mRNA-Konzentration des NIS in An- oder Abwesenheit des TSH.

Die in Abb. 9C dargestellten Ergebnisse des Western Blot zeigen, dass durch eine 24-stündige Inkubation der FRTL-5-Zellen mit TSH auch die relative Proteinkonzentration des NIS um das ca. 3,3-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde (P<0,05). Durch den Zusatz der Sterole wurden in Abwesenheit von TSH numerische Verminderungen der relativen Proteinkonzentration des NIS beobachtet. In Gegenwart des TSH konnte 25-HC die relative Proteinkonzentration des NIS um das 1,5-fache im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle senken (P<0,05), wohingegen Chol ohne Effekt blieb.

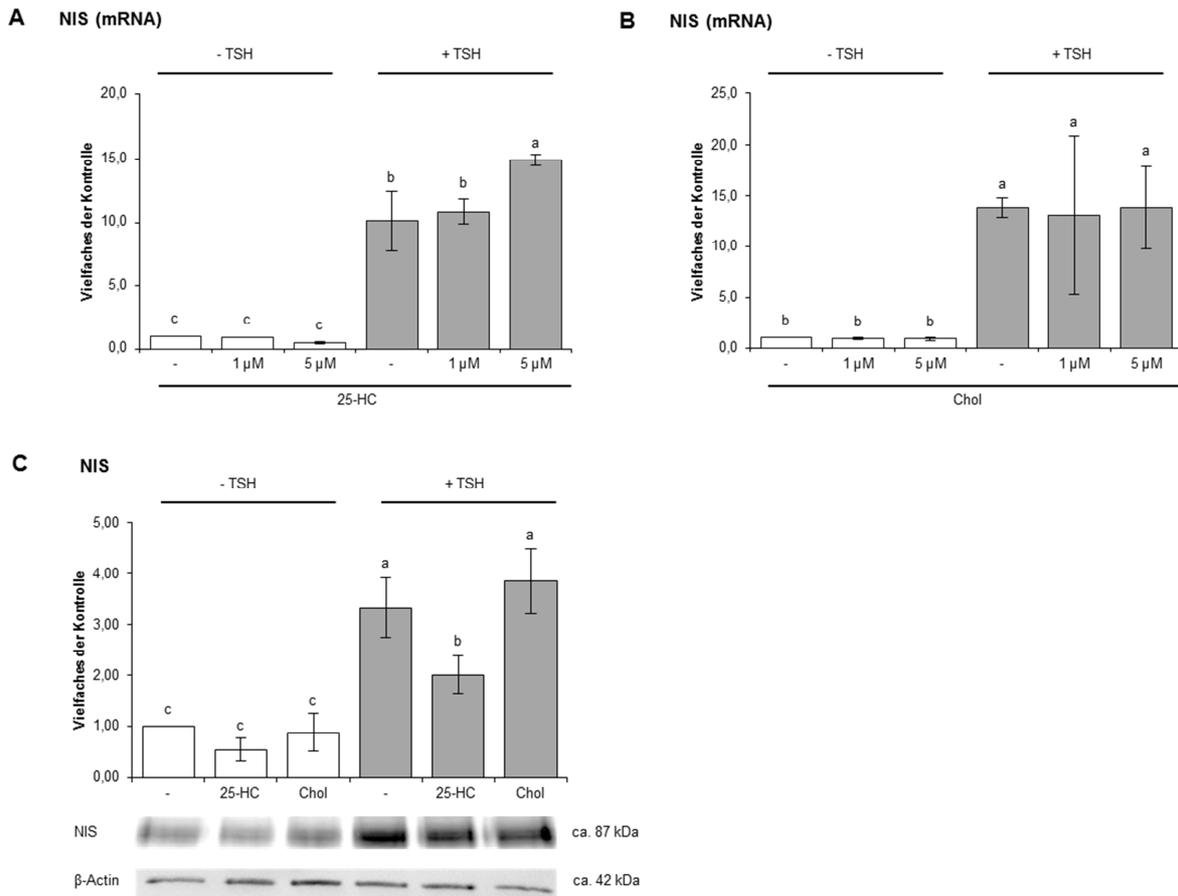


Abb. 9: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des NIS. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); a,b,c,d unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- Sterol) wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des NIS nach Behandlung mit 25-HC und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative mRNA-Konzentration des NIS nach Behandlung mit Chol und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **C.** Relative Proteinkonzentration NIS nach Behandlung mit 5 μ M 25-HC und Chol; repräsentativer Blot des NIS sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.2.1.6 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration der TPO

Bei der TPO konnte die relative mRNA-Konzentration durch eine TSH-Behandlung um ca. 50% im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden ($P < 0,05$; Abb. 10A und 10B). Die Behandlung mit 25-HC führte dabei zu dosisabhängigen Verminderungen der relativen mRNA-Konzentration der TPO ($P < 0,05$; Abb. 10A). Am stärksten wurde die relative mRNA-Konzentration der TPO durch den Einsatz von 5 μ M 25-HC, mit Verminderungen um ca. 55% in Abwesenheit von TSH bzw. um ca. 30% in Gegenwart von TSH beeinflusst ($P < 0,05$; Abb. 10A).

Die Effekte, die durch eine Inkubation mit Chol beobachtet wurden, blieben auch bei der TPO hinter denen des 25-HC zurück. So konnten durch Chol keine Veränderungen der relativen mRNA-Konzentration der TPO bewirkt werden (Abb. 10B). Es konnten lediglich numerische Verminderungen durch 1 μ M und 5 μ M Chol in Anwesenheit von TSH um ca. 20% im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle beobachtet werden.

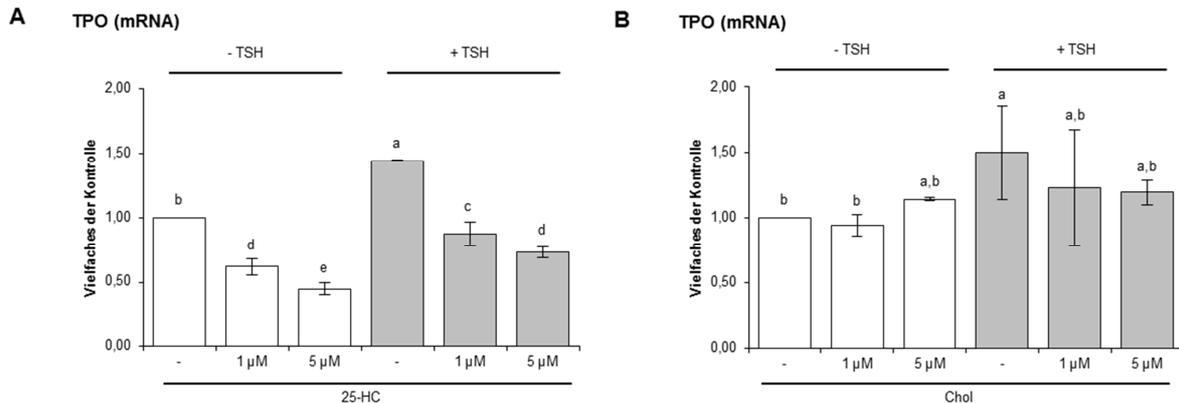


Abb. 10: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration der TPO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d,e} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P<0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- Sterol) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **A.** Relative mRNA-Konzentration der TPO nach Behandlung mit 25-HC und TSH; **B.** Relative mRNA-Konzentration der TPO nach Behandlung mit Chol und TSH.

3.2.2 Inkubation mit TSH und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol im Zeitverlauf

Um zu überprüfen, wie sich die Effekte von 25-HC und Chol auf die Expression der SREBPs und ihrer Zielgene zu verschiedenen Zeitpunkten verhalten, wurden Inkubationen über 6, 12 und 24 h durchgeführt. Die FRTL-5-Zellen wurden mit 5 μ M 25-HC bzw. Chol in Ab- und Anwesenheit von 10 mU/ml TSH behandelt. Im Anschluss wurden die Effekte auf mRNA-Ebene für die Gene SREBP-1c, FAS und GPAT sowie SREBP-2, LDLR und HMGCoAR analysiert.

3.2.1.1 Einfluss von TSH und 25-Hydroxycholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf

SREBP-1c

Analog zum Inkubationsversuch mit TSH im Zeitverlauf, konnte auch bei diesem Versuch die Inkubation mit TSH die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c mit zunehmender

Inkubationszeit gegenüber den jeweiligen Kontrollen (- TSH/- 25-HC) steigern ($P < 0,05$; Abb. 11A). Die Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ 25-HC bewirkte in Ab- und Anwesenheit von TSH ebenfalls Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c ($P < 0,05$). Besonders in Anwesenheit von TSH konnten mit zunehmender Behandlungsdauer größere Steigerungen beobachtet werden, auf das maximal 11-fache im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) nach 24-stündiger Inkubation ($P < 0,05$).

FAS

Für die FAS als Zielgen des SREBP-1c konnten durch TSH ebenfalls zu allen Zeitpunkten Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen beobachtet werden ($P < 0,05$; Abb. 11B). Die Inkubationsdauer blieb dabei ohne Einfluss auf die Steigerungsraten. Die Inkubation mit 25-HC bewirkte in Gegenwart von TSH zusätzliche Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen auf das 1,6- bis 1,9-fache im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) ($P < 0,05$). In Abwesenheit von TSH wurden nach 6 und 12 h Behandlungsdauer leichte Steigerungen durch 25-HC beobachtet ($P < 0,05$).

GPAT

Die relative mRNA-Konzentration der GPAT wurde nach 6-stündiger Inkubation mit TSH in geringem Umfang im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) gesteigert ($P < 0,05$). Längere Inkubationen mit TSH blieben ohne Effekt. Dagegen wurden in Ab- und Anwesenheit von TSH die relativen mRNA-Konzentrationen durch 25-HC nach 6 und 24 h gegenüber der jeweiligen Kontrolle (- TSH/- 25-HC) leicht gesteigert ($P < 0,05$). Durch TSH konnten dabei keine additiven Effekte hinsichtlich einer größeren Steigerungsrate festgestellt werden. Einzig nach 12-stündiger Inkubation resultierte die Inkubation mit 25-HC in Anwesenheit von TSH in einem größeren Anstieg der relativen mRNA-Konzentration der GPAT im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) ($P < 0,05$).

SREBP-2

Die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 konnte durch die TSH-Behandlung über 6, 12 und 24 h gegenüber der Kontrolle (- TSH/- 25-HC) nicht gesteigert werden (Abb. 11D). Die Behandlung mit 25-HC führte bei allen beobachteten Zeitpunkten in Ab- und Anwesenheit von TSH zu verminderten relativen mRNA-Konzentrationen gegenüber den Kontrollen (- TSH/- 25-HC) ($P < 0,05$).

LDLR

Für die relative mRNA-Konzentration des LDLR konnten durch TSH zu allen betrachteten Zeitpunkten Steigerungen im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) beobachtet werden ($P < 0,05$). Mit zunehmender Behandlungsdauer wurden die Steigerungsraten größer und nach 24 h mit einem Anstieg auf das 5,3-fache maximal. Durch $5 \mu\text{M}$ 25-HC konnte die

relative mRNA-Konzentration des LDLR zu allen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) stark auf das 0,05- bis 0,01-fache vermindert werden ($P < 0,05$). Die Gegenwart von TSH blieb ohne zusätzlichen Effekt.

HMGC α AR

Auch für die HMGC α AR konnten durch TSH gesteigerte mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) beobachtet werden ($P < 0,05$). Mit zunehmender Inkubationsdauer nahmen die Steigerungen auf das maximal 2,1-fache nach 24 h zu. Darüber hinaus resultierte die Behandlung mit 25-HC zu allen Zeitpunkten in verminderten relativen mRNA-Konzentrationen der HMGC α AR ($P < 0,05$). Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Effekt in Anwesenheit von TSH etwas abgeschwächt.

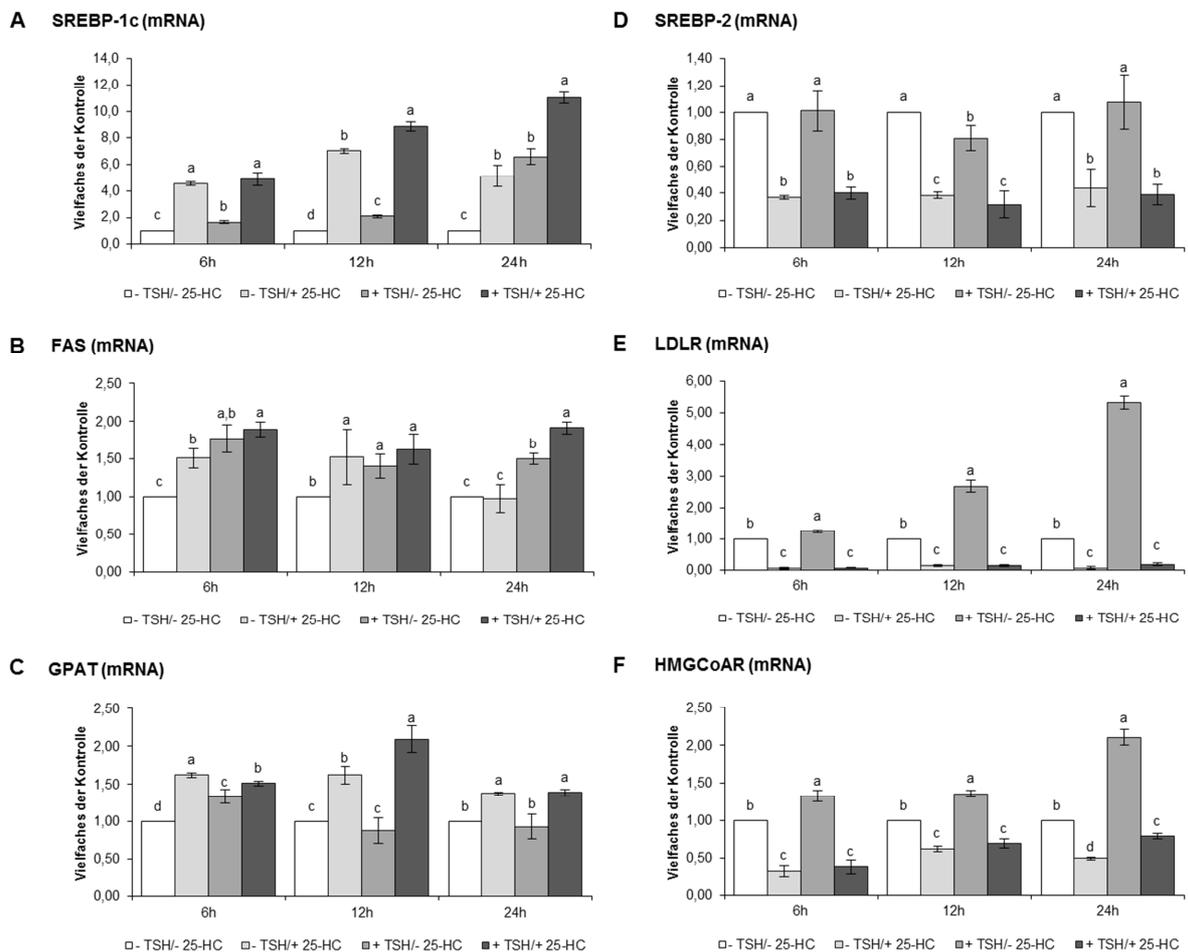


Abb. 11 A-F: Effekt einer Behandlung mit 10 mU/ml TSH und 5 μ M 25-HC über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP-2 und deren Zielgenen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- 25-HC) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.2.1.2 Einfluss von TSH und Cholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf

SREBP-1c

Die TSH-Behandlung führte auch bei diesem Versuch zu Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c ($P < 0,05$; Abb. 12A). Mit längerer Inkubationszeit nahmen die Steigerungsraten zu. Das Maximum war nach 24 h mit einem Anstieg auf das ca. 7,7-fache im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- Chol) erreicht ($P < 0,05$). Die Behandlung mit 5 μM Chol blieb bis auf die Inkubation über 12 h ohne Effekt. Bei der 12-stündigen Inkubation wurde durch Chol die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c in Ab- bzw. Anwesenheit von TSH auf das 1,4-fache bzw. 3,6-fache im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- Chol) gesteigert ($P < 0,05$).

FAS

Wie Abbildung 12B zeigt, wurde die relative mRNA-Konzentration der FAS infolge der TSH-Behandlung nach 6- und 12-stündiger Inkubationsdauer leicht auf das 1,4-fache im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- Chol) gesteigert ($P < 0,05$). Die 24-stündige TSH-Behandlung blieb ohne Effekt. Ebenso führte die Behandlung mit 5 μM Chol bei den hier betrachteten Zeitpunkten zu keinen Veränderungen der relativen mRNA-Konzentration der FAS.

GPAT

Für die GPAT konnten, mit Ausnahme der leichten Steigerung nach der 6-stündigen Inkubation ($P < 0,05$), keine Veränderungen der relativen mRNA-Konzentration durch eine TSH-Behandlung beobachtet werden (Abb. 12C). Ebenso bewirkte die Inkubation mit Chol lediglich nach 6-stündiger Inkubation in Abwesenheit von TSH eine gesteigerte relative mRNA-Konzentration der GPAT um das 1,2-fache im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$).

SREBP-2

Bei diesem Versuch bewirkte TSH nach 6-stündiger Inkubation eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 um ca. 50% im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- Chol) ($P < 0,05$; Abb. 12D). Nach 12- und 24-stündiger TSH-Behandlung konnten lediglich numerische Steigerungen um 13% und 28% beobachtet werden. Die Behandlung mit 5 μM Chol blieb ebenfalls ohne statistisch relevanten Effekt.

LDLR

Wie aus Abbildung 12E hervorgeht, bewirkte die TSH-Behandlung eine zeitabhängige Steigerung der relativen mRNA-Konzentration des LDLR ($P < 0,05$). Das Maximum war nach der Inkubation über 24 h mit einer Vervielfachung auf das 8,1-fache im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- Chol) erreicht ($P < 0,05$). Die Behandlung mit Chol führte in Abwesenheit

von TSH einzig nach 12 h zu einer verminderten relativen mRNA-Konzentration des LDLR auf das 0,87-fache im Vergleich zur Kontrolle(- TSH/- Chol) ($P < 0,05$). In Gegenwart des TSH wurden die Verminderungen nach der 6- bzw. 12-sündigen Inkubation beobachtet ($P < 0,05$).

HMGC α AR

Für die HMGC α AR konnten durch die TSH-Behandlung zu allen Zeitpunkten Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen auf das 1,95-fache bis 2,2-fache im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- Chol) beobachtet werden ($P < 0,05$; Abb. 12F). Die Behandlung mit Chol blieb in Abwesenheit von TSH ohne Effekt. In Gegenwart von TSH konnten dagegen Verminderungen der relativen mRNA-Konzentrationen der HMGC α AR infolge der Inkubation mit Chol auf das 1,7-fache (nach 6 h) und das 1,8-fache (nach 12 h) im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle (+ TSH/- Chol) beobachtet werden ($P < 0,05$).

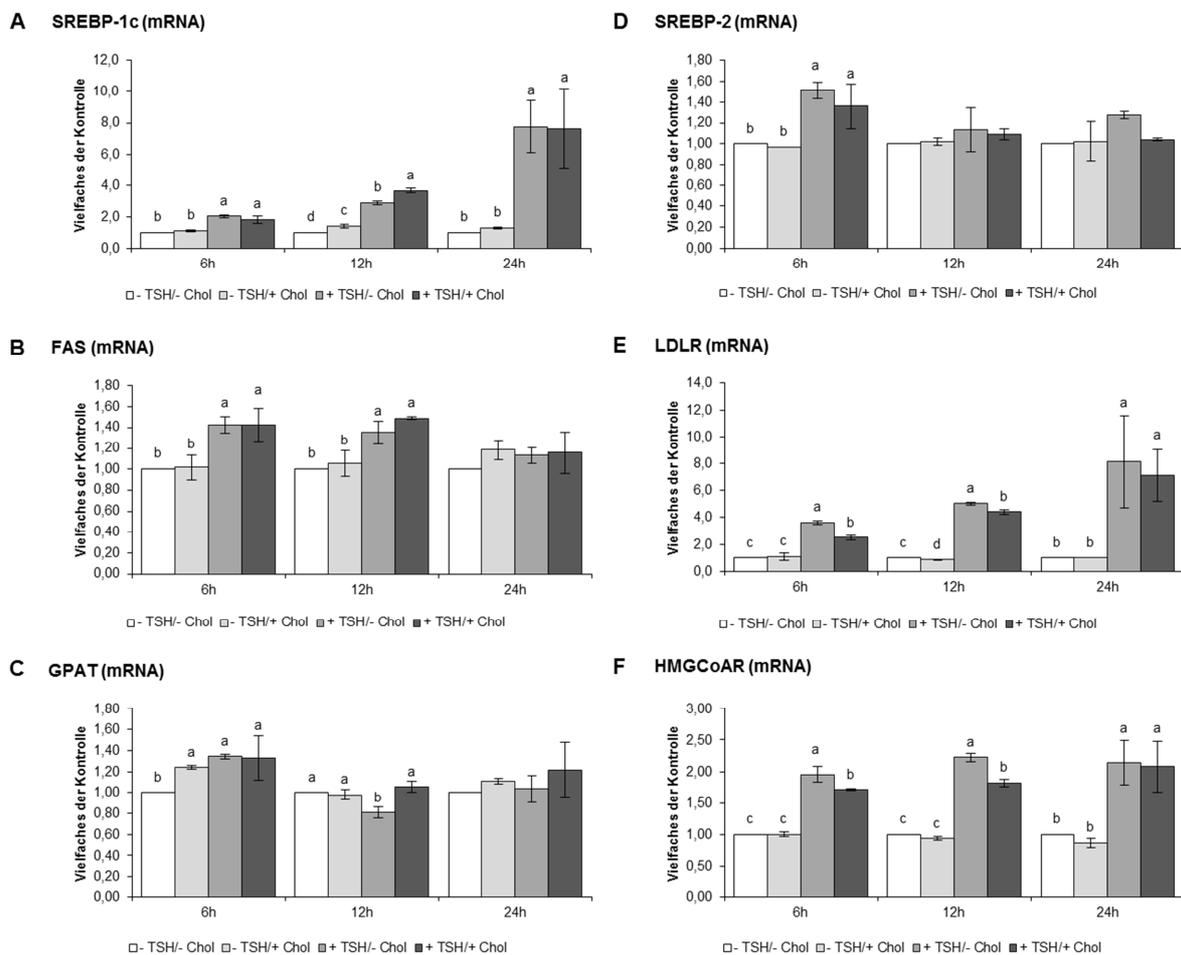


Abb. 12 A-F: Effekt einer Behandlung mit 10 mU/ml TSH und 5 μ M Cholesterol über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP-2 und deren Zielgenen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- Chol) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.3 Einfluss einer Behandlung mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol auf die Genexpression der SREBPs, der SREBP-Zielgene und von NIS und TPO in FRTL-5-Zellen

3.3.1 Inkubation mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol über 24 Stunden

3.3.1.1 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1

Wie Abb. 13A zu entnehmen ist, wurden durch die 24-stündige Behandlung mit Forskolin im Allgemeinen die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c gegenüber den relativen mRNA-Konzentrationen in Abwesenheit von Forskolin signifikant gesteigert ($P < 0,05$). Die relative mRNA-Konzentration der Kontrolle in Anwesenheit von Forskolin des SREBP-1c war dabei auf das 6-fache der mRNA-Konzentration der Kontrolle ohne Forskolinbehandlung gesteigert ($P < 0,05$). Das Oxysterol 25-HC bewirkte bei einer Konzentration von 5 μM in Abwesenheit von Forskolin eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c um das 4-fache im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$). In Gegenwart des Forskolin wurde dieser Effekt mit einer Steigerung um den Faktor 2 durch 5 μM 25-HC ($P < 0,05$) im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle ebenfalls beobachtet.

Betrachtet man dem gegenüber die Effekte einer Behandlung mit Chol und Forskolin (Abb 13B) zeigte sich, dass auch hier durch die 24-stündige Behandlung mit Forskolin die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c in Anwesenheit von Forskolin gegenüber den relativen mRNA-Konzentrationen in Abwesenheit von Forskolin gesteigert waren ($P < 0,05$). Die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c war dabei ebenfalls um den Faktor 6 im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($P < 0,05$). Dieser Inkubationsversuch bestätigt damit den Effekt des Inkubationsversuches mit Forskolin und 25-HC (Abb. 13A). Unabhängig davon konnten durch die Behandlung mit 1 μM und 5 μM Chol dosisabhängige Zunahmen der relativen mRNA-Konzentrationen in Anwesenheit von Forskolin beobachtet werden ($P < 0,05$). Es zeigte sich aber, dass die maximale Steigerung der relativen mRNA-Konzentration durch die Behandlung mit Forskolin und 5 μM Chol kleiner ist, als durch die Behandlung mit Forskolin und 5 μM 25-HC (Vgl. Abb. 13A Säule 6 und Abb. 13B Säule 6). In Abwesenheit von Forskolin blieb die Behandlung mit Chol ohne Effekt.

In Abb. 13C sind die Effekte des Inkubationsversuches mit Forskolin und 25-HC bzw. Chol auf die relative Proteinkonzentration des SREBP-1-Precursors dargestellt. Daraus geht hervor, dass die relative Proteinkonzentration durch Forskolin um das 2,3-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde ($P < 0,05$). In Abwesenheit von Forskolin führte die Behandlung

mit 5 μM 25-HC zu einer gesteigerten relativen Proteinkonzentration der Precursorform auf das 1,3-fache ($P < 0,05$; Abb. 13C).

Wie aus Abb. 13D hervorgeht, konnte die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 durch Forskolin um das ca. 76-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden ($P < 0,05$). Bei diesem Versuch führte 25-HC in Gegenwart von Forskolin zu Verminderungen der aktiven Form des SREBP-1c um den Faktor 76 ($P < 0,05$). Die relativen Proteinkonzentrationen in Abwesenheit von Forskolin wurden durch 25-HC auf das 0,1-fache und durch Chol auf das 0,2-fache der relativen Proteinkonzentration der gruppeninternen Kontrolle reduziert ($P < 0,05$; Abb. 13D).

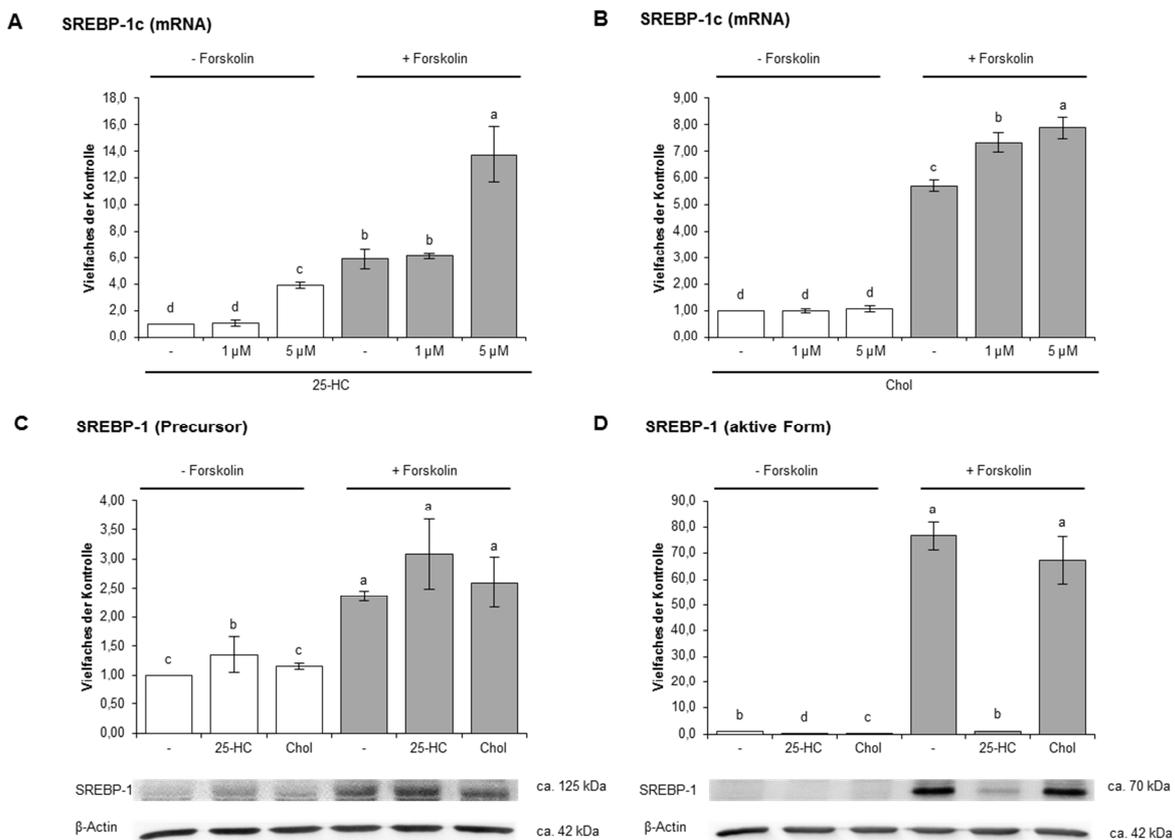


Abb. 13: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- Sterol); **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c nach Behandlung mit 25-HC und Forskolin; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c nach Behandlung mit Chol und Forskolin; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **C.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-1 nach Behandlung mit 5 μM 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **D.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 nach Behandlung mit 5 μM 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.3.1.2 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c

Die Forskolinbehandlung führte zu keinen Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration von FAS, SCD und GPAT im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 14). In Abwesenheit von Forskolin blieben auch die relativen mRNA-Konzentrationen von SCD und GPAT durch 25-HC unbeeinflusst. Einzig die relative mRNA-Konzentration der FAS wurde durch 1 bzw. 5 μM 25-HC leicht um 27% bzw. 35% vermindert ($P < 0,05$), wenngleich die Dosisabhängigkeit nicht signifikant war. In der Gegenwart von Forskolin konnten ebenfalls Verminderungen der relativen mRNA-Konzentration der FAS beobachtet werden ($P < 0,05$). Die relative mRNA-Konzentration der SCD blieb durch 25-HC erneut unbeeinflusst. Die relative mRNA-Konzentration der GPAT wurde durch die Behandlung mit 5 μM 25-HC unter Forskolinzusatz im Vergleich zur Kontrolle gesteigert ($P < 0,05$).

Tab. 14: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c.

25-HC	-Forskolin			+Forskolin		
	-	1 μM	5 μM	-	1 μM	5 μM
FAS	1,00 \pm 0,00 ^a	0,73 \pm 0,01 ^{b,c}	0,66 \pm 0,09 ^c	0,86 \pm 0,04 ^{a,b}	0,61 \pm 0,08 ^c	0,62 \pm 0,08 ^c
SCD	1,00 \pm 0,00	2,04 \pm 0,74	2,14 \pm 1,41	3,24 \pm 2,33	3,41 \pm 2,15	4,60 \pm 4,09
GPAT	1,00 \pm 0,00 ^b	0,98 \pm 0,03 ^b	1,02 \pm 0,27 ^b	1,34 \pm 0,20 ^b	1,50 \pm 0,21 ^b	2,07 \pm 0,28 ^a

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- 25-HC); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

Bei der Inkubation mit Chol und Forskolin (Tab. 15) konnte einzig bei der SCD eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration um das 2,4-fache durch Forskolin beobachtet werden ($P < 0,05$). In Abwesenheit von Forskolin konnten die Behandlungen mit 1 μM und 5 μM Chol bei keinem der Zielgene Veränderungen der relativen mRNA-Konzentrationen bewirken. Hingegen konnten in Anwesenheit von Forskolin numerische Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene SCD und GPAT durch Chol im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle beobachtet werden. Die relative mRNA-Konzentration der FAS blieb auch in dieser Behandlungsgruppe unbeeinflusst.

Tab. 15: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c.

Chol	-Forskolin			+Forskolin		
	-	1 μ M	5 μ M	-	1 μ M	5 μ M
FAS	1,00 \pm 0,00	1,03 \pm 0,03	0,94 \pm 0,09	1,10 \pm 0,24	1,00 \pm 0,02	0,98 \pm 0,04
SCD	1,00 \pm 0,00 ^c	1,18 \pm 0,20 ^{b,c}	0,89 \pm 0,10 ^c	2,44 \pm 1,19 ^{a,b}	2,91 \pm 0,53 ^a	2,36 \pm 0,12 ^{a,b}
GPAT	1,00 \pm 0,00 ^{b,c}	0,93 \pm 0,07 ^c	1,07 \pm 0,07 ^{b,c}	1,22 \pm 0,19 ^{a,b}	1,35 \pm 0,03 ^a	1,44 \pm 0,04 ^a

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- Chol); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.3.1.3 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2

Die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 konnte durch die Behandlung mit Forskolin um 6% erhöht werden (P<0,05; Abb. 14A; Vgl. der Säulen 1 und 4). In Abwesenheit von Forskolin konnten durch die Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M 25-HC dosisabhängige Verminderungen der relativen mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (P<0,05). Diese Effekte wurden ebenfalls in Anwesenheit von Forskolin beobachtet (P<0,05).

Im Inkubationsversuch mit Chol und Forskolin, hier in Abb. 14B dargestellt, unterblieb eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 durch Forskolin. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung aus Abb. 14A, bei dem zwar eine signifikante, aber sehr geringe Steigerung der relativen mRNA-Konzentration ersichtlich ist. Außerdem zeigte sich, dass eine Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M Chol keine Auswirkungen auf die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 hatte (Abb. 14B). In Abwesenheit von Forskolin konnte durch 5 μ M Chol aber eine numerische Verminderung der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 auf das 0,7-fache im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

Beim Inkubationsversuch mit Forskolin konnte die relative Proteinkonzentration des SREBP-2-Precursors um das ca. 3-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden (P<0,05; Abb. 14C; Vgl. der Säulen 1 und 4). Weiterhin konnten in Abwesenheit von Forskolin Steigerungen der relativen Proteinkonzentrationen durch 25-HC auf das 1,6-fache und durch Chol auf das 2,4-fache der relativen Proteinkonzentration der Kontrolle festgestellt werden (P<0,05). In Gegenwart von Forskolin führte die Behandlung mit 25-HC zu einer Verminderung der relativen Proteinkonzentration gegenüber Kontrolle und Chol (P<0,05; Vgl. der Säulen 4 bis 6).

Die in Abb. 14D dargestellten Ergebnisse des Inkubationsversuches mit Forskolin und Sterolen auf die relative Proteinkonzentration des aktiven SREBP-2 bestätigten die Effekte des Inkubationsversuches mit TSH und Sterolen in Abb. 8D. Auch durch Forskolin konnte die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2 um das 2,2-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden ($P < 0,05$; Abb. 14D). Des Weiteren wurde das aktive SREBP-2 durch 25-HC auf das 0,2-fache in Abwesenheit von Forskolin im Vergleich zur Kontrolle vermindert ($P < 0,05$). In Gegenwart von Forskolin bewirkte 25-HC ebenfalls eine Reduktion ($P < 0,05$; Vgl. der Säulen 4 und 5). Chol bewirkte hingegen nur in Anwesenheit des Forskolin eine Verminderung der aktiven Form des SREBP-2 auf das 0,6-fache der relativen Proteinkonzentration der Kontrolle ($P < 0,05$). Es ist ersichtlich, dass auch bei diesem Inkubationsversuch die Potenz zur Verminderung der relativen Proteinkonzentration durch Chol geringer ist als durch 25-HC.

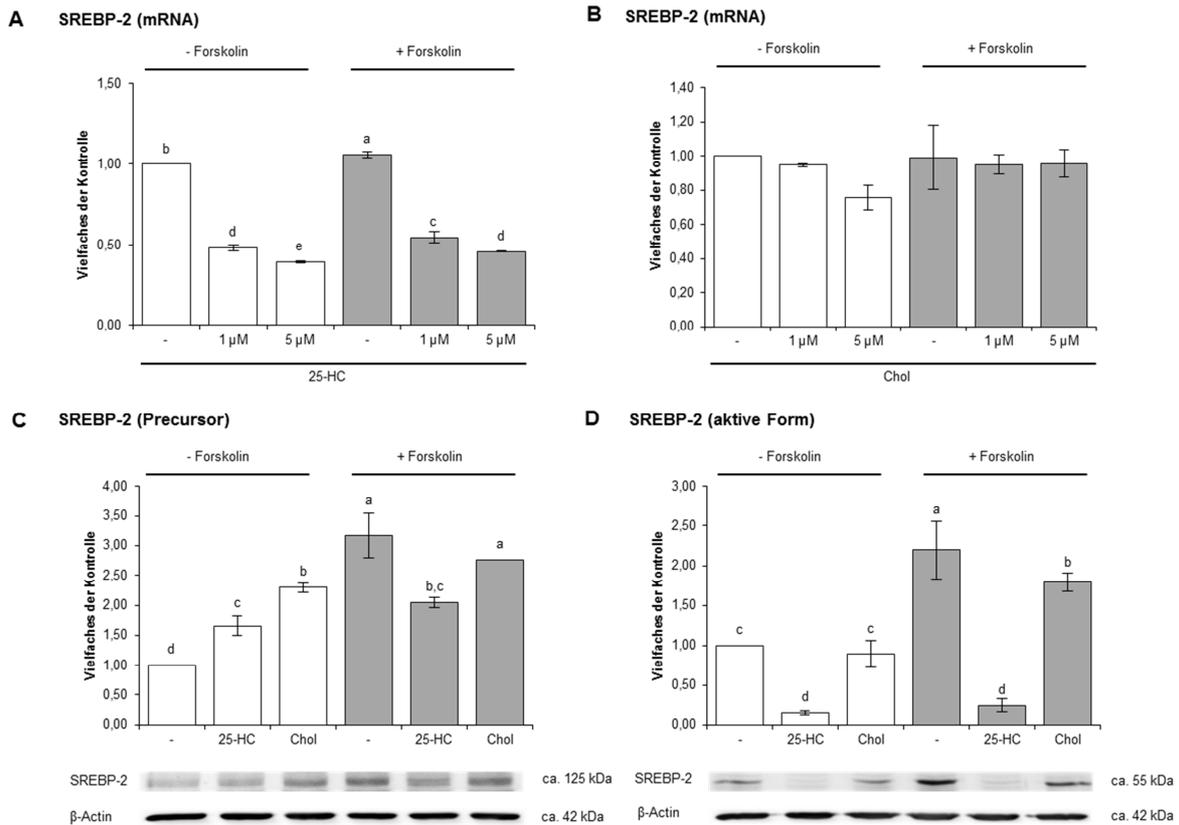


Abb. 14: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-2. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d,e} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P<0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- Sterol); **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 nach Behandlung mit 25-HC und Forskolin; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 nach Behandlung mit Chol und Forskolin; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **C.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2 nach Behandlung mit 5 μ M 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **D.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2 nach Behandlung mit 5 μ M 25-HC und Chol; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.3.1.4 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2

Im Gegensatz zu den Zielgenen des SREBP-1c konnten die relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGCoAR um den Faktor 2,4 bzw. 1,3 durch eine Behandlung mit Forskolin gesteigert werden ($P<0,05$; Tab. 16). Die relative mRNA-Konzentration der MK konnte nicht gesteigert werden. Die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBP-2-Zielgene stiegen durch die Forskolinbehandlung in geringerem Maße an, als durch die TSH-Behandlung (Vgl. Tab. 12). Die zusätzliche Behandlung mit 1 μ M und 5 μ M 25-HC konnte die relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGCoAR in

Abwesenheit von Forskolin vermindern ($P < 0,05$; Tab. 16). Auch in Gegenwart des Forskolin waren diese Reduktionen der relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGC α AR zu beobachten ($P < 0,05$), wenngleich die Verminderungen durch die Forskolinbehandlung abgeschwächt waren. Im Falle des LDLR konnte hier eine Dosisabhängigkeit beobachtet werden ($P < 0,05$). Gänzlich unbeeinflusst von der Forskolin- und 25-HC-Behandlung blieb die relative mRNA-Konzentration der MK (Tab. 16).

Tab. 16: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

25-HC	-Forskolin			+Forskolin		
	-	1 μ M	5 μ M	-	1 μ M	5 μ M
LDLR	1,00 \pm 0,00 ^b	0,11 \pm 0,01 ^d	0,10 \pm 0,01 ^d	2,43 \pm 0,10 ^a	0,46 \pm 0,04 ^c	0,14 \pm 0,01 ^d
HMGC α AR	1,00 \pm 0,00 ^b	0,46 \pm 0,02 ^{d,e}	0,38 \pm 0,01 ^d	1,33 \pm 0,19 ^a	0,73 \pm 0,02 ^c	0,62 \pm 0,08 ^{c,e}
MK	1,00 \pm 0,00	0,74 \pm 0,12	0,66 \pm 0,17	1,11 \pm 0,10	0,76 \pm 0,13	0,82 \pm 0,12

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- 25-HC); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

In Tabelle 17 sind die beobachteten Effekte einer Behandlung mit Chol und Forskolin für Zielgene des SREBP-2 aufgeführt. Daraus geht hervor, dass die relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGC α AR durch Forskolin um den Faktor 2,7 bzw. 1,6 im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden konnten ($P < 0,05$; Vgl. Spalte 1 und 4). Bei beiden Genen waren außerdem ganz allgemein die relativen mRNA-Konzentrationen in Anwesenheit von Forskolin gegenüber den relativen mRNA-Konzentrationen ohne Forskolinbehandlung erhöht ($P < 0,05$). Weiterhin konnten in Abwesenheit von Forskolin für den LDLR numerische Verminderungen der relativen mRNA-Konzentration auf das 0,8-fache durch 5 μ M Chol beobachtet werden. Für die HMGC α AR konnte eine maximale Reduktion auf das 0,67-fache durch 5 μ M Chol im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle beobachtet werden ($P < 0,05$). In Gegenwart von Forskolin konnten erst durch den Einsatz von 5 μ M Chol die relative mRNA-Konzentration des LDLR vermindert werden, wobei der Effekt nur numerisch war. Dagegen konnte für die HMGC α AR durch Chol keine Veränderung beobachtet werden. Wie schon öfter beobachtet, bleiben die Effekte des Chol auch hier wieder hinter den Effekten des 25-HC zurück (Vgl. Tab. 16). Die relativen mRNA-Konzentrationen der MK blieben durch die Behandlungen mit Cholesterolem und ohne bzw. mit Forskolin unbeeinflusst.

Tab. 17: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

Chol	-Forskolin			+Forskolin		
	-	1 μ M	5 μ M	-	1 μ M	5 μ M
LDLR	1,00 \pm 0,00 ^b	0,96 \pm 0,05 ^b	0,77 \pm 0,02 ^b	2,68 \pm 0,14 ^a	2,68 \pm 0,56 ^a	2,31 \pm 0,18 ^a
HMGCoAR	1,00 \pm 0,00 ^b	0,93 \pm 0,04 ^b	0,67 \pm 0,01 ^c	1,61 \pm 0,06 ^a	1,75 \pm 0,21 ^a	1,63 \pm 0,32 ^a
MK	1,00 \pm 0,00	0,92 \pm 0,06	0,95 \pm 0,02	1,02 \pm 0,16	0,94 \pm 0,15	0,82 \pm 0,05

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- 25-HC); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.3.1.5 Einfluss auf die Genexpression des NIS

Für die relative mRNA-Konzentration des NIS konnte durch die Forskolinbehandlung im Inkubationsversuch mit 25-HC (Abb. 15A) eine Erhöhung um den Faktor 9 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (P<0,05). Damit bewirkte Forskolin eine ähnlich starke Steigerung der relativen mRNA-Konzentration des NIS wie TSH (Abb. 9). Unabhängig davon wurde durch die Zugabe von 25-HC sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Forskolin die relative mRNA-Konzentration des NIS reduziert (P<0,05). Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an 25-HC blieb dabei ohne Effekt (Abb. 15A).

Die in Abb. 15B dargestellten Effekte stimmen im Wesentlichen mit den Effekten in Abb. 9B überein. Es zeigte sich, dass auch hier Behandlungen mit Chol zu keinen Veränderungen der relativen mRNA-Konzentrationen des NIS führen (Abb. 15B). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die relative mRNA-Konzentration durch Forskolin um das ca. 10-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde (P<0,05; Abb. 15B), und somit das Ergebnis aus Abb. 15A bestätigt, in der die relative mRNA-Konzentration durch Forskolin um den Faktor 9 gesteigert wurde.

Die Ergebnisse der mRNA-Ebene konnten durch die Beobachtungen im Western Blot bestätigt werden. Die in Abb. 15C dargestellten Ergebnisse zeigen eine allgemeine Steigerung der relativen Proteinkonzentration in Anwesenheit von Forskolin im Vergleich zu den relativen Proteinkonzentrationen, die ohne vorherige Forskolinbehandlung quantifiziert wurden, auf (P<0,05). Die relative Proteinkonzentration wurde dabei, unabhängig von der Sterolbehandlung, durch Forskolin auf das 1,7-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert (P<0,05; Vgl. der Säulen 1 und 4). Die zusätzliche Behandlung mit 25-HC bzw. Chol führte in Abwesenheit von Forskolin im Vergleich zur Kontrolle zu Reduktionen der relativen Proteinkonzentrationen des NIS um ca. 50% und 30% (P<0,05). In Gegenwart von Forskolin

wurden durch 25-HC numerische Verminderungen der relativen Proteinkonzentration es NIS beobachtet.

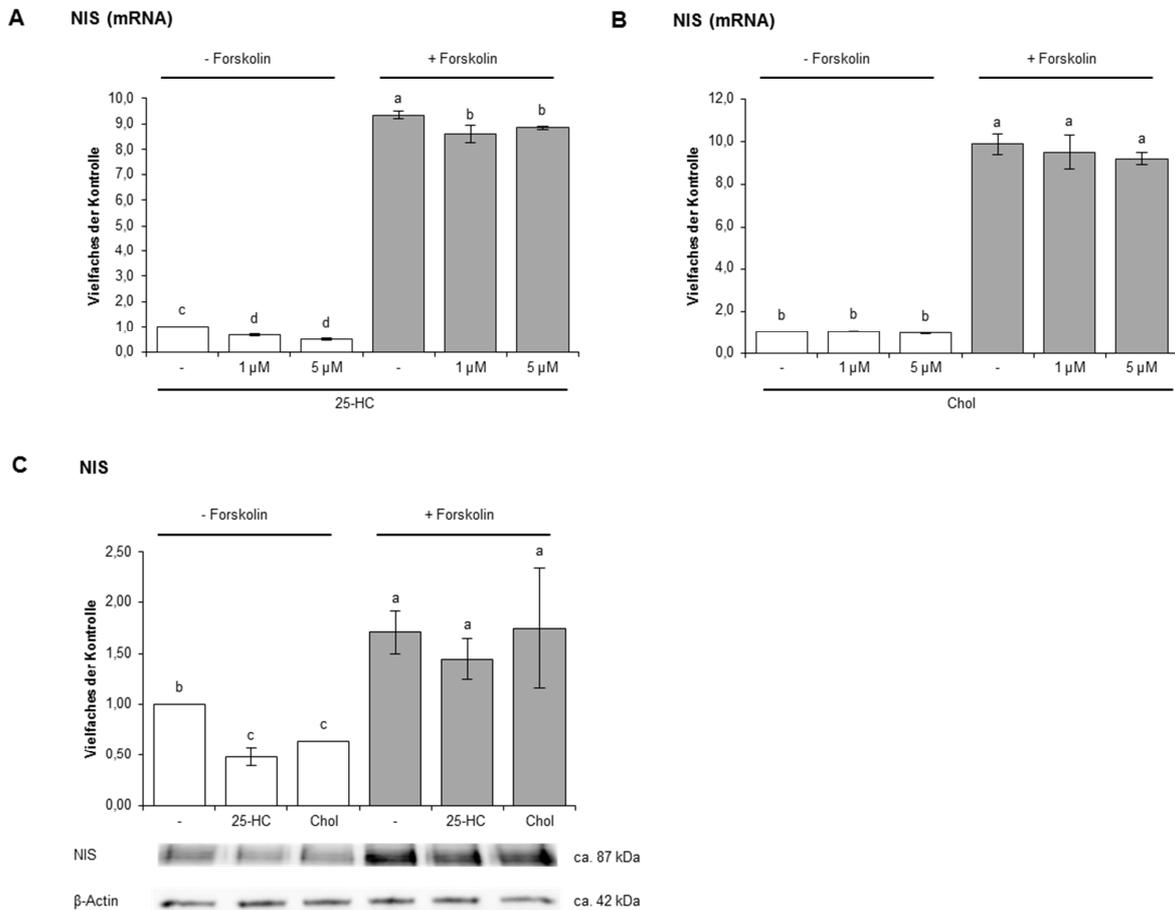


Abb. 15: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des NIS. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P<0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- Sterol); **A.** Relative mRNA-Konzentration des NIS nach Behandlung mit 25-HC und Forskolin; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative mRNA-Konzentration des NIS nach Behandlung mit Chol und Forskolin; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **C.** Relative Proteinkonzentration NIS; repräsentativer Blot des NIS sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.3.1.6 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration der TPO

Wie aus Abb. 16A zu entnehmen ist, führte eine Behandlung mit Forskolin zu einer Verminderung der relativen mRNA-Konzentration der TPO um 35% ($P<0,05$). Dies steht im Gegensatz zum Effekt des TSH, das eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration der TPO bewirkte (Abb. 10A). Unabhängig davon bewirkte in Abwesenheit von Forskolin die

Behandlung mit 1 μM und 5 μM 25-HC eine dosisabhängige Verminderungen der relativen mRNA-Konzentrationen um 40% und 60% im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$). In Gegenwart des Forskolin konnte einzig durch 5 μM 25-HC eine Verminderung der relativen mRNA-Konzentration gegenüber der gruppeninternen Kontrolle beobachtet werden ($P < 0,05$).

Die in Abb. 16B dargestellten Ergebnisse bestätigen die in Abb. 10B gemachten Beobachtungen hinsichtlich der Wirkung von Chol auf die relative mRNA-Konzentration der TPO. So konnten auch hier keine Veränderungen durch die Behandlung mit Chol in An- bzw. Abwesenheit von Forskolin festgestellt werden, unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Außerdem konnte auch hier Forskolin, im Gegensatz zum TSH (Abb. 10B), keine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration der TPO im Vergleich zur Kontrolle bewirken.

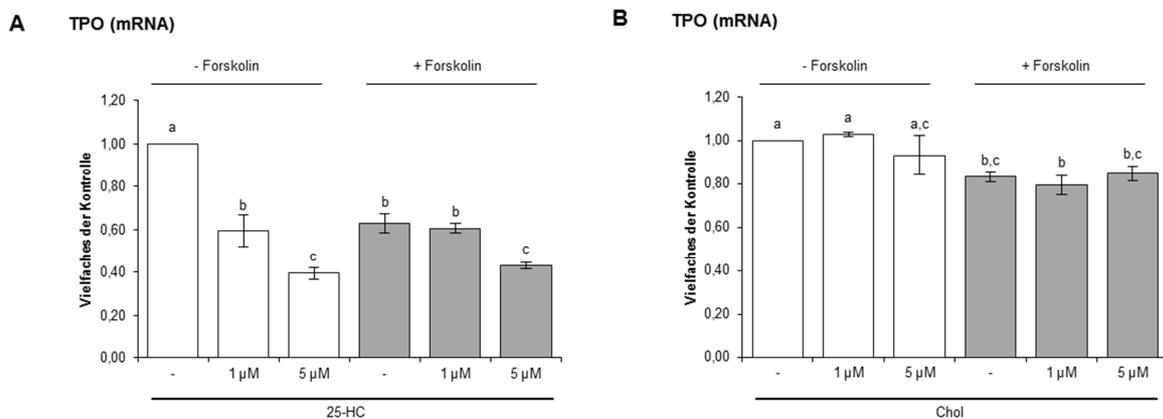


Abb. 16: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 25-HC bzw. Chol und 10 nmol/ml Forskolin auf die relative mRNA-Konzentration der TPO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- Sterol); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **A.** Relative mRNA-Konzentration der TPO nach Behandlung mit 25-HC und Forskolin; **B.** Relative mRNA-Konzentration der TPO nach Behandlung mit Chol und Forskolin.

3.3.2 Inkubation mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol im Zeitverlauf

Analog zum Inkubationsversuch im Zeitverlauf mit TSH und den Sterolen, wurden auch Versuche mit 5 μM 25-HC bzw. Chol in Ab- und Anwesenheit von 10 nmol/ml Forskolin in FRTL-5-Zellen durchgeführt. Auch hier wurden die Effekte auf die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und SREBP-2 sowie deren Zielgene FAS, GPAT, LDLR und HMGCoAR untersucht.

3.3.2.1 Einfluss von Forskolin und 25-Hydroxycholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf

SREBP-1c

Zunächst bewirkte die alleinige Behandlung der Zellen mit Forskolin Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c auf das 3,1-fache und 11,2-fache im Vergleich zur Kontrolle(- Fsk/ -25-HC) nach 12 und 24 h Inkubationsdauer ($P < 0,05$; Abb. 17A). Im Anschluss an eine 6-stündige Inkubation konnte die relative mRNA-Konzentration durch Forskolin lediglich numerisch auf das ca. 1,8-fache der Kontrolle gesteigert werden. Dagegen vermochte die Behandlung mit 5 μ M 25-HC in Ab- und Anwesenheit von Forskolin zu allen Zeitpunkten die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c zu steigern ($P < 0,05$). Die größten Veränderungen wurden nach der 24-stündigen Behandlung mit Steigerungen auf das ca. 10-fache in Abwesenheit und das 22-fache in Anwesenheit von Forskolin festgestellt ($P < 0,05$).

FAS

Wie aus Abbildung 17B hervorgeht, resultierte die Forskolinbehandlung erst nach 12- und 24-stündiger Inkubationsdauer in leicht gesteigerten relativen mRNA-Konzentrationen der FAS. Diese wurden auf das 1,3-fache und 2,2-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) gesteigert ($P < 0,05$). Darüber hinaus wurden infolge der 25-HC-Behandlung zusätzliche leichte Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen in Ab- und Anwesenheit von Forskolin nach 12 und 24 h beobachtet ($P < 0,05$). Die Behandlungen mit Forskolin und 25-HC blieben nach der 6-stündigen Inkubationszeit dagegen gänzlich ohne Effekt.

GPAT

Aus Abbildung 17C ist zu entnehmen, dass die Forskolinbehandlung einzig nach der 6-stündigen Inkubation zu einer geringen Steigerung der relativen mRNA-Konzentration der GPAT führt ($P < 0,05$). Dagegen bewirkte die Behandlung mit 25-HC zu allen Zeitpunkten leichte Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen der GPAT, sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Forskolin ($P < 0,05$).

SREBP-2

Für das SREBP-2 konnten nach 6- und 24-stündiger Inkubation mit Forskolin leichte Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) beobachtet werden ($P < 0,05$; Abb. 17D). In Abwesenheit von Forskolin wurde darüber hinaus die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 durch 25-HC zu allen Zeitpunkten auf das ca. 0,4- bis 0,5-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) vermindert ($P < 0,05$). In Anwesenheit von Forskolin wurde dieser Effekt bei der 6- und 24-stündigen Inkubation etwas

vermindert. Die relative mRNA-Konzentration wurde hier auf das 0,5- bis 0,6-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) vermindert ($P < 0,05$).

LDLR

Für den LDLR konnten durch Forskolin mit zunehmender Inkubationszeit zunehmende Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) beobachtet werden ($P < 0,05$; Abb. 17E). Das Maximum war nach 24 h mit einer Vervielfachung auf das 6,4-fache erreicht ($P < 0,05$). In Abwesenheit von Forskolin bewirkte 25-HC eine Verminderung der relativen mRNA-Konzentration auf das 0,05-fache (nach 6 h) bzw. das ca. 0,1-fache (nach 12 und 24 h) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) ($P < 0,05$). In Gegenwart von Forskolin wurde die relative mRNA-Konzentration weniger stark auf das 0,16-fache (nach 12 h) und das 0,25-fache (nach 24 h) im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) vermindert ($P < 0,05$).

HMGCoAR

Abbildung 17F zeigt, dass auch für die HMGCoAR die relative mRNA-Konzentration durch Forskolin mit ansteigender Inkubationsdauer zunehmend gesteigert wurde ($P < 0,05$), auf das maximal 2,1-fache nach 24 h. Außerdem wurde durch 25-HC zu allen Zeitpunkten in Ab- und Anwesenheit von Forskolin die relative mRNA-Konzentration der HMGCoAR gegenüber den jeweiligen gruppeninternen Kontrollen gesenkt ($P < 0,05$). Die Wirkung des 25-HC nahm mit fortschreitender Inkubationszeit ab, d.h. die relativen mRNA-Konzentrationen wurden weniger stark gesenkt.

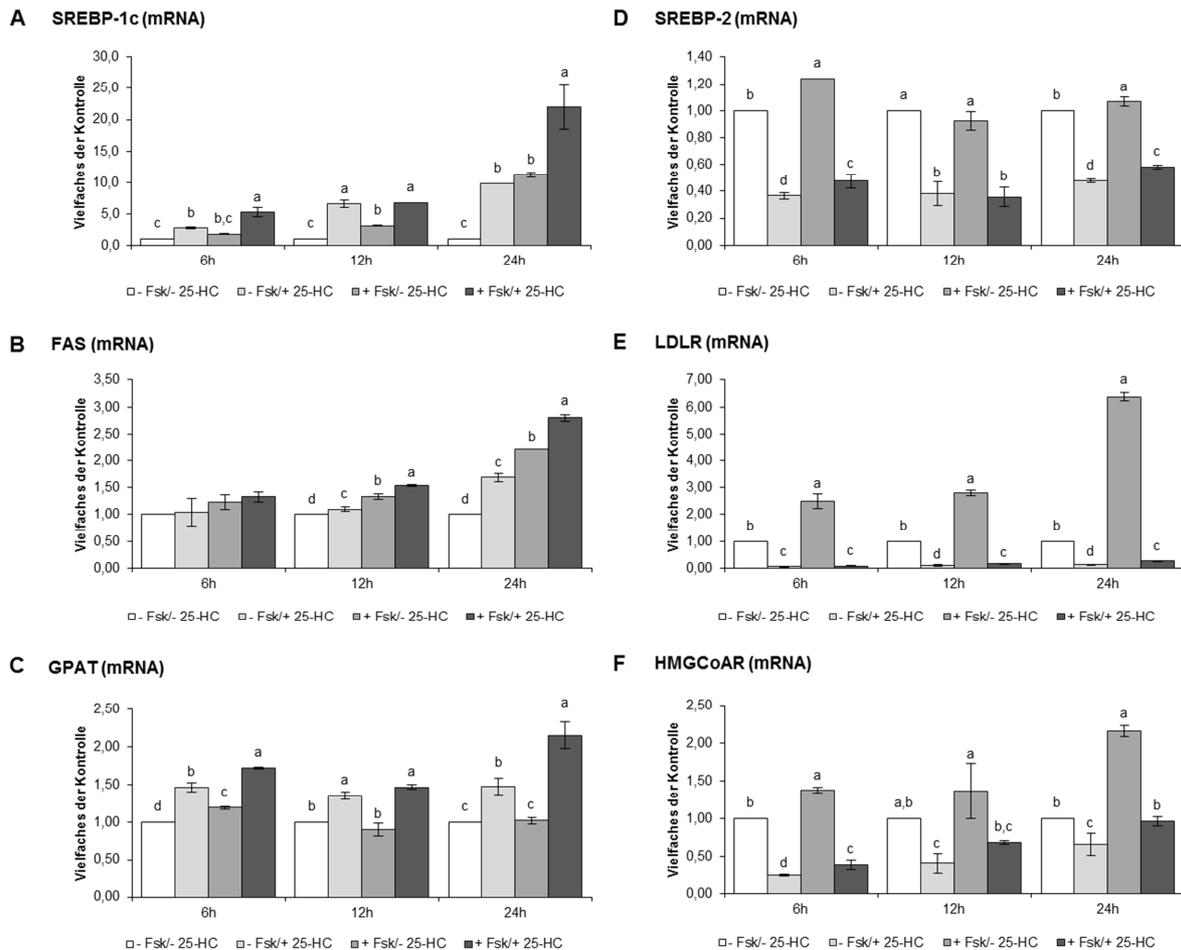


Abb. 17 A-F: Effekt einer Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin und 5 μ M 25-HC über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP-2 und deren Zielgenen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle (- Fsk/- 25-HC) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.3.2.2 Einfluss von Forskolin und Cholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene im Zeitverlauf

SREBP-1c

Zunächst wird aus Abbildung 18A ersichtlich, dass die alleinige Behandlung mit Forskolin eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c zu allen Zeitpunkten bewirkt (P<0,05). Das Maximum war nach der 24-stündigen Inkubation mit einer Steigerung auf das 10-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- Chol) erreicht (P<0,05). Die Behandlung mit Chol bewirkte dagegen nur in Anwesenheit von Forskolin nach 6- und 12-stündiger Inkubation eine Zunahme der relativen mRNA-Konzentration auf das 3,5-fache bzw. 4,5-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- Chol) (P<0,05).

FAS

Die relative mRNA-Konzentration der FAS wurde durch Forskolin im Zeitverlauf leicht im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (- Fsk/- Chol) gesteigert ($P < 0,05$; Abb. 18B). Im Gegensatz dazu blieb die Behandlung mit Chol bei allen untersuchten Zeitpunkten ohne Effekt auf die relative mRNA-Konzentration.

GPAT

Wie in Abbildung 18C dargestellt ist, bewirkte die Behandlung mit Forskolin erst nach 24 h eine geringe Steigerung der relativen mRNA-Konzentration auf das 1,4-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- Chol) ($P < 0,05$). Die Behandlung mit Chol führte zu keinen weiteren Veränderungen der relativen mRNA-Konzentration der GPAT.

SREBP-2

Auch für das SREBP-2 konnte erst nach 24-stündiger Forskolinbehandlung eine um das 1,24-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- Chol) gesteigerte relative mRNA-Konzentration beobachtet werden ($P < 0,05$; Abb. 18D). Nach 6- und 12-stündiger Inkubationszeit wurden lediglich numerische Steigerungen beobachtet. Chol bewirkte ebenso erst nach 24-stündiger Inkubation leichte Verminderungen der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 auf das jeweils ca. 0,85-fache im Vergleich zu den gruppeninternen Kontrollen (- Fsk/- Chol bzw. + Fsk/- Chol) ($P < 0,05$).

LDLR

Für den LDLR, dargestellt in Abbildung 18E, konnte erneut die steigernde Wirkung des Forskolin auf die relative mRNA-Konzentration beobachtet werden. Nach 6-, 12 und 24-stündiger Behandlungsdauer wurde die relative mRNA-Konzentration auf das 3,8-fache, 4,8-fache und 8,2-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- Chol) gesteigert ($P < 0,05$). Die Behandlung mit Chol blieb nach 6-stündiger Inkubation noch ohne Effekt. Nach der Inkubation über 12 und 24 h konnten dann in Ab- und Anwesenheit von Forskolin verminderte relative mRNA-Konzentrationen beobachtet werden ($P < 0,05$). Dabei wurde dieser Effekt in Gegenwart von Forskolin vermindert, blieb aber statistisch relevant.

HMGCoAR

Die relative mRNA-Konzentration der HMGCoAR konnte zu allen betrachteten Zeitpunkten durch Forskolin um das ca. 2-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- Chol) gesteigert werden ($P < 0,05$; Abb. 18F). Die Behandlung mit Chol blieb nach 6 h ohne weitere Effekte. Nach 12- bzw. 24-stündiger Behandlungszeit konnte Chol in Gegenwart von Forskolin die relativen mRNA-Konzentrationen im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle (+ Fsk/- Chol) auf das 1,8-fache bzw. 1,6-fache vermindern ($P < 0,05$). In Abwesenheit von Forskolin wurden

zu diesen Zeitpunkten lediglich numerische Verminderungen auf das 0,9-fache bzw. - 0,7-fache im Vergleich zur Kontrolle (- Fsk/- Chol) hervorgerufen.

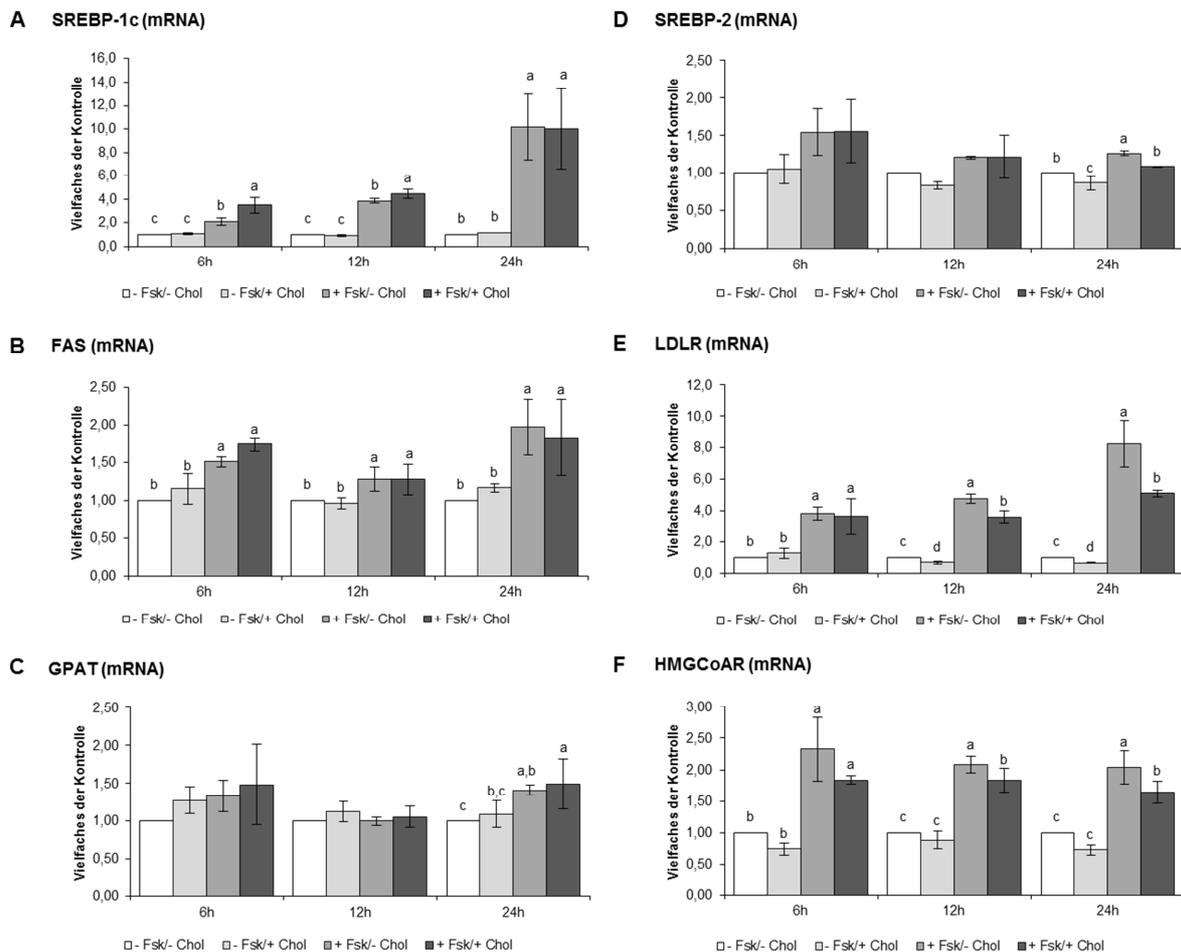


Abb. 18 A-F: Effekt einer Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin und 5 µM Cholesterol über 6, 12 und 24 h auf die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP-2 und deren Zielgenen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); a,b,c,d unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle (- Fsk/- Chol) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β-Actin-mRNA normalisiert.

3.4 Einfluss einer Behandlung mit TSH und 25-Hydroxycholesterol auf die Genexpression des SREBP-2, der Zielgene des SREBP-2 und von NIS in primären porcinen Thyreozyten

Um zu überprüfen ob die in der Zelllinie FRTL-5 gemachten Beobachtungen bezüglich einer möglichen Beeinflussung der Schilddrüsenhormonsynthese durch SREBPs auch in einem weiteren Untersuchungsmodell zu beobachten sind, wurden analog Versuche in primären porcinen Thyreozyten durchgeführt. Dieses Zellmodell erschien als besonders geeignet, da das Schwein zum Menschen eine große genetische Ähnlichkeit aufzeigt. Die in diesem

Zellmodell gemachten Beobachtungen können somit gut auf humane Schilddrüsenzellen übertragen werden.

Die isolierten Zellen wurden mit den gleichen Konzentrationen an TSH und Forskolin behandelt, wie die Vergleichszelllinie FRTL-5. Anders als die FRTL-5-Zellen wurden die Schweinethyreozyten aber nur mit 5 μ M 25-Hydroxycholesterol behandelt, da diese Behandlung in den Inkubationsversuchen mit FRTL-5 die stärksten Effekte zeigte. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von SREBP-2, der Zielgene des SREBP-2 und des NIS aufgeführt. Für das SREBP-1c, dessen Zielgene und die TPO konnten keine Daten erhoben werden, da deren Expression zu gering war und die mRNA-Konzentration mittels RTD-PCR nicht quantifiziert werden konnte. Aufgrund nicht vorhandener passender primärer Antikörper musste auch auf die Analyse der relativen Proteinkonzentration von SREBP-1 und NIS mittels Western Blot verzichtet werden.

3.4.1 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2

Auch in einer Primärkultur von porcinen Thyreozyten konnte eine gesteigerte relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 durch TSH festgestellt werden (Abb. 19A). Die relative mRNA-Konzentration war in den Schweinethyreozyten dabei um ca. 40% erhöht ($P < 0,05$). Auch die bereits beschriebene Wirkung des 25-HC, welches zu einer Reduktion der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-2 führt, konnte in diesem Versuch bestätigt werden. Verminderungen um 60% bzw. 50% im Vergleich zur Kontrolle waren hier zu beobachten ($P < 0,05$; Vgl. der Säulen 1, 2 und 4).

Die weiterführenden Untersuchungen mittels Western Blot zeigten, dass die relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2 (Abb. 19B) in primären Schweinethyreozyten durch die Behandlung mit 5 μ M 25-HC in Ab- bzw. Anwesenheit von TSH um ca. 45% bzw. 50% im Vergleich zur Kontrolle (- TSH/- 25-HC) vermindert wurde. Die TSH-Behandlung bewirkte einen Anstieg der Precursorform um 50%. Aufgrund der großen Streuung waren diese Effekte aber statistisch nicht relevant.

In Abb. 19C ist der Einfluss dieser Behandlung auf die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2 zu dargestellt. Hier konnte die relative Proteinkonzentration durch eine TSH-Behandlung gegenüber der Kontrolle verdoppelt werden ($P < 0,05$). Auch die Behandlung mit 5 μ M 25-HC konnte ihre Wirkung auf das SREBP-2 vermitteln. So konnte in Abwesenheit von TSH zunächst eine Reduktion um 50% gegenüber der Kontrolle beobachtet werden ($P < 0,05$). Dagegen konnte die relative Proteinkonzentration in Gegenwart von TSH durch 25-HC gegenüber der gruppeninternen Kontrolle um ca. 140% gesenkt werden ($P < 0,05$).

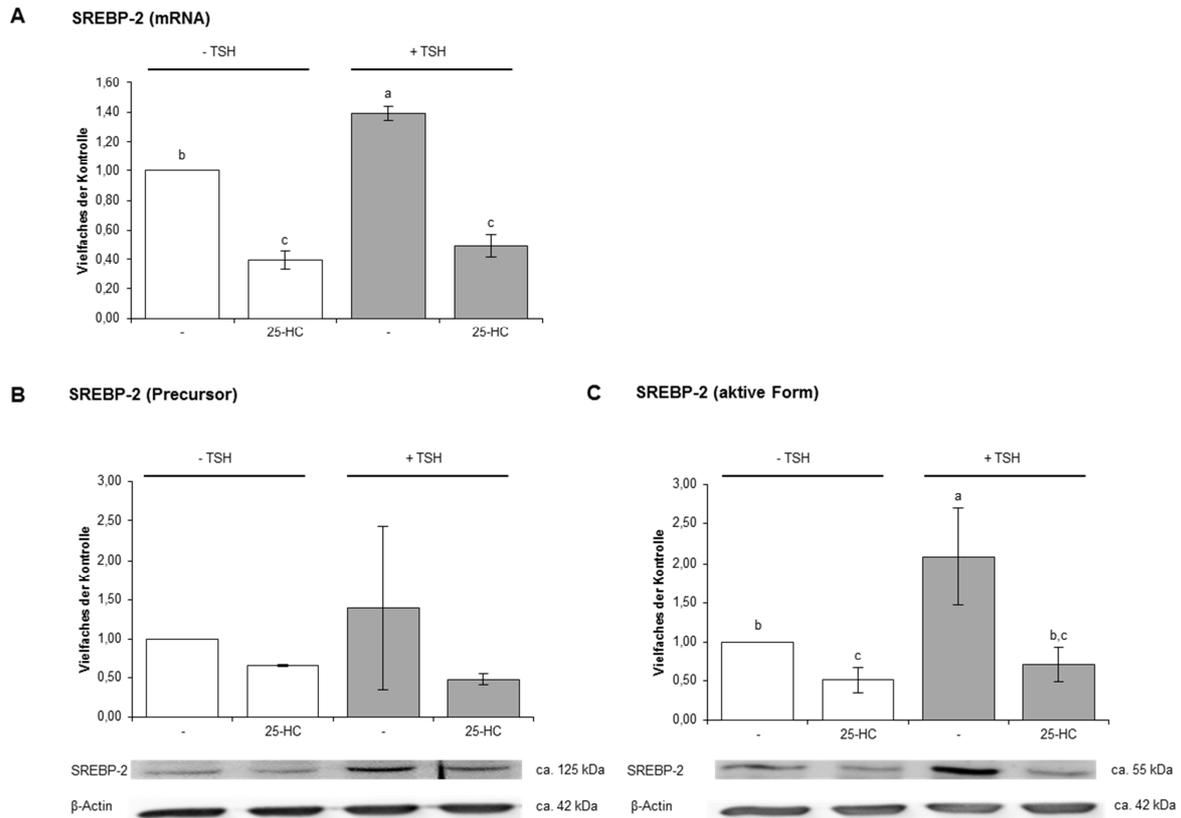


Abb. 19: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- 25-HC) wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der RPS9-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.4.2 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2

Die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2 wurden durch die Behandlungen mit TSH und 25-HC ähnlich beeinflusst wie die relative SREBP-2-mRNA-Konzentration. So wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGCoAR durch TSH um ca. 72% bzw. 47% im Vergleich zur Kontrolle gesteigert (p<0,05; Tab. 18). Die relative mRNA-Konzentration der MK blieb durch die TSH-Zugabe unbeeinflusst (Tab. 18). Unabhängig davon konnten durch die Behandlung mit 5 μ M 25-HC die relativen mRNA-Konzentrationen aller untersuchten Zielgene in beiden Behandlungsgruppen gesenkt werden (P<0,05). In Abwesenheit von TSH wurde die relative mRNA-Konzentration des LDLR um ca. 60%, die der HMGCoAR um ca. 80% und die der MK um ca. 70% im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden (P<0,05).

Tab. 18: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

25-HC	-TSH		+TSH	
	-	5 μ M	-	5 μ M
LDLR	1,00 \pm 0,00 ^b	0,42 \pm 0,09 ^c	1,72 \pm 0,08 ^a	0,43 \pm 0,02 ^c
HMGCoAR	1,00 \pm 0,00 ^b	0,21 \pm 0,02 ^c	1,47 \pm 0,20 ^a	0,24 \pm 0,07 ^c
MK	1,00 \pm 0,00 ^a	0,28 \pm 0,09 ^b	1,14 \pm 0,46 ^a	0,27 \pm 0,12 ^b

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- 25-HC) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der RPS9-mRNA normalisiert.

3.4.3 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration des NIS

Die relative mRNA-Konzentration des NIS wurde durch TSH auf das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert (P<0,05, Abb. 20), verglichen mit einer Steigerung um den Faktor 10 in der Vergleichszelllinie FRTL-5 (Abb. 9A). 25-HC konnte in Anwesenheit von TSH eine Verminderung der relativen mRNA-Konzentration des NIS im Vergleich zur gruppeninternen Kontrolle bewirken (P<0,05; Abb. 20). In Abwesenheit von TSH wurde die relative mRNA-Konzentration des NIS numerisch auf das 0,8-fache der Kontrolle gesenkt.

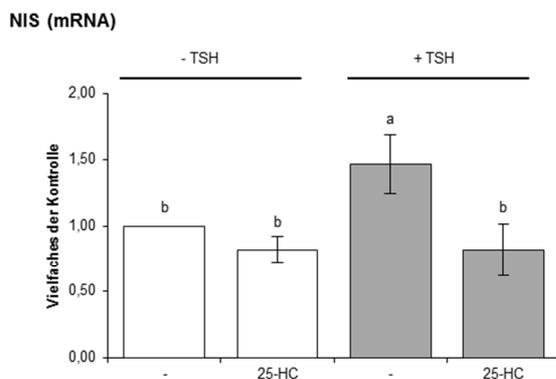


Abb. 20: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration des NIS. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- TSH/- 25-HC); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der RPS9-mRNA normalisiert.

3.5 Einfluss einer Behandlung mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol auf die Genexpression des SREBP-2, der Zielgene des SREBP-2 und von NIS in primären porcinen Thyreozyten

Analog zum Inkubationsversuch mit Forskolin und 25-Hydroxycholesterol bzw. Cholesterol in FRTL-5-Zellen wurde auch bei den Schweinethyreozyten überprüft, ob die durch TSH beobachtete Expressionssteigerung der SREBPs auf die Aktivierung der cAMP-Kaskade zurückzuführen sein könnte. Daher erfolgte auch bei diesen Zellen eine Behandlung mit 10 nmol/ml Forskolin.

3.5.1 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2

Analog zur Inkubation mit TSH bewirkt auch Forskolin eine gesteigerte relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 um ca. 12% im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$; Abb. 21A). Weiterhin konnte sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit von Forskolin der inhibierende Effekt des 25-HC auf die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 beobachtet werden. Die relativen mRNA-Konzentrationen konnten um 60% bzw. 70% im Vergleich zur Kontrolle vermindert werden ($P < 0,05$).

Auf Proteinebene konnte die relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2, hier in Abb. 21B dargestellt, um ca. 30% gegenüber der Kontrolle gesteigert werden ($P < 0,05$). Die Behandlung mit 25-HC führte in Abwesenheit und in Gegenwart von Forskolin zu Verminderungen der relativen Proteinkonzentration des SREBP-2-Precursors. Bezogen auf die Kontrolle (-Forskolin/ -25-HC) wurden die relativen Konzentrationen um ca. 30% und 50% gesenkt ($P < 0,05$; Abb.21B).

Die in Abb. 21C dargestellten Effekte zeigen, dass die Forskolinbehandlung die relative Proteinkonzentration des aktiven SREBP-2 unerwartet um ca. 40% gegenüber der Kontrolle gesenkt hat ($P < 0,05$). Die Behandlung mit 25-HC führte in Abwesenheit und Gegenwart von Forskolin zu den bereits bekannten Verminderungen der relativen Proteinkonzentration des aktiven SREBP-2 gegenüber den gruppeninternen Kontrollen ($P < 0,05$). Bezogen auf die Kontrolle (-Forskolin/ -25-HC) konnten Verminderungen um ca. 60% und 80% durch 25-HC beobachtet werden ($P < 0,05$).

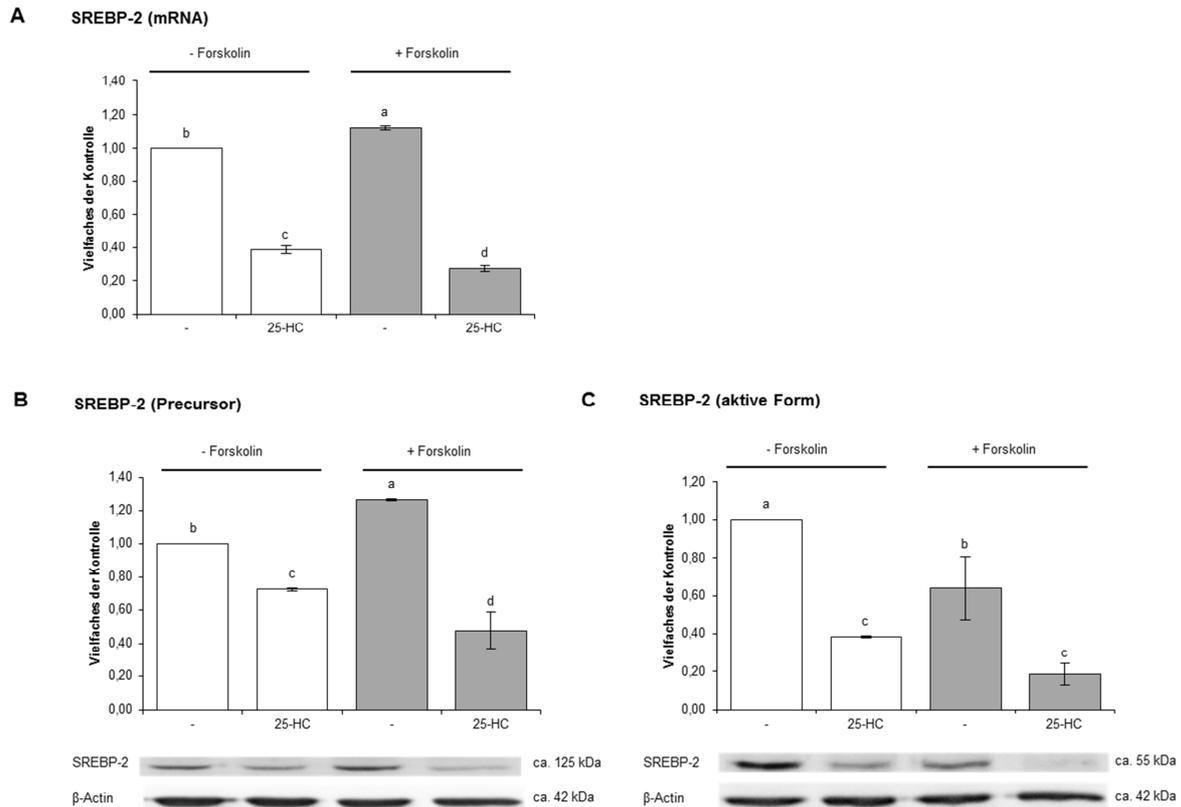


Abb. 21: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die Genexpression des SREBP-2. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- 25-HC); **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der RPS9-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-2 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.5.2 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2

Auch die Effekte des 25-HC auf die Zielgene des SREBP-2 wurden bei der Inkubation mit Forskolin in primären Schweinethyreozyten bestätigt (Tab. 19). Bei allen untersuchten Zielgenen konnte eine Reduktion der relativen mRNA-Konzentration nach Zugabe von 25-HC um ca. 70-80% im Vergleich zur Kontrolle in Abwesenheit und Gegenwart von Forskolin beobachtet werden (P<0,05). Eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration durch Forskolin konnte aber nur im Falle des LDLR um 22% im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (P<0,05). Die relativen mRNA-Konzentrationen von HMGCoAR und MK blieben durch die Forskolinbehandlung unbeeinflusst.

Tab. 19: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

25-HC	-Forskolin		+Forskolin	
	-	5 μ M	-	5 μ M
LDLR	1,00 \pm 0,00 ^b	0,30 \pm 0,07 ^c	1,22 \pm 0,10 ^a	0,25 \pm 0,02 ^c
HMGCoAR	1,00 \pm 0,00 ^a	0,25 \pm 0,06 ^b	1,01 \pm 0,11 ^a	0,17 \pm 0,04 ^b
MK	1,00 \pm 0,00 ^a	0,24 \pm 0,03 ^b	1,10 \pm 0,15 ^a	0,22 \pm 0,02 ^b

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- 25-HC); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der RPS9-mRNA normalisiert.

3.5.3 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration des NIS

Wie aus Abb. 22 zu ersehen ist, führte Forskolin zu einer gesteigerten relativen mRNA-Konzentration des NIS um ca. 50% (P<0,05). Die Behandlung mit 25-HC führte sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Forskolin nur zu numerischen, aber nicht signifikanten, Verminderungen der relativen mRNA-Konzentration.

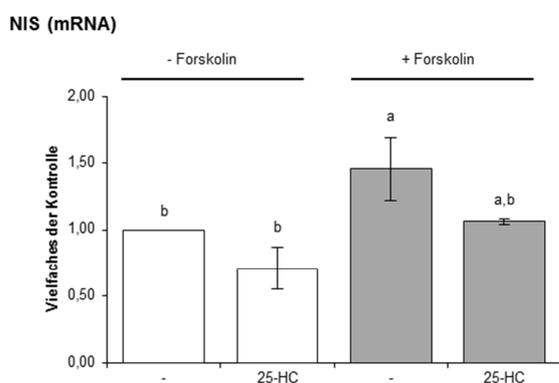


Abb. 22: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 5 μ M 25-HC und 10 nmol/ml Forskolin auf die relative mRNA-Konzentration des NIS. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- Forskolin/- 25-HC); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der RPS9-mRNA normalisiert.

3.6 Einfluss einer Behandlung mit TSH und WY 14,643 auf die Genexpression der SREBPs, der SREBP-Zielgene und von NIS und TPO in FRTL-5-Zellen

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob durch eine Aktivierung des PPAR α die Genexpression der SREBPs und ihrer Zielgene sowie von NIS und TPO beeinflusst werden kann. Die Aktivierung des PPAR α erfolgte durch die Behandlung der Zellen mit 100 μ M WY 14,643, einem synthetischen PPAR α -Agonisten. Durch eine zusätzliche Behandlung mit TSH sollten mögliche additive Effekte hinsichtlich der PPAR α -Aktivierung analysiert werden. Ziel war es, die zu Beginn der Arbeit formulierte Hypothese zu bestätigen, dass über eine Aktivierung des PPAR α die Transkription und letztlich die Konzentration der aktiven Formen der SREBPs gesteigert wird und somit auch die für die Schilddrüsenhormonsynthese bedeutsamen Proteine NIS und TPO in ihrer Expression beeinflusst werden.

3.6.1 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration des CPT-1a

Um die Aktivierung des PPAR α durch WY 14,643 in FRTL-5-Zellen zu belegen, wurde die relative mRNA-Konzentration des CPT-1a, einem Zielgen des PPAR α , bestimmt. Die in Abb. 23 dargestellten Ergebnisse zeigen die Steigerung der relativen mRNA-Konzentrationen der CPT-1a in Abwesenheit und Anwesenheit des TSH um ca. 34% bzw. 48% durch WY 14,643 auf ($P < 0,05$). Gleichzeitig ist zu erkennen, dass die relative mRNA-Konzentration des CPT-1a durch die TSH-Behandlung gänzlich unbeeinflusst blieb, d.h. es konnte keine weitere Steigerung der relativen mRNA-Konzentration beobachtet werden.

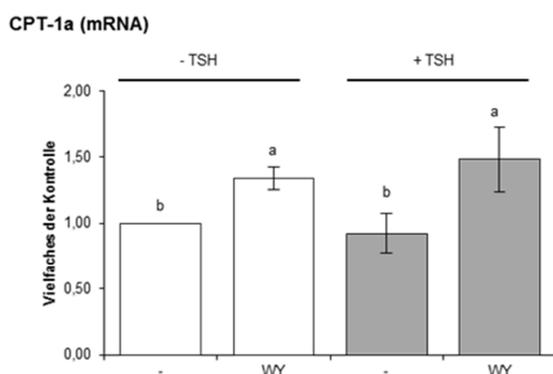


Abb. 23: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration des CPT-1a. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- TSH/- WY); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.6.2 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-1

Bei diesem Inkubationsversuch konnte die Beobachtung gemacht werden, dass durch TSH die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c auf das 4-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde ($P < 0,05$; Abb. 24A). Darüber hinaus wurde infolge der Behandlung mit WY 14,643 in Anwesenheit von TSH eine zusätzliche Steigerung der relativen mRNA-Konzentration beobachtet. In Abwesenheit von TSH führte WY 14,643 zu einer Steigerung der relativen mRNA-Konzentration auf das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$).

Wie in Abb. 24B zu erkennen ist, konnte die relative Proteinkonzentration des SREBP-1-Precursors weder durch eine Behandlung mit TSH, noch durch den Zusatz von WY 14,643 beeinflusst werden. Es konnten lediglich numerische Steigerungen beobachtet werden. Betrachtet man nun die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 in Abb. 24C kann man feststellen, dass die mittels PCR-Analyse erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden konnten. So ist zunächst eine Steigerung der relativen Proteinkonzentration des aktiven SREBP-1 durch TSH um das 60-fache gegenüber der Kontrolle zu erkennen ($P < 0,05$). Außerdem ist der Abbildung zu entnehmen, dass durch WY 14,643 in Ab- und Anwesenheit von TSH die relativen Proteinkonzentrationen des aktiven SREBP-1 gegenüber den Kontrollen (ohne und mit TSH) zusätzlich gesteigert wurden ($P < 0,05$).

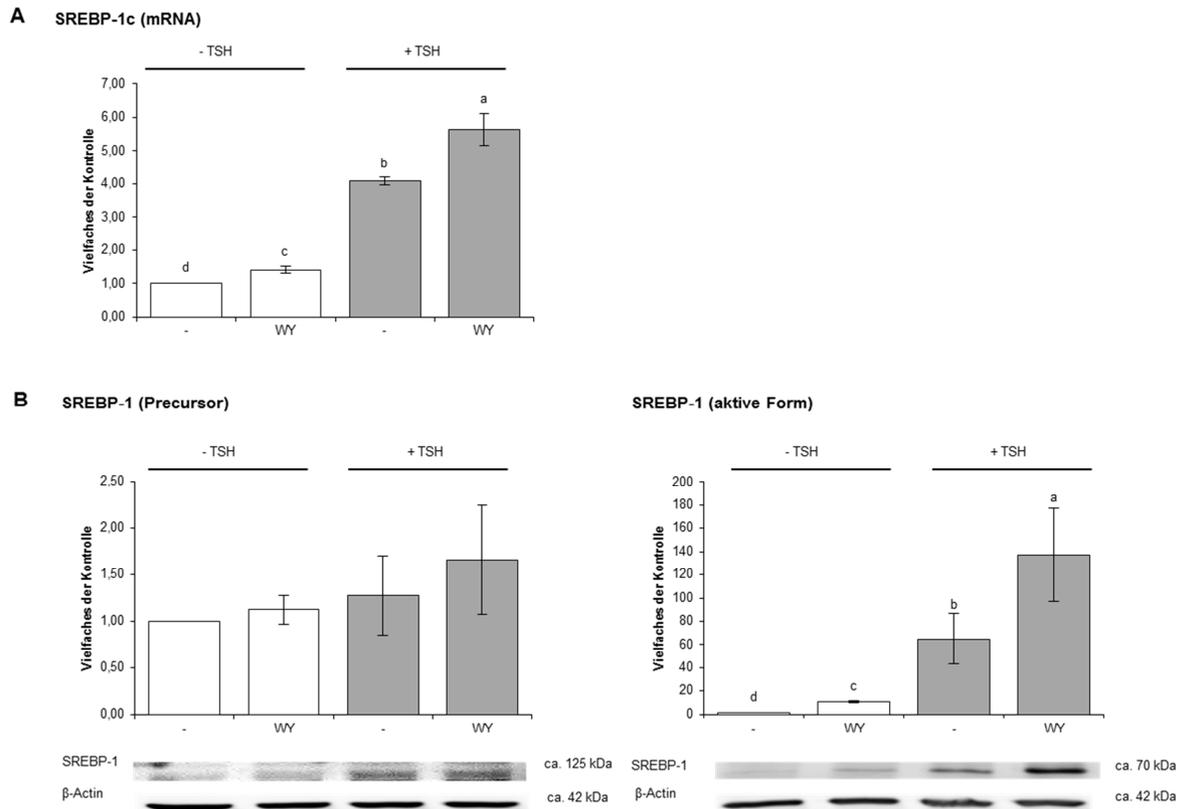


Abb. 24: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- TSH/- WY); **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c nach Behandlung mit 100 μ M WY und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-1; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-1 sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.6.3 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-1c

Durch TSH konnte die relative mRNA-Konzentration der FAS gegenüber der Kontrolle leicht um ca. 61% gesteigert werden (P<0,05; Tab. 20). Unabhängig davon konnte durch WY 14,643 nur in Abwesenheit von TSH eine geringe Steigerung der relativen mRNA-Konzentration der FAS um ca. 23% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (P<0,05). Für die SCD ergaben sich durch die Behandlungen mit WY 14,643 und TSH Verminderungen der relativen mRNA-Konzentration. Die GPAT blieb unbeeinflusst (Tab. 20).

Tab. 20: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 µM WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-1c.

	-TSH		+TSH	
	-	WY	-	WY
FAS	1,00 ± 0,00 ^c	1,23 ± 0,02 ^b	1,61 ± 0,07 ^a	1,16 ± 0,11 ^b
SCD	1,00 ± 0,00 ^a	0,75 ± 0,04 ^b	0,68 ± 0,11 ^b	0,63 ± 0,03 ^b
GPAT	1,00 ± 0,00	0,93 ± 0,07	0,99 ± 0,21	1,17 ± 0,37

Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- TSH/- WY); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β-Actin-mRNA normalisiert.

3.6.4 Einfluss auf die Genexpression des SREBP-2

Wie Abb. 25A zeigt blieb die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 durch die Behandlungen mit TSH und WY 14,643 unbeeinflusst.

Auch auf Proteinebene bestätigen sich die Ergebnisse der mRNA-Ebene insoweit, als dass auch auf Proteinebene die relative Proteinkonzentration des aktiven SREBP-2 durch TSH nicht gesteigert wurde (Abb. 25C). Dafür konnte in Abwesenheit von TSH eine Steigerung der relativen Proteinkonzentration der aktiven Form um ca. 40% durch WY 14,643 gegenüber der Kontrolle aufgezeigt werden (P<0,05). In Gegenwart von TSH konnte dieser Effekt des WY 14,643 nicht beobachtet werden.

Für die Precursorform des SREBP-2 konnte eine Steigerung der relativen Proteinkonzentration durch TSH um 160% gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (P<0,05; Abb. 25B). Durch die zusätzliche Behandlung mit WY 14,643 konnte in Abwesenheit des TSH eine Erhöhung der relativen Proteinkonzentration um ca.75% im Vergleich zur Kontrolle bewirkt werden (P<0,05).

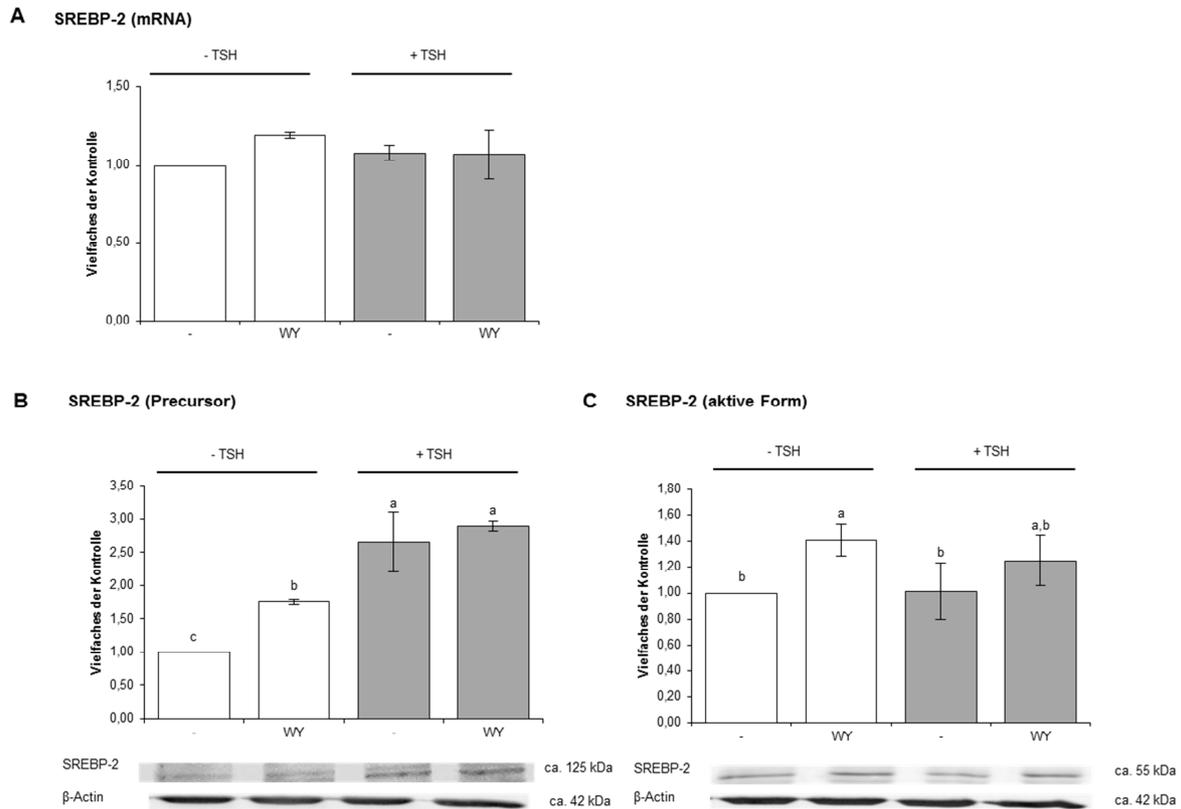


Abb. 25: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 µM WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des SREBP-2. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten (n=3); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren (P<0,05; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- TSH/- WY); **A.** Relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 nach Behandlung mit 100 µM WY und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β-Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration der Precursorform des SREBP-2; repräsentativer Blot der Precursorform des SREBP-2 sowie des β-Actin aus einem unabhängigen Experiment; **C.** Relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2; repräsentativer Blot der aktiven Form des SREBP-2 sowie des β-Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.6.5 Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2

Die Untersuchung der relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene des SREBP-2 ergaben für LDLR und HMGCoAR durch TSH Steigerungen auf das ca. 2,5-fache bzw. auf das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle (P<0,05; Tab. 21). Die MK blieb in diesem Zusammenhang von der TSH-Behandlung unbeeinflusst. Unabhängig davon konnte in Abwesenheit von TSH die relative mRNA-Konzentration des LDLR durch WY 14,643 auf das 1,7-fache der Kontrolle gesteigert werden (P<0,05). Für HMGCoAR und MK konnten keine WY-Effekte beobachtet werden. In Gegenwart von TSH bewirkte WY 14,643 erneut einen Anstieg der relativen mRNA-Konzentration des LDLR (P<0,05). Gegenteilig dazu wurden im Falle der

HMGCoAR und MK durch WY 14,643 die relativen mRNA-Konzentrationen leicht vermindert ($P < 0,05$).

Tab. 21: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des SREBP-2.

Gen	-		WY	
	-TSH		+TSH	
LDLR	1,00 \pm 0,00 ^d	1,70 \pm 0,20 ^c	2,46 \pm 0,50 ^b	3,67 \pm 0,47 ^a
HMGCoAR	1,00 \pm 0,00 ^c	1,10 \pm 0,12 ^c	1,52 \pm 0,05 ^a	1,32 \pm 0,01 ^b
MK	1,00 \pm 0,00 ^a	0,92 \pm 0,04 ^{a,b}	0,95 \pm 0,08 ^a	0,81 \pm 0,05 ^b

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c,d} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P < 0,05$; Fisher Test); Kontrolle wurde 1 gesetzt (- TSH/- WY); die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

3.6.6 Einfluss auf die Genexpression des NIS

Wie aus Abb. 26A hervorgeht, wurde die relative mRNA-Konzentration des NIS durch TSH gegenüber der Kontrolle um das ca. 3,3-fache gesteigert ($P < 0,05$). Darüber hinaus ist zu erkennen, dass in Abwesenheit von TSH die relative mRNA-Konzentration des NIS durch WY 14,643 auf das 1,4-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde ($P < 0,05$).

Auch auf Proteinebene konnte die relative Proteinkonzentration des NIS durch TSH auf das 1,8-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden ($P < 0,05$; Abb. 26B). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass hier der synthetische PPAR α -Agonist WY 14,643 die relative Proteinkonzentration des NIS beeinflusst. In Abwesenheit von TSH wurde die relative Proteinkonzentration des NIS auf das 1,6-fache der Kontrolle gesteigert ($P < 0,05$). In Gegenwart des TSH konnte durch WY 14,643 dagegen keine weitere Steigerung der relativen Proteinkonzentration des NIS beobachtet werden.

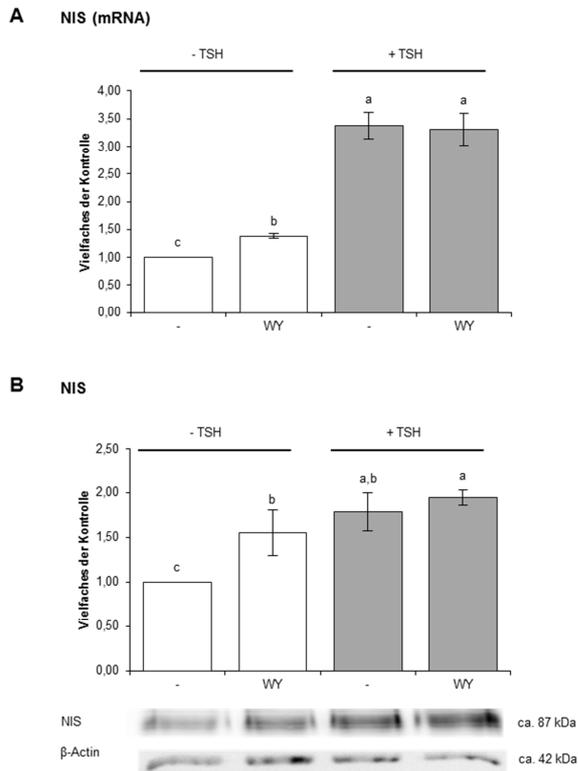


Abb. 26: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die Genexpression des NIS. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); ^{a,b,c} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen; Signifikanz der Faktoren ($P<0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/- WY) wurde 1 gesetzt; **A.** Relative mRNA-Konzentration des NIS nach Behandlung mit 100 μ M WY und TSH; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert; **B.** Relative Proteinkonzentration des NIS; repräsentativer Blot des NIS sowie des β -Actin aus einem unabhängigen Experiment.

3.6.7 Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration der TPO

In Abb. 27 ist die relative mRNA-Konzentration der TPO dargestellt. Diese blieb durch die Behandlungen mit WY 14,643 und auch TSH unbeeinflusst.

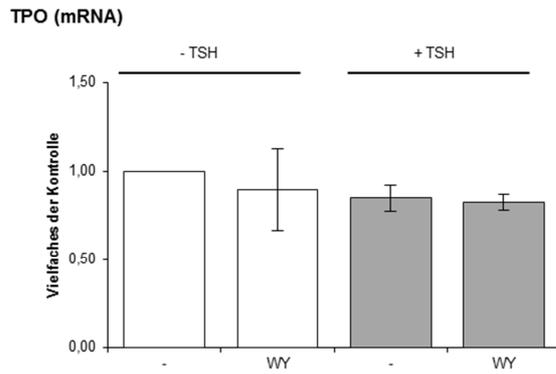


Abb. 27: Effekt einer 24-stündigen Behandlung mit 100 μ M WY 14,643 und 10 mU/ml TSH auf die relative mRNA-Konzentration der TPO. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus 3 unabhängigen Experimenten ($n=3$); Signifikanz der Faktoren ($P<0,05$; Fisher Test); Kontrolle (- TSH/-WY) wurde 1 gesetzt; die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime-detection*-PCR quantifiziert und mit der Konzentration der β -Actin-mRNA normalisiert.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der SREBPs für die Schilddrüsenhormonsynthese

Mit der Identifizierung einer neuen Transkriptionsfaktorfamilie vor fast zwanzig Jahren gelang der Durchbruch in der Erforschung der molekularen Regulationsmechanismen der Fett- und Cholesterolsynthese. Seither wurden in zahlreichen Publikationen Beiträge zur Aufklärung der Funktion und Regulation dieser heute als SREBPs bekannten Transkriptionsfaktoren geleistet (*Tontonoz et al. 1993, Kim et al. 1995 und 1996, Ericsson et al. 1997, Spiegelmann et al. 1997*). Besonders intensiv wurden dabei Leber und Fettgewebe als Hauptsyntheseorte für Triglyceride und Cholesterol mit Hilfe verschiedener *in vivo* und *in vitro*-Versuchsmodelle untersucht. Die Erforschung der Genexpression und Aktivierbarkeit der SREBPs in anderen Geweben und Organen spielte bisher eine eher untergeordnete Rolle (*Kim et al. 2011, Luo et al. 2010*). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der SREBPs in der Schilddrüse auf Transkript- und Proteinebene sowie ihre Aktivierbarkeit und Funktionalität als Transkriptionsfaktor in diesem Organ erstmalig zu belegen. Dabei sollte besonders der Einfluss des TSH auf die Genexpression der SREBPs untersucht werden. Weiterhin sollte die Hypothese bestätigt werden, dass neben den für die SREBPs bekannten Zielgenen auch die Transkription von NIS und TPO durch SREBPs direkt beeinflusst wird und somit die SREBPs an der Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese beteiligt sind.

4.1.1 Einfluss von TSH auf die Genexpression der SREBPs

Zum heutigen Zeitpunkt liegen praktisch keine Daten über SREBPs in der Schilddrüse vor. Daher ist es bis heute weitgehend unbekannt, ob und durch welche Stimuli die SREBPs in der Schilddrüse exprimiert werden könnten. Indirekte Hinweise auf die Existenz der SREBPs in der Schilddrüse lieferten Studien in FRTL-5-Zellen, in denen die Expression der SREBP-Zielgene HMGC_oAR und LDLR untersucht wurde (*Grieco et al. 1990, Bifulco et al. 1990 und 1995, Perillo et al. 1995*). Zum damaligen Zeitpunkt war die Bedeutung der SREBPs jedoch zum Teil noch nicht hinreichend aufgeklärt. Auch die Identifizierung ihrer jeweiligen Zielgene erfolgte mitunter erst in den Folgejahren (*Briggs et al. 1993, Yokoyama et al. 1993, Dooley et al. 1998*). Dies könnte begründen, weshalb die Autoren keinen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von HMGC_oAR und LDLR und den SREBPs in Betracht gezogen haben. Allerdings konnten sie schon damals beobachten, dass die Expression des HMGC_oAR-Gens durch eine

Behandlung der Zellen mit TSH gesteigert werden konnte und dass dieser Effekt durch eine Behandlung mit 8-Br-cAMP imitiert werden konnte (*Grieco et al. 1990*). Diese Beobachtungen decken sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Ausgangspunkt der Untersuchungen war es, die Hypothese zu bestätigen, dass die Genexpression der SREBPs in der Schilddrüse durch TSH über die cAMP-Kaskade stimuliert wird. Einen ersten Anhaltspunkt dafür lieferten Analysen der Promotorregionen der SREBPs mit deren Hilfe je 3 putative CREs in den Promotoren von SREBP-1c und SREBP-2 identifiziert werden konnten (unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe).

Der Botenstoff cAMP ist ein intrazellulärer *second messenger*, der die Wirkung eines Hormons, wie z.B. des TSH, in die Zelle vermittelt. Die Bildung von cAMP aus Adenosintriphosphat wird durch die Adenylatzyklase katalysiert, die ihre Wirkung durch Interaktion mit der aktivierten α -Untereinheit von G_s -Proteinen vermittelt. cAMP bindet und aktiviert die PKA, die neben bestimmten Enzymen, Transportproteinen und Ionenkanälen den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert und die Transkription cAMP-abhängiger Gene durch Bindung an CREs in deren Promotoren induziert (*Roesler et al. 1988, Dash et al. 1990, Habener et al. 1990, Schmidt et al. 2005*).

Um die hier aufgestellte Hypothese zu bestätigen, wurden drei verschiedene Inkubationsversuche an verschiedenen Zellmodellen durchgeführt. Die ersten beiden Inkubationsversuche wurden an FRTL-5-Zellen durchgeführt, die das am häufigsten genutzte Zellmodell der Schilddrüsenforschung sind (*Medina und Santisteban 2000*). Dieses Rattenzellmodell war für die Untersuchungen besonders geeignet, da es sich um hoch differenzierte, folliculäre Thyreozyten handelt, die auf TSH als Wachstumsfaktor angewiesen sind (*Ambesi-Impimbato et al. 1980, Kimura et al. 2001*). Anzeichen des hohen Differenzierungsgrades dieser Zellen sind neben der Hormonabhängigkeit die Fähigkeit zur Iodidaufnahme und zur Synthese von Thyroglobulin und TPO (*Medina und Santisteban 2000*). Damit unterscheiden sie sich von den meisten Krebszelllinien, deren Wachstum und Stoffwechsel von TSH unabhängig sind. Nun ist es allgemein bekannt, dass in FRTL-5-Zellen TSH bzw. cAMP allein nur marginale Effekte auf die Zellproliferation bewirken. In Kombination mit Insulin, welches die MAP-Kinase-Kaskade und die PI_3K/Akt -Kaskade (Phosphatidylinositol-3-Kinase/ Proteinkinase B) aktiviert, potenzieren sich die Zellproliferationseffekte durch cAMP (*Zakajira und McKenzie 1989, Takahashi et al. 1990, Yamamoto et al. 1996, Kimura et al. 1999 und 2001*). Aus diesem Grund enthielten alle Inkubationsmedien zusätzlich Insulin. Für den dritten Inkubationsversuch wurden Primärkulturen von porcinen Thyreozyten gewonnen. Durch die Fähigkeit, sich nach ihrer Gewinnung in funktionelle Schilddrüsenfollikel zu

reorganisieren, können Untersuchungen durchgeführt werden, deren Konditionen denen einer *in vivo*-Untersuchung sehr nahe kommen (*Munari-Silem et al. 1990, Levy et al. 1998 b, Pocar et al. 2006*). Darüber hinaus zeigt das Schwein neben einer großen genetischen Ähnlichkeit, auch in Bezug auf Stoffwechsel und Verdauung große Ähnlichkeiten zum Menschen auf, sodass die im Schwein beobachteten Effekte sehr gut auf den Menschen übertragbar sind (*Carey 1997*).

Im ersten Versuch an FRTL-5-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige Inkubation mit 10 mU/ml TSH bzw. 10 nmol/ml Forskolin im Anschluss an eine 24-stündige TSH-Restriktion zu signifikanten Steigerungen der relativen SREBP-1c-mRNA-Konzentration um das ca. 16-fache führt. Vermutlich bewirkte TSH diese Transkription des SREBP-1c-Gens. Da Forskolin direkt die Adenylatcyclase aktiviert und somit ein cAMP-Agonist ist (*Seamon et al. 1981, Daly 1984*), kann man zudem davon ausgehen, dass die Transkription über die cAMP-Kaskade induziert wurde. Die Effekte auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBP-1c-Zielgene FAS, SCD und GPAT fielen dagegen sehr schwach aus. Die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seines Zielgens MK konnten durch diese Behandlungen unerwartet nicht gesteigert werden, dafür zeigten aber der LDLR und die HMGCoAR als weitere Zielgene des SREBP-2 deutliche Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration auf. Daher konnte die Aktivierung des SREBP-2 vermutet werden, da die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors nicht zwingend mit der Konzentrationssteigerung seiner relativen mRNA-Konzentration korrelieren muss. Die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinkonzentration kann darin begründet sein, dass posttranskriptionale und posttranslationale Modifizierungen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung des Proteins dazu beitragen, dass die in der PCR gemessene mRNA-Konzentration nicht der Konzentration an tatsächlich synthetisiertem Protein entsprechen muss (*Roth et al. 2000, Hirano et al. 2001, Jump et al. 2005, Sundqvist et al. 2005*).

Da der LDLR auch Zielgen des SREBP-1c ist (*Yokoyama et al. 1993*), könnte dieser Effekt möglicherweise auch auf eine gleichzeitige Aktivierung des SREBP-1c zurückgeführt werden. Ebenso könnte im Falle der HMGCoAR eine alternative Aktivierung der Transkription in Betracht gezogen werden, die durch die Bindung eines CREB an ein CRE im Promotor des Gens erfolgt. Dies wurde in FRTL-5-Zellen beobachtet, nachdem eine CRE-like-Sequenz im Promotor dieses Gens identifiziert wurde (*Bifulco et al. 1995, Perillo et al. 1995*). *Tian et al. (2010)* konnten diesen Effekt auch in humanen und murinen Leberzellen beobachten.

Um zu belegen, dass die auf mRNA-Ebene beobachteten Effekte auf die SREBP-Zielgene durch Translation der SREBP-mRNA in ein Protein und die anschließende

Aktivierung dieses Proteins bewirkt wurden, wurden Analysen mittels Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass durch TSH im Anschluss an eine 24-stündige TSH-Restriktion die Transkription der SREBPs und die Aktivierung der Precursorformen zu aktiven Transkriptionsfaktoren bewirkt wurden. Begründet wird dies mit Steigerungen der relativen Proteinkonzentrationen der Precursorformen als auch der aktiven Formen von SREBP-1 und -2 durch TSH, die erstmals in Schilddrüsenzellen gezeigt werden konnten. Forskolin konnte den TSH-Effekt imitieren. Möglicherweise sind TSH bzw. cAMP sogar essenziell für die Aktivierung der SREBPs. Dies wird besonders beim SREBP-1 deutlich, da die Intensität der Bande der Kontrollgruppe (ohne TSH- oder Forskolinbehandlung) im Vergleich zur Bande der TSH-/Forskolingruppe nur sehr gering war. Insgesamt waren die Effekte von TSH und Forskolin beim SREBP-2 schwächer ausgeprägt als beim SREBP-1. So wurde z. B. die aktive Form des SREBP-1 durch TSH um das ca. 30-fache, die aktive Form des SREBP-2 aber nur um das ca. 2-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Möglicherweise spricht das SREBP-1 auf die Behandlung mit TSH und Forskolin stärker an als das SREBP-2.

Da die Aktivierung der SREBPs durch TSH und Forskolin im Western Blot eindeutig nachgewiesen wurde, sollten noch einmal in einem Zeitverlauf die Effekte auf die mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene überprüft werden, da möglicherweise zu früheren oder späteren Zeitpunkten deutlichere Effekte auftreten. Dafür wurden die FRTL-5-Zellen nach voraus gegangener TSH-Restriktion über 6, 12, 24, 36 und 48 h mit 10 mU/ml TSH und 10 nmol/ml Forskolin behandelt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten interessanterweise, dass im Falle des SREBP-2 die relative mRNA-Konzentration bereits nach nur 6-stündiger Inkubation signifikant um 50% bzw. 100% durch TSH bzw. Forskolin gesteigert wurde. Daher kann nun mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass TSH neben dem SREBP-1c auch die Transkription des SREBP-2-Gens induziert. Dieser Versuch bestätigte auch die geringen Effekte auf die Zielgene des SREBP-1c. Diese zeigten zwar nach 6-stündiger Inkubation etwas größere Zunahmen der relativen mRNA-Konzentrationen um den Faktor 2-3 auf. Dennoch waren diese Effekte im Verhältnis zu denen des SREBP-1c sehr schwach. Daher könnte man vermuten, dass die Fettsäure- und Triglyceridsynthese, deren Hauptsyntheseorte bekanntermaßen Leber, Fettgewebe und laktierender Milchdrüse sind, in Schilddrüsenzellen eine eher untergeordnete Rolle spielt. Vermutlich sind Schilddrüsenzellen nicht auf die endogene Fettsäuresynthese angewiesen. Darüber hinaus muss man aufgrund der sehr geringen Effekte auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass die hier untersuchten klassischen SREBP-1c-Zielgene FAS, SCD und GPAT (*Kim et al. 1998, Foufelle und Ferré 2002*), aber auch die

MK als SREBP-2-Zielgen (*Murphy et al. 2007*) in der Schilddrüse nicht durch diese Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

Diese Ergebnisse konnten im zweiten Versuch an FRTL-5-Zellen durch die Inkubation mit TSH bzw. Forskolin ohne vorherige TSH-Restriktion bestätigt werden. Die relative mRNA-Konzentration von SREBP-1c wurde im gleichen Umfang gegenüber der Kontrolle gesteigert wie beim ersten Inkubationsversuch. Für das SREBP-2 konnten bei diesem Versuch erstmals nach 24-stündiger TSH- und Forskolininkubation signifikant erhöhte relative mRNA-Konzentrationen beobachtet werden. Möglicherweise sind die stärkeren Effekte von TSH und Forskolin in diesem Versuch auf den Verzicht des TSH-Entzuges 24 h vor der Inkubation zurückzuführen. Forskolin bewirkte in diesem Versuch allgemein schwächere Effekte im Vergleich zur Behandlung mit TSH. Auf mRNA-Ebene ließ sich der bereits beschriebene Effekt reproduzieren, dass das SREBP-2 in geringerem Umfang auf eine TSH- und Forskolinbehandlung anspricht als das SREBP-1c, da die Steigerungen in ihrer Intensität hinter denen des SREBP-1c zurückblieben. Die Beobachtung, dass das SREBP-1c im Allgemeinen stärker auf eine Behandlung mit TSH bzw. Forskolin anspricht als das SREBP-2, bestätigt sich hier. Darüber hinaus wurden die auf mRNA-Ebene beobachteten Effekte im Western Blot bestätigt, da die relativen Proteinkonzentrationen der Precursorformen von SREBP-1 und -2 durch TSH und Forskolin gesteigert wurden. Die Analyse der aktiven Formen von SREBP-1 und -2 in den Nuklearextrakten bestätigten zudem die Vermutung, dass TSH und Forskolin zu einer Aktivierung der Precursorformen führen könnten, da die Konzentrationen der aktiven Formen signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert wurden. Diese Aktivierung kann für das SREBP-2 durch die gesteigerten mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGCoAR infolge der TSH- und Forskolinbehandlung über 24 h und im Zeitverlauf über 6, 12 und 24 h belegt werden. Auch hier führte TSH zu stärkeren Effekten als Forskolin. Die relative mRNA-Konzentration der MK wurde dagegen nicht oder kaum beeinflusst. Dies galt auch für die mRNA der SREBP-1c-Zielgene FAS und GPAT, die nach 24 h und im Zeitverlauf um maximal 50% gesteigert wurden. Die relative mRNA-Konzentration der SCD wurde durch die 24-stündige Inkubation zwar etwas stärker beeinflusst. Im Verhältnis zur Konzentration des aktiven SREBP-1, das durch TSH und Forskolin um das 7-fache und 80-fache gesteigert wurde, bleiben die Effekte auf die SCD-mRNA aber deutlich zurück. Das erhärtet die Vermutung, dass FAS, SCD, GPAT und MK in der Schilddrüse nicht durch die SREBPs reguliert werden.

Für das SREBP-2 und dessen Zielgene konnten die Ergebnisse auch im zweiten Zellmodell an primären Thyreozyten bestätigt werden. Die Analysen der SREBPs mussten auf die des SREBP-2 beschränkt werden, da einerseits im Rahmen der PCR

die SREBP-1c-mRNA und die mRNA von dessen Zielgenen aufgrund der geringen Genexpression nur unzureichend amplifiziert werden konnten und andererseits aufgrund eines fehlenden passenden Antikörpers die relative Proteinkonzentration des SREBP-1 nicht im Western Blot ermittelt werden konnte.

In den primären Thyreozyten wurden die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seiner Zielgene, mit Ausnahme der MK, durch TSH signifikant gesteigert. Forskolin führte zu ähnlichen, wenngleich schwächeren Steigerungen der SREBP-2-mRNA. Möglicherweise waren auch aus diesem Grund bei den Zielgenen die Erhöhungen weniger stark ausgeprägt als durch TSH und auch nur für den LDLR signifikant. Auf Proteinebene konnten Precursorform und aktive Form des SREBP-2 durch TSH gesteigert werden, wobei hinzuzufügen ist, dass der Effekt für den Precursor bedingt durch die hohe Standardabweichung nicht signifikant war. Die Relevanz des Effektes für den Precursor konnte im Anschluss durch die Behandlung mit Forskolin belegt werden. TSH bewirkte in den primären porcinen Thyreozyten allgemein schwächere Effekte als in den FRTL-5-Zellen. Möglicherweise sprechen diese Primärzellen weniger gut auf TSH an als die Vergleichszelllinie, was auch von *Kimura et al. (2001)* beobachtet wurde.

Ingesamt liefern die Ergebnisse dieser Versuche völlig neue Erkenntnisse über die Genregulation der SREBPs. Man kann zusammenfassen, dass Transkription und Aktivierung der SREBPs in der Schilddrüse durch TSH, den primären Wachstumsfaktor der Schilddrüse (*Vassart und Dumont 1992*), beeinflusst wird. Da Forskolin die TSH-Effekte imitierte, sind diese Beobachtungen vermutlich auf die Aktivierung der cAMP/PKA/CREB-Kaskade zurückzuführen. Darüber hinaus weisen diese Ergebnisse auf die Funktionalität der putativen CREs hin, die in den SREBP-Promotoren gefunden wurden. Die Bestätigung der Effekte in zwei verschiedenen Zellmodellen bestärkt die Relevanz der vermuteten Transkriptionsaktivierung über cAMP zusätzlich.

Diese Erkenntnisse können durch eine Reihe ähnlicher Studien belegt werden, in denen auch durch andere Wachstumsfaktoren und Hormone wie PDGF, EGF, IGF oder Somatotropin (GH) eine Aktivierung von SREBPs in verschiedenen Zellen unter Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege induziert wurde (*Fleischmann et al. 2000, Swinnen et al. 2000, Demoulin et al. 2004, Kotzka et al. 1998, 2000 und 2010*). *Heemers et al. (2001 und 2006)* beobachteten zudem, dass die Expressionssteigerung der SREBPs durch Androgene auf eine direkte transkriptionelle Stimulierung der SCAP-Genexpression durch den Androgenrezeptor (AR) erfolgt. Andere Studien an Leberzellen zeigten dagegen verminderte relative mRNA-Konzentrationen und Konzentrationen des aktiven SREBP-1c unter Einfluss von cAMP sowie eine

verminderte Bindung des SREBP-1c an die Promotoren der Zielgene infolge der Phosphorylierung durch die PKA auf (Foretz *et al.* 1999, Yellaturu *et al.* 2005, Lu und Shyy 2006). Man kann jedoch nicht ausschließen, dass die SREBP-Genexpression und ihre Aktivierung in der Schilddrüse anders reguliert sind als in der Leber. Weiterhin sollte man aufgrund der heterogenen Datenlage auch die Beteiligung weiterer Signaltransduktionswege oder auch die Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren wie Pax8 für die SREBP-Genexpression in der Schilddrüse in Betracht ziehen und in weiteren Studien erforschen. Bezugnehmend auf Heemers *et al.* (2001 und 2006) sollte untersucht werden, ob die Genexpression des SCAP durch TSH beeinflusst bzw. gesteigert werden kann. Möglicherweise kann auch darüber die gesteigerte Proteinkonzentration der aktiven Formen der SREBPs durch TSH erklärt werden, wie sie durch Androgene bereits beobachtet wurde. In zukünftigen Versuchen sollten deshalb auch die relative mRNA-Konzentration des SCAP und seine relative Proteinkonzentration ermittelt werden.

4.1.2 Wirkungen von Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol auf die SREBP-Genexpression in der Schilddrüse

Wie bereits an vorausgegangener Stelle in dieser Arbeit beschrieben, handelt es sich bei den SREBPs um Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription einer Vielzahl von Genen induzieren, die für Enzyme des Fett- und Cholesterolfstoffwechsels kodieren. Ihre eigene Transkription und v.a. Aktivierung wird dabei durch einen negativen *feedback*-Mechanismus über Endprodukthemmung reguliert. So verhindert eine gesteigerte intrazelluläre Cholesterolkonzentration den Transport des SREBP-SCAP-Komplexes zum Golgi-Apparat, wodurch die Aktivierung der SREBPs unterbleibt.

Um zu belegen, dass dieser Regulationsmechanismus, der bis dato hauptsächlich in der Leber untersucht wurde, auch in der Schilddrüse stattfindet, wurden FRTL-5-Zellen und primäre Schweinethyreozyten mit Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol (25-HC) behandelt. 25-HC ist einer von vielen Vertretern der Oxysterole. Diese stellen Cholesteroxidationsprodukte dar, die endogen durch Enzyme der Cytochrom P450-Familie oder der Cholesterol-25-Hydroxylase, deren Produkt das 25-HC ist (Johnson *et al.* 1994, Lund *et al.* 1998) gebildet werden können. Andererseits können Oxysterole auch nicht-enzymatisch durch die Einwirkung radikaler Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Smith 1996) und über die Nahrung aufgenommen werden, da sie durch Erhitzungsprozesse, Sauerstoff- oder Lichtexposition in Lebensmitteln gebildet werden können (Vaya und Schipper 2007, Otaegui-Arrazola *et al.* 2010). Die Wirkung der Oxysterole besteht unter anderem in einer Hemmung der Cholesterolsynthese. *In vitro*-Untersuchungen konnten diesen Effekt durch Inkubation mit einzelnen Vertretern der

Oxysterole aufzeigen (*Brown und Goldstein 1974, Kandutsch und Chen 1974*). Im Bereich der *in vitro*-Analysen hat sich die Inkubation mit 25-HC etabliert (*Schroepfer et al. 2000*). Die molekularen Mechanismen, welche die Aktivierung der SREBPs verhindern, unterscheiden sich zwischen Cholesterin und 25-HC (*Adams et al. 2004*). Beiden ist gemeinsam, dass die Aktivierung der SREBPs unter Beteiligung der Insigs blockiert wird. Insig-1 und Insig-2 sind Membranproteine des ER (*Yabe et al. 2002, Yang et al. 2002*). Sie binden das SCAP in Anwesenheit von Sterolen. Cholesterin bindet direkt an das SCAP (*Radhakrishnan et al. 2004*) und bewirkt eine Konformationsänderung des SCAP, wodurch es an die Insigs bindet (*Adams et al. 2004*). Oxysterole dagegen binden direkt an Insig-2 und bewirken darüber eine Bindung des Insig an das SCAP. Beide Wege resultieren in einer Konformationsänderung der Schleife 6 des SCAP, in deren Folge die Cop II-Proteine das SCAP nicht mehr binden können. Die SREBPs verbleiben im ER und die proteolytische Prozessierung im Golgi-Apparat unterbleibt (*Nohturfft et al. 1999 und 2000, Sun et al. 2005, Goldstein et al. 2006*). Der Gehalt an nukleären SREBPs sinkt in der Folge rapide durch proteasomalen Abbau im Anschluss die Ubiquitinierung der SREBPs ab (*Sundqvist und Ericsson 2003, Yabe et al. 2003, Punga et al. 2006*).

Im ersten Versuch wurden FRTL-5-Zellen für die PCR-Analysen mit je 1 μM und 5 μM Cholesterin oder 25-HC in Ab- und Anwesenheit von TSH bzw. Forskolin inkubiert. Es war zu beobachten, dass die relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 durch Cholesterin und 25-HC im Vergleich zur Kontrolle zum Teil dosisabhängig gesenkt wurde. Parallel dazu wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGCoAR vermindert. Diese Effekte stehen im Einklang mit Studien, in denen in verschiedenen Zellmodellen verminderte relative mRNA-Konzentrationen oder Enzymaktivitäten von LDLR und HMGCoAR nachgewiesen wurden (*Brown und Goldstein 1974, Field et al. 1991, Peng et al. 1992, Kisseleva et al. 1999, Schmidt et al. 2006, Xu et al. 2010*). Der Einfluss von 25-HC und Chol auf die relative mRNA-Konzentration der MK blieb meist ohne Effekt. Dies bestätigt die Vermutung, dass die MK in Schilddrüsenzellen möglicherweise nicht durch das SREBP-2 reguliert wird. Trotzdem lassen die Verminderungen der relativen mRNA-Konzentrationen von LDLR und HMGCoAR in dieser Arbeit die Vermutung für eine verminderte Aktivierung des SREBP-2-Precursors zu, da dies eine verminderte Transkription dieser Gene bewirkt haben könnte. Die Überprüfung dieser These erfolgte im Western Blot, mit dessen Hilfe erstmalig in FRTL-5-Zellen deutlich verminderte relative Proteinkonzentrationen des aktiven SREBP-2 beobachtet wurden. In Abwesenheit von TSH wurden sie im Vergleich zur Kontrolle um ca. 70%, in Gegenwart von TSH um ca. 50% durch 5 μM 25-HC

reduziert. Die Reduktionen durch 5 μM Cholesterol waren gegenüber der Kontrolle auch signifikant, erreichten aber nicht die Intensität des 25-HC. Andere Arbeitsgruppen konnten diesen Unterschied der Wirkungsintensität zwischen 25-HC und Cholesterol ebenfalls beobachten (*Brown und Goldstein 1974, Adams et al. 2004*). In der Untersuchung von *DeBose-Boyd et al. (2001)* blieb die Behandlung mit Cholesterol in Leberzellen sogar gänzlich ohne Effekt auf die aktive Form des SREBP-2. Interessanterweise wurde die relative Proteinkonzentration des SREBP-2-Precursors durch die Behandlungen mit 25-HC und Cholesterol in Abwesenheit von TSH bzw. Forskolin im Gegensatz zur aktiven Form gesteigert. Dieser Anstieg könnte auf eine Ansammlung der Precursorform im ER aufgrund der unterdrückten Aktivierung zurückzuführen sein. In Anwesenheit von TSH bewirkte 25-HC ebenfalls diesen Anstieg, in Anwesenheit von Forskolin bewirkte es dagegen eine Verminderung der relativen Proteinkonzentration.

Bestätigung fanden die in FRTL-5-Zellen gemachten Beobachtungen zum SREBP-2 in den Ergebnissen des Inkubationsversuches an primären porcinen Thyreozyten. Das Oxysterol 25-HC bewirkte eine verminderte relative mRNA-Konzentration des SREBP-2 und blockierte die Prozessierung des SREBP-2-Precursors zum aktiven Transkriptionsfaktor. Die daraus resultierende verminderte relative Proteinkonzentration des aktiven SREBP-2 ging mit verminderten relativen mRNA-Konzentrationen der SREBP-2-Zielgene LDLR und HMGCoAR einher. In diesen Zellen konnte auch die relative mRNA-Konzentration der MK um ca. 80% infolge der Oxysterolbehandlung vermindert werden. Das starke Ansprechen auf diese Behandlung spricht nun dafür, dass die Transkription des MK-Gens in diesem Zellmodell vermutlich doch durch das SREBP-2 reguliert wird, was im Gegensatz zu den Effekten in FRTL-5-Zellen steht. Ob dies auf die Wahl des Zellmodells zurückzuführen, ist sollte in Zukunft überprüft werden. Die relative Proteinkonzentration der Precursorform wurde durch 25-HC ebenfalls vermindert, im Gegensatz zu den FRTL-5-Zellen. Obgleich dieser Effekt statistisch nicht signifikant war, zeichnet er gemeinsam mit den Effekten in FRTL-5-Zellen ein recht inhomogenes Bild von der möglichen Regulation des SREBP-2-Precursors durch Oxysterole und Cholesterol. Dies wird auch in der Fachliteratur wiedergespiegelt, wo einerseits Zunahmen der Precursorform durch 25-HC und Chol (*Adams et al. 2004, Radhakrishnan et al. 2007 und 2008*) und andererseits auch Verminderungen in der Leber syrischer Hamster durch Cholesterolzusatz in der Diät beobachtet wurden (*Shimomura et al. 1997*).

Die für das SREBP-1c in FRTL-5-Zellen beobachteten Effekte auf Transkript- und Proteinebene erscheinen zunächst widersprüchlich. Es wurden

konzentrationsabhängige Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c durch 25-HC bei gleichzeitiger Verminderung der relativen Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 beobachtet. Die Precursorform war dagegen in ihrer Konzentration durch 25-HC erhöht. Diese Effekte auf mRNA- und Proteinebene finden in zahlreichen Studien Bestätigung (*Wang et al. 1994, DeBose-Boyd et al. 2001, Adams et al. 2004, Yokoyama et al. 2009, Xu et al. 2010*). Auf Proteinebene könnte das SREBP-1 somit einer ähnlichen Regulation wie das SREBP-2 unterliegen, wobei Oxysterole die Prozessierung der Precursorformen hemmen (*Janowski et al. 2001*) und somit zu einer Akkumulierung der Precursorform im ER führen könnten. Wie schon beim SREBP-2, zeigte auch beim SREBP-1 die Cholesterolbehandlung ein geringeres Regulationspotenzial auf. Die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c konnte durch Cholesterol in FRTL-5-Zellen in Abwesenheit von TSH und Forskolin meist nicht beeinflusst werden. Dass Cholesterol ohne Einfluss auf die SREBP-1c-Transkription bleibt, konnte auch in der Literatur in anderen Zellmodellen beobachtet werden (*Shimomura et al. 1997, DeBose-Boyd et al. 2001*). Erst in Anwesenheit von TSH bzw. Forskolin wurde die relative SREBP-1c-mRNA-Konzentration durch Cholesterol leicht gesteigert. Die unerwarteten Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration des SREBP-1c sind vermutlich auf die Aktivierung des *liver X receptors* (LXR) zurückzuführen, zu dessen Zielgenen das SREBP-1c zählt (*Repa et al. 2000, Schultz et al. 2000*). Das SREBP-2 zählt dagegen nicht zu den LXR-Zielgenen (*Schultz et al. 2000*). Der LXR spielt als nukleärer Rezeptor bei der Regulation des Lipid- und Glucosestoffwechsels eine wichtige Rolle (*Joseph et al. 2002 a, Cao et al. 2003, Laffitte et al. 2003*) und kann durch Oxysterole und Zwischenprodukte der Cholesterolsynthese aktiviert werden (*Lehmann et al. 1997, DeBose-Boyd et al. 1998, Janowski et al. 1996 und 1999, Yang et al. 2006, Chen et al. 2007*). Da es sich bei FAS und SCD um direkte Zielgene des LXR handelt, könnten über diesen Weg die leichten Steigerungen ihrer relativen mRNA-Konzentration in dieser Arbeit infolge der Sterolbehandlung erklärt werden (*Joseph et al. 2000 b, Chu et al. 2006*). Da auch *Davies et al. (2008)* durch den LXR-Agonisten T0901317 deutliche Effekte auf mRNA-Ebene für das SREBP-1c und nur leichte, nicht signifikante Steigerungen für die FAS in den Schilddrüsen von Ratten beobachteten, unterstützt das erneut die These, dass die Fettsäuresynthese in der Schilddrüse eine untergeordnete Rolle spielen könnte.

Die Effekte von 25-HC und Cholesterol auf die relativen mRNA-Konzentrationen der SREBPs und ihrer Zielgene wurden durch Versuche im Zeitverlauf über 6, 12 und 24 h in FRTL-5-Zellen bestätigt. Die Ursache der infolge der Sterolbehandlung leicht gesteigerten mRNA-Konzentration der GPAT, die ein SREBP-1c-Zielgen ist (*Eberlé et*

al. 2004, Cha und Repa 2007, Takeuchi und Reue 2009), bleibt aber weiterhin ungeklärt. Diesbezüglich sollte in weiterführenden Studien die Ursache der Transkriptionsaktivierung untersucht werden. Das SREBP-1c kann dafür mit großer Wahrscheinlichkeit nicht ursächlich sein, da dessen aktive Form infolge der Oxysterolbehandlung nachweislich sehr stark reduziert wurde.

4.1.3 Einfluss der SREBPs auf die Expression der schilddrüsenassoziierten Gene NIS und TPO

Die Schilddrüsenhormonsynthese wird durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren reguliert. Der NIS und die TPO sind zwei dieser Faktoren und wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Ihre Transkription wird durch das Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren, darunter Pax8, TTF-1 und TTF-2 induziert (*Abramovicz et al. 1992, Zannini et al. 1992, Taki et al. 2002, Chun et al. 2004*). Schilddrüsenhormone nehmen in vielfältiger Weise Einfluss auf den Stoffwechsel, u.a. auf den Lipid- und Cholesterolverstoffwechslung (*Ness und Zhao 1994, Schmidt et al. 2005*). Begründet wird dies durch die Ergebnisse zahlreicher Studien, in denen die SREBPs und zum Teil auch ihre Zielgene, wie LDLR und FAS, anhand funktioneller TREs in den Promotoren als Zielgene der Schilddrüsenhormone bzw. des TR identifiziert wurden (*Shin und Osborne 2003, Zhang et al. 2003, Lopez et al. 2007, Radenne et al. 2008*).

Studien der jüngeren Vergangenheit deuten auch eine mögliche umgekehrte Regulation an, d.h. der Fett- und Cholesterolverstoffwechslung könnte die Schilddrüsenhormonsynthese beeinflussen. In Studien von *Jatwa und Kar (2006)* und *Parmar und Kar (2007)* konnten nach der Verfütterung einer hypercholesterinämischen Diät deutlich verminderte Serumkonzentrationen von T₃ und T₄ beobachtet werden. Nachdem in den vorherigen Versuchen dieser Arbeit in FRTL-5-Zellen die SREBP-Genexpression und ihre Regulation durch Sterole nachgewiesen wurden, wuchs die Vermutung einer möglichen Regulation von NIS und TPO durch die SREBPs heran. Es deutete sich somit eine Erklärung auf molekularer Ebene für die Effekte von *Parmar und Kar (2007)* an und es wurden Untersuchungen zur Beeinflussung von NIS und TPO durch die SREBPs durchgeführt.

Gesicherte Erkenntnisse zur Beeinflussung der Gentranskription durch bestimmte Transkriptionsfaktoren lassen sich gut am Zellmodell erlangen, z.B. durch Inkubationsversuche mit Substanzen, die die Konzentration bzw. Aktivität der Transkriptionsfaktoren beeinflussen können. Eine verminderte Aktivität der Transkriptionsfaktoren sollte dann auch eine verminderte Gentranskription des möglichen Zielgens bedingen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Untersuchungen an zwei Zellmodellen durchgeführt. FRTL-5-Zellen wurden, wie bereits im vorherigen

Abschnitt dargelegt, mit 25-HC und Cholesterol in Abwesenheit und Anwesenheit von TSH bzw. Forskolin behandelt. An primären porcinen Thyreozyten wurde diese Inkubation mit 25-HC und TSH bzw. Forskolin wiederholt.

Zunächst konnte in FRTL-5-Zellen der erwartete steigernde Effekt von TSH und Forskolin auf die relative Proteinkonzentration des NIS beobachtet werden. Darüber hinaus konnten wir in FRTL-5-Zellen erstmalig der Einfluss der SREBPs, vermittelt durch 25-HC und Cholesterol, auf die relative Proteinkonzentration des NIS belegen. In Abwesenheit von TSH konnte insbesondere durch 25-HC die relative Proteinkonzentration des NIS vermindert werden, auch wenn dieser Effekt erst im folgenden Versuch in Abwesenheit von Forskolin statistisch bestätigt werden konnte. In diesem Fall konnte die Proteinkonzentration deutlich um 50% im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden. Cholesterol bewirkte eine Verminderung um immerhin 30%. Auch in Gegenwart von TSH konnte durch 25-HC die relative Proteinkonzentration des NIS deutlich vermindert werden. In Gegenwart von Forskolin konnte 25-HC die relative Proteinkonzentration des NIS indes nicht in diesem Ausmaß senken. Cholesterol bewirkte in Anwesenheit von TSH und Forskolin keine Effekte.

Auf mRNA-Ebene wurde die relative mRNA-Konzentration des NIS durch TSH und Forskolin in FRTL-5-Zellen ebenfalls gesteigert. Die Effekte von 1 μ M und 5 μ M 25-HC blieben in Ab- und Anwesenheit von TSH auf die NIS-mRNA noch aus. In Ab- und Anwesenheit von Forskolin konnten die relativen mRNA-Konzentrationen des NIS durch 25-HC schließlich leicht vermindert werden. Auch die relative mRNA-Konzentration der TPO konnte durch 25-HC in Ab- und Anwesenheit von TSH bzw. Forskolin zumeist vermindert werden. Die Inkubation mit Cholesterol vermochte dies für NIS und TPO nicht.

Die Untersuchungen auf mRNA-Ebene in primären porcinen Thyreozyten konnten diese Ergebnisse weitgehend bestätigen. TSH und Forskolin steigerten auch hier die relative mRNA-Konzentration des NIS gegenüber der Kontrolle. Zudem konnte 5 μ M 25-HC die relative mRNA-Konzentration des NIS vermindern, signifikant war der Effekt in Anwesenheit von TSH. Die relative mRNA-Konzentration der TPO konnte dagegen nicht analysiert werden.

Auf den Ergebnissen dieser Arbeit beruhend kann man die durch *Parmar und Kar (2007)* beobachteten Verminderungen der Serumkonzentrationen von T_3 und T_4 vermutlich auch auf den Einfluss der SREBPs auf die Genexpression von NIS und TPO zurückführen. Da *Parmar und Kar (2007)* noch keinen Link zu den SREBPs zogen, versuchten sie die Effekte mit dem Vorhandensein von 2-Thiouracil als Diätbestandteil zu erklären, das als Schilddrüsenantagonist bekannt ist (*Nogimori et al. 1989, Jatwa und Kar 2006*). Die Daten dieser Arbeit weisen aber stark darauf hin, dass NIS und TPO

Zielgene der SREBPs sein könnten und bestätigen damit die eingangs formulierte Hypothese. Cholesterin und 25-HC bewirken eine Verminderung der aktiven Formen der SREBPs und somit eine verminderte Transkription der Gene von NIS und TPO. Somit scheint auch bei *Parmar und Kar* eher durch die hypercholesterinämische Diät die Expression von Genen der Schilddrüsenhormonsynthese beeinträchtigt worden zu sein, in deren Folge nur unzureichend Schilddrüsenhormone synthetisiert werden konnten. Erhärtet wird dies durch Ergebnisse eines Iodaufnahmeassays bei dem die Inkubation von FRTL-5-Zellen mit cholesterinarmen und cholesterinreichen LDL eine dosisabhängig verminderte NIS-spezifische Iodaufnahme in die Zellen bewirkte (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe Eder).

In zukünftigen Versuchen bieten sich noch Transfektionsversuche mit SREBP-Expressionsvektoren bzw. der siRNA-vermittelte Knockdown der SREBPs an. Über die so erreichte spezifische Steigerung bzw. Verminderung der SREBP-Genexpression können die resultierenden Effekte auf NIS und TPO zusätzlich abgesichert werden. Zudem erlauben diese Versuche eine Aussage darüber, ob SREBP-1c und SREBP-2 in gleichem Ausmaß an der Genregulation von NIS und TPO beteiligt sind, oder ob möglicherweise nur einer dieser Transkriptionsfaktoren die in dieser Arbeit beobachteten Effekte bedingt hat. Ein weiterer interessanter Aspekt für zukünftige Studien ist die Beantwortung der Frage, ob die SREBPs bereits bei der Entwicklung der Schilddrüse eine Rolle spielen. Zellteilung und -wachstum setzen die Ausbildung neuer Zellmembranen voraus, deren maßgebliche Bausteine Fettsäuren und Cholesterin sind und deren mögliche Essenzialität für Embryonalentwicklung und Mitose schon mehrfach Autoren vermutet wurde (*Chirala et al. 2003, Fernández et al. 2004*). Während der Differenzierung von Adipozyten konnten zudem gesteigerte relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1 und gesteigerte Proteinkonzentrationen des aktiven SREBP-1 und SREBP-2 beobachtet werden (*Kim und Spiegelmann 1996, Shimomura et al. 1997, Inoue et al. 2001*). Durch siRNA-vermittelten Knockdown der SREBPs verblieben die Zellen dagegen in der G1-Phase der Zellteilung und das Zellwachstum wurde vermindert (*Bengoechea-Alonso et al. 2005, Bengoechea-Alonso und Ericsson 2006, Porstmann et al. 2008*). Für diese These spricht außerdem, dass in FRTL-5-Zellen die Zellteilungsrate durch Cholesterinhemisuccinat im Inkubationsmedium deutlich vermindert werden konnte (*Beguinet et al. 1987*). Mit dem heutigen Wissen über SREBPs könnte dieser Effekt diesen Transkriptionsfaktoren zugeschrieben werden.

4.2 Bedeutung des PPAR α für die Genexpression der SREBPs in der Schilddrüse

Der PPAR α und die SREBPs stellen Masterregulatoren des Lipidmetabolismus dar, da sie die Transkription von Genen beeinflussen, die in den Lipidkatabolismus und die Lipidsynthese involviert sind (*Brown und Goldstein 1997, Kersten et al. 1999, Ringseis und Eder 2011*). Der PPAR α ist, neben PPAR β/δ und PPAR γ , eine Isoform der Liganden-aktivierbaren Transkriptionsfaktorfamilie der nukleären Rezeptoren (*Schmidt et al. 1992, Dreyer et al. 1992 und 1993, Castrillo und Tontonoz 2004 a*). Neben der Regulation des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels sind PPARs auch für die Glucose- und Cholesterolumöostase von Bedeutung (*Tontonoz und Nagy 1999, Duval et al. 2002*). Neben natürlichen Liganden wie Fettsäuren, oxidierten Fetten und Eicosanoiden, können die PPARs auch durch synthetische Liganden, wie Fibrate aktiviert werden (*Forman et al. 1997, Krey et al. 1997, Castrillo und Tontonz 2004 b*).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Fütterungsexperimenten mit oxidierten Fetten und Fibraten auch Auswirkungen auf die Schilddrüsenhormonsynthese beobachten (*Eder et al. 1999, 2000 und 2002, Skufca et al. 2003, Luci et al. 2006*). Die zu Grunde liegenden Mechanismen für die erhöhten Konzentrationen des freien und totalen Thyroxins im Plasma der Versuchstiere bzw. die gesteigerten relativen mRNA-Konzentrationen von NIS und TPO konnten im Rahmen dieser Studien aber noch nicht aufgeklärt werden. Da PPARs durch oxidierte Fette aktiviert werden und die Genexpression und Aktivierung der SREBPs beeinflussen können sollte nun auf den vorhergehenden Ergebnissen dieser Arbeit beruhend erforscht werden, ob die Effekte auf die Schilddrüsenhormonsynthese durch PPAR α , dessen mRNA in humanen Thyreozyten bereits nachgewiesen werden konnte (*Kasai et al. 2000, Antonelli et al. 2010*), über die SREBPs vermittelt werden könnten. Zu diesem Zweck wurden FRTL-5-Zellen mit 100 μ M WY 14,643 behandelt. Die Inkubationsversuche mit diesem spezifischen PPAR α -Agonisten wurden in Ab- und Anwesenheit von 10 mU/ml TSH durchgeführt, um mögliche additive Effekte durch TSH aufzeigen zu können.

Um zu überprüfen, ob durch WY 14,643 eine Aktivierung des PPAR α in den FRTL-5-Zellen bewirkt wurde, wurde die relative mRNA-Konzentration des Zielgens CPT-1a (*Brandt et al. 1998, Mascaro et al. 1998*) bestimmt. Die mRNA-Konzentration wurde erwartungsgemäß durch WY 14,643 gesteigert und bestätigt die Ergebnisse in Rattenhepatozyten (*Wieneke et al. 2009*). TSH führte zu keinen zusätzlichen Steigerungen. Die Aktivierung des PPAR α bleibt durch TSH daher höchstwahrscheinlich unbeeinflusst.

Für das SREBP-1 wurden deutliche Effekte beobachtet. Die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c konnte durch WY 14,643 in Ab- und Anwesenheit von

TSH im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden. Daher könnte man eine direkte Transkriptionsaktivierung des SREBP-1c-Gens durch den PPAR α vermuten. Zunahmen konnten auch für die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-1 beobachtet werden. WY 14,643 bewirkte mit Steigerungen um das 11-fache in Abwesenheit und um das 60-fache in Anwesenheit von TSH. Somit konnte TSH die Effekte des WY 14,643 zusätzlich steigern. Die PCR-Daten für die SREBP-1c-Zielgene zeigten keine oder nur sehr geringe Steigerungen der relativen mRNA-Konzentrationen. Dies steht im Einklang mit den vorherigen Daten dieser Arbeit, bei denen diese Zielgene vermutlich ebenfalls nicht durch das SREBP-1c reguliert wurden.

Für das SREBP-2 konnten auf mRNA-Ebene keine Effekte durch die Inkubation mit WY 14,643 beobachtet werden. Im Kontrast dazu stehen die Effekte auf den Precursor und die aktive Form des SREBP-2, deren relative Konzentrationen durch WY 14,643 besonders in Abwesenheit von TSH gesteigert wurden. Folglich wurde auch die relative mRNA-Konzentration des LDLR gesteigert. Da bei diesem Versuch für die MK keine Effekte infolge der Behandlungen mit WY 14,643 und TSH auftraten, bestärkt dies die Vermutung, dass das MK-Gen in FRTL-5-Zellen nicht durch das SREBP-2 reguliert wird. Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte einer PPAR α -Aktivierung auf die Genexpression der SREBPs können durch eine Vielzahl weiterer Studien bestätigt werden. Als Effekte waren gesteigerte relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und SREBP-2 und deren Zielgenen sowie die SREBP-abhängige Cholesterolsynthese durch verschiedene PPAR α -Agonisten zu beobachten (*Maxwell et al. 1983, Hashimoto et al. 1995 und 2000, Rodríguez et al. 2001, Roglans et al. 2001 und 2004, Le Jossic-Corcós et al. 2004 a und 2004 b, Luci et al. 2007, Huang et al. 2008, Martens et al. 2008*). Unveränderte relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und SREBP-2 bei gleichzeitig gesteigerter Spaltung des SREBP-1c-Proteins zur aktiven Form beobachteten *Knight et al. (2005)* in Lebern von Mäusen. Die nachweislich gesteigerten Proteinkonzentrationen der aktiven Formen der SREBPs in dieser Arbeit und den vorherig erwähnten Studien können die gegenteiligen Effekte anderer Studien, die eine verminderte Aktivierung der SREBPs beobachteten, nicht bestätigen. Die Autoren begründeten die verminderte Aktivierung der SREBPs mit der Expressionssteigerung von Insig-1 und Insig-2a durch PPAR α - und PPAR γ -Agonisten (*König et al. 2007 und 2009*), nachdem *Kast-Woelbern et al. (2004)* ein PPRE im Promotor des Insig-1-Gens identifizierten und die Expression dieses Gens durch den PPAR γ nachwiesen. Für diese gegensätzlichen Effekte könnten die Speziesunterschiede der Versuchstiere, die Art und Konzentration der verwendeten Fibrate, unterschiedliche Konditionen der Zellkultivierung und unterschiedliche Inkubationszeiten bzw. die Dauer der Fütterungsversuche verantwortlich sein (*Martens et al. 2008*). Man könnte spekulieren,

dass für die Effekte in dieser Arbeit der Insulinzusatz im Inkubationsmedium ursächlich ist, der eine verminderte mRNA-Konzentration von Insig-2a und folglich eine gesteigerte Prozessierung des SREBP-1c-Precursors zur aktiven Form bewirken könnte (Yabe et al. 2003, Yellaturu et al. 2005 und 2009). König et al. (2007 und 2009) verwendeten dagegen kein Insulin in den Zellkulturmedien.

Ob die Transkription von SREBP-1c und SREBP-2 in dieser Arbeit direkt durch den PPAR α beeinflusst wurde, kann man nicht gesichert sagen. Dafür sprechen die gesteigerten mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c in dieser Arbeit und andere Studien, in denen ein solcher positiver Link auf die mRNA-Konzentration von SREBP-1c und SREBP-2 schon gezeigt wurde (Roglans et al. 2001 und 2004, Le Jossic-Corcus et al. 2004 a, Luci et al. 2007). Zudem identifizierten Martens et al. (2008) mehrere potenzielle PPREs (PPAR response element) im SREBP-2-Promotor, die jedoch von der Konsensussequenz stark abwichen. Es wäre auch möglich, dass die SREBP-Transkription über einen vorgeschalteten Transkriptionsfaktor reguliert wird, wie es Porstmann et al. (2005) vermuteten. So zeigten Pugazhenti et al. (1999) die Phosphorylierung und Aktivierung des CREB durch die PI₃K auf. Da PPAR α -Agonisten die PI₃K/ Akt-Kaskade aktivieren (Huang et al. 2008), könnte in der Folge das CREB aktiviert werden, an CREs in den Promotoren der SREBPs binden und so deren Transkription und die SREBP-vermittelte Gentranskription induzieren (Demoulin et al. 2004, Hegarty et al. 2004, Zhou et al. 2004). Natürlich muss durch weitere Studien dieser mögliche Wirkmechanismus noch weiter abgesichert werden. Gleichwohl ist es bekannt, dass Insulin, welches im Inkubationsmedium enthalten war, die PI₃K/Akt-Kaskade aktivieren kann (Burgering und Coffey 1995). Da das Insulin aber auch dem Medium der Kontrollgruppe zugesetzt war, kann es nicht die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf die mRNA-Konzentration des SREBP-1c bewirkt haben. Indirekt könnte die gesteigerte SREBP-1c-mRNA auch auf die Aktivierung des LXR zurückzuführen sein, da das SREBP-1c ein Zielgen des LXR ist (Stevenson und Brown 2009) und die Expression des LXR durch PPARs gesteigert werden kann (Tobin et al. 2000, Chawla et al. 2001, Chinetti et al. 2001, Castrillo und Tontonoz 2004 b, Tiwari et al. 2008).

Abschließend wurden die Effekte des WY 14,643 auf NIS und TPO betrachtet. Konnten auf mRNA-Ebene durch WY 14,643 in Abwesenheit von TSH signifikante Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration des NIS um ca. 30% festgestellt werden, wurde parallel dazu die relative Proteinkonzentration des NIS um ca. 60% gegenüber der Kontrolle gesteigert. Ähnliche Effekte beobachteten Luci et al. (2006) durch Clofibrat in

primären Schweinethyreozyten. Die relative mRNA-Konzentration der TPO zeigte unerwartet keinerlei Effekte durch WY 14,643 und TSH auf.

Untersuchungen zu NIS und TPO in Schilddrüsenzellen in Folge einer PPAR α -Aktivierung mit WY 14,643 wurden bis dato in keiner anderen Studie durchgeführt. Die Ergebnisse für den NIS stehen weitgehend im Konsens mit den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit. Die Steigerungen der relativen mRNA-Konzentration und Proteinkonzentration des NIS durch WY 14,643 in Abwesenheit von TSH deuten einen Zusammenhang mit der Aktivierung des PPAR α an. Wahrscheinlich ist dieser Effekt auf die Aktivierung der SREBPs zurückzuführen, da vorhergehende Untersuchungen dieser Arbeit einen Zusammenhang zwischen den SREBPs und der Transkription des NIS-Gens andeuten und auch die Expression und Aktivierung der SREBPs durch den PPAR α gesteigert wurde. Eine direkte Beeinflussung der NIS-Genexpression durch den PPAR α kann dabei höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da in Anwesenheit von TSH keine Steigerungen der NIS-Genexpression durch WY 14,643 beobachtet wurden. Dennoch hätte nach unserer Hypothese im Falle einer Transkriptionsaktivierung des NIS-Gens durch die SREBPs auch in Anwesenheit von TSH ein steigernder Effekt nachweisbar sein sollen. Der Grund für diese fehlenden Effekte für NIS und auch TPO konnte durch diese Arbeit noch nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise waren die durch den PPAR α und die SREBPs vermittelten Effekte auf NIS und TPO zu gering, um in gesteigerten relativen mRNA- und Proteinkonzentrationen zu resultieren. Im Falle des NIS wäre es auch möglich, dass der TSH-Zusatz an sich die Effekte des WY 14,643 überdeckt hat.

Um zukünftig eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten, sollten Fütterungsversuche mit oxidierten Fetten an Schweinen wiederholt werden. Als zu untersuchende Parameter kommen die relativen Proteinkonzentrationen von SREBPs, NIS und TPO in Betracht, die mittels Western Blot und PCR in der Schilddrüse analysiert werden sollten.

Nach der Zusammenfassung aller hier aufgeführten Ergebnisse konnte die eingangs formulierte Hypothese bestätigt werden. Die Inkubation mit WY 14,643 bewirkte die Aktivierung des PPAR α und resultierte in Transkription und Aktivierung der SREBPs in Schilddrüsenzellen. Die aktiven SREBPs bewirkten wiederum eine gesteigerte Transkription des NIS-Gens, die in zum Teil gesteigerten Proteinkonzentrationen resultierte. Für die TPO blieben diese Effekte aus. Trotzdem kann dieser Inkubationsversuch einen wichtigen Anhaltspunkt dafür liefern, warum bei *Eder et al. (1999, 2000 und 2002)* die Verfütterung oxidiertes Fette zu gesteigerten

Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Plasma führt, da der NIS einen ebenso wichtigen Beitrag zur Schilddrüsenhormonsynthese leistet, wie die TPO.

4.3 Schlussfolgerungen

Insgesamt kann man aus den Ergebnissen dieser Arbeit für die SREBPs völlig neue Funktionen ableiten. So steuern SREBPs nicht nur den Fett- und Cholesterolfstoffwechsel, sondern nehmen in der Schilddrüse auch auf die Hormonsynthese durch die Regulation der Genexpression von NIS und TPO Einfluss. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass die Transkription der SREBPs in der Schilddrüse durch TSH über die cAMP-Kaskade induziert wird. Darüber hinaus konnte im Western Blot einerseits die Aktivierung der SREBPs durch TSH und Forskolin und andererseits die allgemein bekannte Regulation der aktiven SREBPs durch Sterole nachgewiesen werden. Da nur die SREBP-2-Zielgene eindeutige Effekte durch die Behandlungen aufzeigten, ist vermutlich nur das SREBP-2 in der Schilddrüse funktionell. Das SREBP-1c ist, zumindest in Bezug auf die Fettsäuresynthese, mit großer Wahrscheinlichkeit nicht funktionell, da dessen Zielgene infolge der Behandlungen kaum beeinflusst wurden. Ferner können NIS und TPO als Schlüsselgene der Schilddrüsenhormonsynthese mit großer Wahrscheinlichkeit als neue Zielgene der SREBPs identifiziert werden, da deren Genexpression durch die Sterolbehandlung vermindert wurde.

Darüber hinaus wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass der PPAR α über die SREBPs Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese zu nehmen scheint. Parallel zur Aktivierung der SREBPs durch den PPAR α -Agonisten WY 14,643 wurde die Genexpression des NIS gesteigert. Dieser Effekt auf die Genexpression wurde vermutlich durch die SREBPs vermittelt, da schon die vorherigen Untersuchungen diesen Einfluss auf Gene der Schilddrüsenhormonsynthese belegen konnten.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit diene maßgeblich der Erforschung neuer Regulationsmechanismen der Schilddrüsenhormonsynthese unter Beteiligung von SREBPs. Bisher ist es allgemein anerkannt, dass SREBPs die Expression von Genen induzieren, die für Proteine der Cholesterol- und Lipidsynthese codieren. Eine völlig neue Funktion der SREBPs deutete sich anhand von Studien an, die verminderte Schilddrüsenhormonkonzentrationen nach der Verfütterung cholesterolreicher Diäten beobachteten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob die SREBPs möglicherweise an der Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese beteiligt sind. Ziel war es, die Expression der SREBPs auf Transkript- und Proteinebene sowie ihre Aktivierbarkeit und Funktionalität in der Schilddrüse erstmalig zu belegen und NIS und TPO als mögliche Zielgene der SREBPs zu identifizieren. Um zu belegen, dass die Gene der SREBPs in der Schilddrüse exprimiert werden und die Proteine aktiviert werden und funktionell sind, wurden im ersten Teil der Arbeit Untersuchungen an zwei Zellmodellen, der FRTL-5-Zelllinie und an primären porcinen Thyreozyten, durchgeführt. Es wurde die Hypothese untersucht, ob die Expression der SREBPs durch TSH über die cAMP/ PKA/ CREB-Kaskade induziert wird. Stimulationsversuche mit 10 mU/ml TSH und 10 nmol/ml des cAMP-Agonisten Forskolin konnten diese Hypothese in den verschiedenen Zellmodellen bestätigen. Sowohl die relativen mRNA-Konzentrationen als auch die relativen Proteinkonzentrationen von SREBP-1c und SREBP-2 wurden durch die Inkubationen mit TSH und Forskolin gesteigert. Die Aktivierung und Funktionalität der SREBPs deutete sich durch die gesteigerten Proteinkonzentrationen der aktiven Formen der SREBPs infolge der TSH- und Forskolinbehandlung an und wurde durch die gesteigerten relativen mRNA-Konzentrationen ihrer Zielgene wie LDLR und HMGCoAR bestätigt. Inkubationsversuche mit Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol führten zu verminderten Proteinkonzentrationen der aktiven Formen der SREBPs und zeigten, dass sie in der Schilddrüse den gleichen molekularen Regulationsmechanismen unterlagen, wie sie aus der Leber schon bekannt sind. Da die Effekte für die SREBP-1-Zielgene FAS, SCD und GPAT infolge der TSH-, Forskolin- und Sterolbehandlung sehr gering waren, muss man annehmen, dass diese Gene in der Schilddrüse nicht durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert werden.

Der zweite Teil der Arbeit diene der Bestätigung der Hypothese, dass NIS und TPO mögliche Zielgene der SREBPs sind. Dafür wurden Inkubationsversuche mit Cholesterol und 25-Hydroxycholesterol in FRTL-5-Zellen und Primärkulturen der porcinen Thyreozyten herangezogen. Für den NIS konnten neben verminderten relativen mRNA-Konzentrationen in den zwei Zellmodellen auch erstmals verminderte Proteinkonzentrationen in FRTL-5-Zellen durch die Behandlung mit 25-HC beobachtet werden. Auch die relative mRNA-

Konzentration der TPO konnte durch diese Behandlung in FRTL-5-Zellen zum Teil vermindert werden. Die Ursache dieser verminderten Transkriptionsraten ist vermutlich auf die verminderte Konzentration der aktiven SREBPs zurückzuführen. Dadurch erhärtet sich der vermutete Zusammenhang zwischen den SREBPs und der Expression von NIS und TPO.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob über eine Aktivierung des PPAR α die Schilddrüsenhormonsynthese unter Beteiligung der SREBPs gesteigert werden kann. In einem Inkubationsversuch an FRTL-5-Zellen mit 100 μ M des PPAR α -Agonisten WY 14,643 konnten erstmals deutlich erhöhte relative mRNA-Konzentrationen und Proteinkonzentrationen der aktiven Form des SREBP-1c in Schilddrüsenzellen beobachtet werden. Zudem wurde die relative Proteinkonzentration der aktiven Form des SREBP-2 infolge der Behandlung gesteigert. Erhöhte relative mRNA-Konzentrationen der SREBP-2-Zielgene belegten die Funktionalität als Transkriptionsfaktoren. Ferner wurde die relative mRNA-Konzentration und Proteinkonzentration des NIS durch WY 14,643 gesteigert. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Aktivierung des PPAR α die Transkription und Aktivierung der SREBPs in der Schilddrüse bewirken könnte, in deren Folge die Expression von Genen der Schilddrüsenhormonsynthese induziert wird. Da für die TPO diese Effekte nicht beobachtet wurden, bedarf es weiterführender Studien, die diesen möglichen Regulationsmechanismus weiter aufklären und absichern.

Insgesamt kann man aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableiten, dass die SREBPs eine wichtige Rolle in der Synthese von Schilddrüsenhormonen spielen dürften. Dies stellt einen völlig neuen Aspekt in der Regulation der Schilddrüsenhormonsynthese dar.

6 Summary

The main aim of the work presented here, was the investigation of new molecular regulatory pathways in thyroid hormone synthesis under participation of the SREBP transcription factors. To date it is well established that SREBPs induce the expression of genes encoding for proteins that are responsible for synthesis of cholesterol and lipids. Now, some studies observed decreased serum concentrations of T₃ and T₄ after feeding an atherogenic diet (a diet rich in cholesterol). The context of this work was to reveal the possible involvement of SREBPs in the regulation of thyroid hormone synthesis. Therefore, the expression of SREBPs on the transcriptional and protein level, their activation and function in the thyroid gland should be investigated for the first time. In addition, the identification of NIS and TPO as possible SREBP target genes should be realized.

To prove that the SREBP genes are expressed and that the proteins are activated and functional in the thyroid gland, investigations were made in the first part of the work using two *in vitro* models, including the FRTL-5 cell line and porcine thyrocytes in primary culture. We tested the hypothesis that SREBP gene expression was stimulated by TSH through activation of the cAMP/PKA/CREB cascade. Within stimulating the cells with 10 mU/ml of TSH and 10 nmol/ml of the cAMP agonist forskolin, we were able to corroborate this hypothesis. Besides the increased relative mRNA levels, increased relative protein levels of SREBP-1c and SREBP-2 were observed after treatment with TSH and forskolin, too. Elevated protein concentrations of the mature SREBPs and mRNA levels of their target genes, for example LDL receptor and HMGCoAR, confirmed the activation and function of these transcription factors. Treatment of the cells with cholesterol and 25-hydroxycholesterol led to decreased protein levels of the mature SREBPs, as it was expected. Hence, the SREBPs in the thyroid are regulated in the same way as it is known from the liver. As the effects for SREBP-1c target genes FAS, SCD and GPAT were very low towards TSH, forskolin and sterol treatment, one has to assume that these genes are not regulated by this transcription factor in the thyroid.

In the second part of this work we wanted to prove the hypothesis that NIS and TPO are possible SREBP target genes. FRTL-5 cells and porcine thyrocytes were treated with cholesterol and 25-hydroxycholesterol, again. Decreased mRNA and protein concentrations of NIS resulted from oxysterol treatment and were observed for the first time. The mRNA concentration of TPO was partially affected by this treatment, too. It can be suggested that these depletions in transcription were caused by degradation of mature SREBPs. In conclusion these data provided the hypothesis, that NIS and TPO

might be target genes of the SREBPs. This corroborates the assumed link between SREBPs and the expression of NIS and TPO.

The third part of this work dealt with the question, whether an activation of PPAR α might influence the synthesis of thyroid hormones and if SREBPs are involved into this regulation. We incubated FRTL-5 cells with 100 μ M of WY 14,643, a well-known PPAR α agonist, here. For the first time, we could observe distinct increases in mRNA concentrations and protein levels of the mature SREBP-1c in these cells. The protein concentration of the mature SREBP-2 was affected as well. Above this, more evidence for the function as a transcription factor was gained from increased mRNA concentrations of SREBP-2 target genes. Furthermore the relative mRNA concentration and protein level of NIS was raised by WY14,643, actually. These findings indicate that activation of PPAR α might induce transcription and activation of SREBPs, which results in an expression of genes involved in thyroid hormone synthesis. However, the expression of TPO was not affected. Thus, further investigations have to be made to give a more detailed explanation for the underlying molecular mechanism, which was observed here.

All in all we can deduce from the results of this work that SREBPs might play an important role in thyroid hormone synthesis. This is a completely new aspect in the regulation of the thyroid hormone synthesis.

7 Literaturverzeichnis

- Abramovicz MJ, Vassart G, Christophe D (1992) Functional study of the human thyroid peroxidase gene promoter; *Eur J Biochem* (203): 467-473
- Adams CM, Reitz J, De Brabander JK, Feramisco JD, Li L, Brown MS, Goldstein JL (2004) Cholesterol and 25-Hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs; *J. Biol. Chem.* (279): 52772-52780
- Allgeier A, Offermanns S, Van Sande J, Spicher K, Schultz G, Dumont J (1994) The human thyrotropin receptor activates G- proteins GS and Gq/11 ; *J. Biol. Chem.* (19): 13733-13735
- Ambesi-Impiombato FS, Parks LAM, Coon HG (1980) Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (77): 3455-3459
- Antonelli A, Ferrari SM, Frascerra S, Pupilli C, Mancusi C, Metelli MR, Orlando C, Ferrannini E, Fallahi P (2010) CXCL9 and CXCL11 chemokines modulation by peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists secretion in Graves' and normal thyrocytes; *J Clin Endocrinol Metab* (95): 1-8
- Beguilot F, Beguilot L, Tramontano D, Duiloi C, Formisano S, Bifulco M, Ambesi-Impiombato FS, Aloj S (1987) Thyrotropin regulation of membrane lipid fluidity in the FRTL-5 thyroid cell line; *J. Biol. Chem.* (262): 1575-1582
- Bengochea-Alonso MT, Punga T, Ericsson J (2005) Hyperphosphorylation regulates the activity of SREBP1 during mitosis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (102): 11681-11686
- Bengochea-Alonso MT, Ericsson J (2006) Cdk1/Cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis; *Cell Cycle* (5): 1708-1718
- Bifulco M, Santillo M, Tedesco I, Zarrilli R, Laezza C, Aloj M (1990) Thyrotropin modulates low density lipoprotein binding activity in FRTL-5 thyroid cells; *J. Biol. Chem.* (265): 19336-19342
- Bifulco M, Perillo B, Saji M, Laezza C, Tedesco I, Kohn LD, Aloj SM (1995) Regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in FRTL-5 cells I. Identification and characterization of a cyclic AMP-responsive element in the rat reductase promoter; *J. Biol. Chem.* (270): 15231-15236
- Brandt JM, Djouadi F, Kelly D (1998) Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *J. Biol. Chem.* (273): 23786-23792

- Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence; *J. Biol. Chem.* (268): 14490-14496
- Brown MS, Goldstein JL (1974) Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol; *J. Biol. Chem.* (249): 7306-7314
- Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor; *Cell* (89): 331-340
- Brown RS, Shalhoub V, Coulter S, Alex S, Joris I, De Vito W, Lian J, Stein GS (2000) Developmental regulation of thyrotropin receptor gene expression in the fetal and neonatal rat thyroid: relation to thyroid morphology and to thyroid-specific gene expression; *Endocrinology* (141): 340-345
- Büch TR, Biebermann H, Kalwa H, Pinkenburg O, Hager D, Barth H, Aktories K, Breit A, Gudermann T (2008) G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin; *J. Biol. Chem.* (283): 20330-20341
- Burgering BM, Coffey PJ (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction; *Nature* (376): 599-602
- Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP, Schmidt RJ, Zhang Y, Staybrook KR, Suen C, Otto KA, Miller AR, Dai J, Foxworthy P, Gao H, Ryan TP, Jiang XC, Burris TP, Eacho PI, Etgen GJ (2003) Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis; *J. Biol. Chem.* (278): 1131-1136
- Carey GB (1997) The swine as a model for studying exercise-induced changes in lipid metabolism; *Med Sci Sports Exerc.* (29): 1437-1443
- Carrasco N (1993) Iodide transport in the thyroid gland; *Biochim Biophys Acta* (1154): 65-82
- Castrillo A, Tontonoz P (2004 a) Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (20): 455-480
- Castrillo A, Tontonoz P (2004 b) PPARs in atherosclerosis: the clot thickens; *J. Clin. Invest.* (114): 1538-1540
- Cha JY, Repa JJ (2007) The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR; *J. Biol. Chem.* (282): 743-751
- Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis; *Mol Cell* (7): 161-171

- Chazenbalk G, Magnusson RP, Rapoport B (1987) Thyrotropin stimulation of cultured thyroid cells increases steady state levels of the messenger ribonucleic acid for thyroid peroxidase; *Mol Endocrinol* (1): 913-917
- Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russel DW (2007) Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice; *Cell Metab* (5): 73-79
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Tora IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Furchart JC, Clavey V, Staels B (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway; *Nat Med* (7): 53-58
- Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil SJ (2003) Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (100): 6358-6363
- Chu K, Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM (2006) Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation; *Mol Cell Biol* (26): 6786-6798
- Chun JT, Di Dato V, D'Andrea B, Zannini M, Di Lauro R (2004) The CRE-like element inside the 5'-upstream region of the rat sodium/iodide symporter gene interacts with diverse classes of b-Zip molecules that regulate transcriptional activities through strong synergy with Pax-8; *Mol Endocrinol* (18): 2817-2829
- Dai G, Levy O, Carrasco N (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter; *Nature* (379): 458-460
- Daly JW (1984) Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview; *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* (17): 81-89
- Damante G, Tell G, Di Lauro R (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells; *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (66): 307-356
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER (1990) Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation; *Nature* (345): 718-721
- Davies JS, Kotokorpi P, Lindhal U, Oscarsson J, Wells T, Mode A (2008) Effects of synthetic liver X receptor agonist T0901317 on the growth hormone and thyroid hormone axes in male rats; *Endocrinology* (33): 196-204
- DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, Brown MS (1998) Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (98): 1477-1482

- DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohtrufft A, Goldstein JL, Espenshade PJ (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of Site-1-Protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi; *Cell* (99): 703-712
- DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, Brown MS (2001) Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (98): 1477-1482
- De la Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N (2000) Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology; *Physiol Rev* (80): 1083-1105
- Demoulin JB, Ericsson, Kallin A, Rorsman G, Ronnstrand L, Heldin GH (2004) Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins; *J. Biol. Chem.* (279): 35392-35402
- Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism; *Endocrine Reviews* (20): 649-688
- Di Palma T, Nitsch R, Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M (2003) The paired domain-containing factor Pax8 and the homeodomain-containing factor TTF-1 directly interact and synergistically activate transcription; *J. Biol. Chem.* (278): 3395-3402
- Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N (2003) The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance; *Endocrine Reviews* (24): 48-77
- Dooley KA, Millinder S, Osborne TF (1998) Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y; *J. Biol. Chem.* (273): 1349-1346
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors; *Cell* (68): 879-887
- Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W (1993) Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR); *Biol Cell* (77): 67-76
- Duval C, Chinetti G, Trottein F, Furchart JC, Staels B (2002) The role of PPARs in atherosclerosis; *Trends Mol Med.* (8): 422-430
- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis; *Biochimie* (86): 839-48
- Eder K (1999) The effect of an oxidized dietary oil on plasma cholesterol and thyroid hormone concentrations of miniature pigs fed a hyperlipidemic diet; *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* (82): 271-281

- Eder K, Stangl GI (2000) Plasma thyroxine and cholesterol concentrations of miniature pigs are influenced by thermally oxidized dietary lipids; *J Nutr* (130): 116-121
- Eder K, Skufca P, Brandsch C (2002) Thermally oxidized dietary fats increase plasma thyroxine concentrations in rats irrespective of the Vitamin E and selenium supply; *J Nutr* (132): 1275-1281
- Ericsson J, Jackson SM, Kim JB, Spiegelmann BM, Edwards PA (1997) Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene; *J. Biol. Chem.* (14): 7298-7305
- Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N (1997) Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity; *J. Biol. Chem.* (272): 27230-27238
- Espenshade PJ, Li WP, Yabe D (2002) Sterols block binding of COP II proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (99): 11694-11699
- Evans RM (2005) The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology; *J Mol Endocrinol* (19): 14229-14238
- Field FJ, Shreves T, Fujiwara D, Murthy S, Albright E, Mathur SN (1991) Regulation of gene expression and synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by micellar cholesterol in CaCo-2 cells; *J Lipid Res.* (32): 1811-1821
- Fernández C, Lobo M del V, Gómez-Coronado D, Lasunción MA (2004) Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation; *Exp. Cell Res.* (300): 109-120
- Fleischmann M, Iynedjans PB (2000) Regulation of sterol regulatory element-binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt; *Biochem J* (349): 13-17
- Foretz M, Pacot C, Dugail I, Lemarchand P, Guichard C, Le Lièvre X, Berthelot-Lubrano C, Spiegelman B, Kim JB, Ferré P, Foufelle F (1999) ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose; *Mol Cell Biol* (19): 3760-3768
- Forman BM, Chen J, Evans RM (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94): 4312-4317
- Foufelle F, Ferré P (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c; *Biochem J* (366): 377-391
- Gérard CM, Lefort A, Libert F, Christophe D, Dumont JE, Vassart G (1988) Transcriptional regulation of the thyroperoxidase gene by thyrotropin and forskolin; *Mol Cell Endocrinol* (60): 239-242

- Gérard CM Lefort A, Christophe D Libert F, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G (1989) Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms; *Mol Endocrinol* (3): 2110-2118
- Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS (2002) Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis; *Arch. Biochem. Biophys.* (397): 139-148
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006) Protein sensors for membrane sterols; *Cell* (124): 35-46
- Grieco D, Beg ZH, Romano A, Bifulco M, Aloj SM (1990) Cell cycle progression and 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase are regulated by thyrotropin in FRTL-5 rat thyroid cells; *J. Biol. Chem.* (265): 19343-19350
- Guo Q, Wang PR, Milot DP, Ippolito MC, Hernandez M, Burton CA (2001) Regulation of lipid metabolism and gene expression by fenofibrate in hamsters; *Biochim Biophys Acta* (1533): 220-232
- Habener JF, Meyer TE, Yun Y, Waeber G, Hoeffler JP (1990) Characterization of a cAMP-regulated enhancer-binding protein; *Metabolism* (39): 13-16
- Hashimoto F, Ishikawa T, Hamada S, Hayashi H (1995) Effect of gemfibrozil on lipid biosynthesis from acetyl-CoA derived from peroxisomal beta-oxidation; *Biochem Pharmacol* (49): 1213-1221
- Hashimoto F, Taira S, Hayashi H (2000) Changes in isoprenoid lipid synthesis by gemfibrozil and chlofibric acid in rat hepatocytes; *Biochem Pharmacol* (59): 1203-1210
- Hashimoto K, Yamada M, Matsumoto S, Monden T, Satoh T, Mori M (2006) Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone; *Endocrinology* (147): 4292-4302
- Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV (2001) Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/ sterol element-binding protein pathway; *Mol Endocrinol* (15): 1817-1828
- Heemers H, Verhoeven G, Swinnen JV (2006) Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: current insights; *Mol Endocrinol* (20): 2265-2277
- Hegarty BD, Bobard A, Hainault I, Ferré P, Bossard P, Fougelle F (2004) Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (102): 791-796
- Henderson Y (1897) Some recent observations on the influence of the thyroid gland on metabolism; *Science* (6): 984-950

- Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R (2001) Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway; *J. Biol. Chem.* (276): 36431-36437
- Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H (1998) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2; *J. Clin. Invest.* (110): 2331-2339
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver; *J. Clin. Invest.* (109): 1125-1231
- Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13; *Genomics* (25): 667-673
- Hua X, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL (1996) Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the Endoplasmic Reticulum membrane; *J. Biol. Chem.* (271): 10379-10384
- Huang Z, Zhou X, Nicholson AC, Gotto Jr AM, Hajjar DP, Han J (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor; *Br J Pharmacol* (155): 596-605
- Hutchinson R (1898) Further observations on the chemistry and action of the thyroid gland; *J Physiol.* (23): 178-189
- Illingworth DR, McClung MR, Connor WE, Alaupovic P (1981) Familial hypercholesterolaemia and primary hypothyroidism: coexistence of both disorders in a young woman with severe hypercholesterolaemia; *Clin. Endocrinol.* (14): 145-152
- Inoue J, Kumagai H, Terada T, Maeda M, Shimizu M, Sato R (2001) Proteolytic activation of SREBPs during adipocyte differentiation; *Biochem Biophys Res Comm* (283): 1157-1161
- Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S (1993) The peroxisome proliferator-activated receptor: retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidemic drugs; *J Mol Endocrinol* (11): 37-47
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha; *Nature* (383): 728-731
- Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisley GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ (1999) Structural requirements of ligands of the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (96): 266-271
- Janowski BA, Shan B, Russel DW (2001) The hypocholesterolemic agent LY295427 reverses suppression of sterol regulatory element-binding protein processing mediated by oxysterols; *J. Biol. Chem.* (276): 45408-45416

- Jatwa R, Kar A (2006) Cardio-protective role of terazosin is possibly mediated through alteration in thyroid function; *Eur J Pharmacol* (551): 87-91
- Johnson KA, Morrow CJ, Knight GD, Scallen TJ (1994) In vivo formation of 25-hydroxycholesterol from endogenous cholesterol after a single meal, dietary cholesterol challenge; *J Lipid Res* (35): 2241-2253
- Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusis AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P (2002 a) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (99): 7604-7609
- Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, Tontonoz P (2002 b) Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors; *J. Biol. Chem.* (277): 11019-11025
- 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
- Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, Dai G, Carrasco N (1994) Na⁺-I⁻ symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻-transporting cultured thyroid cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (91): 3789-3793
- Kandutsch AA, Chen HW (1974) Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain; *J. Biol. Chem.* (249): 6057-6061
- Kasai K, Banba N, Hishinuma A, Matsumura M, Kakishita H, Matsumura M, Motohashi S, Sato N, Hattori Y (2000) 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) facilitates thyroglobulin production by cultured human thyrocytes; *AmJ Physiol Cell Physiol.* (279): C1859-1869
- Kast-Woelbern 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
- Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schütz G, Offermann S (2007) Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development; *J Clin Invest* (117): 2399-2407
- 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
- Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih HM, Ellenberger T, Towle HC, Spiegelmann BM (1995) Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain; *Mol Cell Biol* (15): 2582-2588

- Kim JB, Spiegelmann BM (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism; *Genes Dev* (10): 1096-1107
- Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelmann BM (1998) Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1; *J Clin Invest* (101): 1-9
- Kim HW, Rao JS, Rapoport SI, Igarashi M (2011) Dietary n-6-PUFA deprivation downregulates arachidonate but upregulates docosahexaenoate metabolizing enzymes in rat brain; *Biochim Biophys Acta* (1811): 111-117
- Kimura T, Dumont JE, Fusco A, Golstein J (1999) Insulin and TSH promote growth in size of PC Cl3 rat thyroid cells, possibly via a pathway different from DNA synthesis: comparison with FRTL-5 cells; *Eur J Endocrinol* (140): 94-103
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP (2001) Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models; *Endocr Rev* (22): 631-656
- King JH (1909) The influence of the thyroid on carbohydrate metabolism; *J Exp Med.* (11): 665-672
- Kisseleva Af, Goryunova LE, Planells R, Lafont H, Alquier C (1999) HMGCoA reductase and LDL-receptor genes are regulated differently by 15-ketosterols in HepG2 cells; *Biochem Biophys Res Comm* (259): 688-694
- Knight BL, Hebbach A, Hauton D, Brown AM, Wiggins D, Patel DD (2005) A role for PPAR α in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver; *Biochem J* (389): 413-421
- Koch A, König B, Spielmann J, Leitner A, Stangl GI, Eder K (2007) Thermally oxidized oil increases the expression of insulin-induced genes and inhibits activation of sterol regulatory element-binding protein-2 in rat liver; *J Nutr.* (137): 2018-2023
- König B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Stangl GI, Eder K (2007) Activation of PPAR α lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2; *Biochem Pharmacol* (73): 574-585
- König B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Hirche F, Stangl GI, Eder K (2009) Activation of PPAR α and PPAR γ reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1; *Eur J Pharmacol* (605): 23-30
- Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T (1997) Regulation by thyroid-stimulating hormone of Sodium/Iodide Symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells; *Endocrinology* (138): 2227-2232
- Kotzka J, Mueller-Wieland D, Koponen A, Njamen D, Kremer L, Roth G, Munck M, Knebel B, Krone W (1998) ADD1/SREBP-1c mediates insulin-induced gene expression linked to the MAP kinase pathway; *Biochem Biophys Res Commun* (249): 375-379

- Kotzka J, Mueller-Wieland D, Roth G, Kremer L, Munck M, Schürmann S, Knebel B, Krone W (2000) Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade; *J Lipid Res* (41): 99-108
- Kotzka J, Knebel B, Avci H, Jacob S, Nitzgen U, Jockenhovel F, Heeren J, Haas J, Mueller-Wieland D (2010) Phosphorylation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a links growth hormone action to lipid metabolism in hepatocytes; *Atherosclerosis* (213): 156-165
- Krey G, Bralssant O, L´Horset F, Kalkhoven E (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
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4; *Nature* (227): 680-685
- Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, Castrillo A, Mangelsdorf DJ, Collins JL, Saez E, Tontonoz P (2003) Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (100): 5419-5424
- Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE (1987) Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid; *Mol. Cell. Endocrinol.* (52): 273-278
- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway; *J. Biol. Chem.* (272): 3137-3140
- Le Jossic-Corcus C, Duclos S, Ramirez LC, Zaghini I, Chevillard G, Martin P, Pineau T, Bournot P (2004 a) Effects of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation on pathways contributing to cholesterol homeostasis in rat hepatocytes; *Biochim Biophys Acta* (1683): 49-58
- Le Jossic-Corcus C, Pastori GM, Duclos S, Kawabe Y, Pineau T, Bournot P (2004 b) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) activators induce hepatic farnesyl diphosphate synthase gene expression in rodents; *J. Steroid Biochem Mol Biol* (88): 203-211
- Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N (1997) Characterisation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94): 5568-73
- Levy O, De la Vieja A, Carrasco N (1998 a) The Na⁺/I⁻ symporter (NIS): recent advances; *J Bioenerg Biomembr* (30): 195-206
- Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N (1998 b) N-linked glycosylation of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model; *J. Biol. Chem.* (273): 22657-22663

- Lopez D, Abisambra Socarrás JF, Bedi M, Ness GC (2007) Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone; *Biochim Biophys Acta* (1771): 1216-1225
- Lu M, Shyy JYJ (2006) Sterol regulatory element-binding protein1 is negatively modulated by PKA phosphorylation; *Am J Physiol Cell Physiol* (290): C1477-C1486
- Luci S, Kluge H, Hirche F, Eder K (2006) Clofibrate increases hepatic triiodothyronine (T3)- and thyroxine (T4)- glucuronosyltransferase activities and lowers plasma T3 and T4 concentrations in pigs; *Drug Metabolism and Disposition* (34): 1887-1892
- Luci S, König B, Giemsa B, Huber S, Hause G, Kluge H, Stangl GI, Eder K (2007) Feeding of a deep-fried fat causes PPAR α activation in the liver of pigs as a non-proliferating species; *Br J Nutr* (97): 872-882
- Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li WP, Russel DW (1998) cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism; *J. Biol. Chem.* (273): 34316-34327
- Luo DX, Xia CL, Li JM, Xiong Y, Yuan HY, Tang ZW, Zeng Y, Liao DF (2010) Static pressure accelerates ox-LDL-induced cholesterol accumulation via SREBP-1-mediated caveolin-1 downregulation in cultured vascular smooth muscle cells; *Biochem Biophys Res Commun* (403): 52-58
- Mandard S, Müller M, Kersten S (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes; *Cell Mol Life Sci* (61): 393-416
- Martens K, van Themaat EVL, van Batenburg MF, Heinäniemi M, Huyghe S, Van Hummelen P, Carlberg C, Van Veldhoven PP, Van Kampen A, Baes M (2008) Coordinate induction of PPAR α and SREBP2 in multifunctional protein 2 deficient mice; *Biochimica et Biophysica Acta* (1781): 694-702
- Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D (1998) Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor; *J. Biol. Chem.* (273): 8560-8563
- Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M (2002) Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells; *J. Endocrinol.* (172): 163-176
- Matsuda M, Korn BS, Hammer RE, Moon YA, Komuro R, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS, Shimomura I (2001) SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation; *Genes Dev.* (15): 1206-1216
- Maxwell RE, Nawrocki JW, Uhlendorf PD (1983) Some comparative effects of gemfibrozil, clofibrate, bezafibrate, cholestyramine and compactin on sterol metabolism in rats; *Atherosclerosis* (48): 195-203
- Medina DL, Santisteban P (2000) Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems; *Eur J Endocrinol* (143): 161-178

- 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, Spiegelmann BM, Staels B, Wahli W (2006) International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors; *Pharmacol Rev.* (58): 726-741
- Munari-Silem Y, Mesnil M, Selmi S, Bernier-Valentin F, Rabilloud R, Rousset B (1990) Cell-cell interactions in the process of differentiation of thyroid epithelial cells into follicles: A study by microinjection and fluorescence microscopy on in vitro reconstituted thyroid follicles; *J Cell Physiol* (145): 414-427
- Murphy C, Muray AM, Meaney S, Gafvels M (2007) Regulation by SREBP-2 defines a potential link between isoprenoid and adenosylcobalamin metabolism; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (355): 359-364
- Ness GC, Pendleton LC, Li YC, Chiang JY (1990) Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 alpha hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (172): 1150-1156
- Ness GC, Zhao Z (1994) Thyroid hormone rapidly induces hepatic LDL receptor mRNA levels in hypophysectomized rats; *Arch Biochem Biophys* (315): 199-202
- Nogimori T, Braverman LE, Taurog A, Fang SL, Wright G, Emerson CH (1989) A new class of propylthiouracil analogs: Comparison of 5'-deiodinase inhibition and antithyroid activity; *Endocrinology* (118): 1598-1605
- Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S, Goldstein JL, Brown MS (1999) Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (96): 11235-11240
- Nohturfft A, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, Espenshade PJ (2000) Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes; *Cell* (102): 315-323
- Nunez J, Pommier J (1982) Formation of thyroid hormones; *Vitam Horm* (39):175-229
- Oetting A, Yen PM (2007) New insights into thyroid hormone action; *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (21): 193-208
- Otaegui-Arazola A, Menéndez-Carreño M, Ansorena D, Astiasarán I (2010) Oxysterols: A world to explore; *Food Chem Toxicol* (48): 3289-3303
- Pachucki J, Wang D, Christophe D, Miot F (2004) Structural and functional characterization of the two human ThOX/Duox genes and their 5'-flanking regions; *Mol. Cell. Endocrinology* (214): 53-62
- Parmar HS, Kar A (2007) Atherogenic diet induced diabetes mellitus: Involvement of thyroid hormones; *European Journal of Pharmacology* (570): 244-248
- Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G (1989) Molecular cloning of the thyrotropin receptor; *Science* (246): 1620-1622

- Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (97):13144-13149
- Pasquini JM, Adamo AM (1994) Thyroid hormones and the central nervous system; *Dev Neurosci* (16): 1-8
- Peng SK, Hu B, Chen H, Morin RJ (1992) Effects of cholesterol oxides on LDL receptors in cultured rabbit aortic smooth muscle cells; *Cardiovasc Pathol* (1): 141-145
- Perillo B, Tedesco I, Laezza C, Santillo M, Romano A (1995) Regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in FRTL-5 cells II. Down-regulation by v-K-ras oncogene; *J. Biol. Chem.* (270): 15237-15241
- Pocar P, Klonisch T, Brandsch C, Eder K, Fröhlich C, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S (2006) AhR-agonist-induced transcriptional changes of genes involved in thyroid function in primary porcine thyrocytes; *Toxicol. Sci.* (89):408-414
- Pomerance M, Abdullah HB, Kamerji S, Correze C, Blondeau JP (2000) Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species; *J. Biol. Chem.* (275): 40539-40546
- Porstmann T, Griffiths B, Chung YL, Delpuech O, Griffiths JR, Downward J, Schulze A (2005) PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP; *Oncogene* (24): 6465-6481
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leever S, Griffiths JR, Chung YL, Schulze A (2008) SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth; *Cell Metab* (8): 224-236
- Prummel MF, Brokken LJ, Wiersinga WM (2004) Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion; *Thyroid* (14): 825-829
- Pugazhenthii S, Borast T, O'Connor D, Meintzer MK, Heidenreich KA, Reusch JEB (1999) Insulin-like growth factor I-mediated activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein in PC12 cells. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated pathway; *J. Biol. Chem.* (274): 2829-2837
- Punga T, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J (2006) Phosphorylation and ubiquitination of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-1 in response to DNA binding; *J. Biol. Chem.* (281): 25278-25286
- Radenne A, Akpa M, Martel C, Sawadogo S, Mauvoisin D, Mounier C (2008) Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: evidence for T3 genomic and nongenomic actions; *Am J Physiol Endocrinol Metab* (295): E884-E894
- Radhakrishnan A, Sun LP, Knowm HJ, Brown MS, Goldstein JL (2004) Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain; *Mol Cell* (15): 259-268

- Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (104): 6511-6518
- Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS (2008) Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance; *Cell Metabolism* (8): 512-521
- Raspé E, Laurent E, Andry G, Dumont JE (1991) ATP, bradykinin, TRH and TSH activate the Ca(2+)-phosphatidylinositol cascade of human thyrocytes in primary culture; *Mol. Cell Endocrinol.* (81): 175-183
- Rawson RB (2003) The SREBP Pathway- insights from Insigs and insects; *Nature Reviews* (4): 631-640
- Rehner G, Daniel H (2002) *Biochemie der Ernährung. 2. Auflage.* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, 2002
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β ; *Genes Dev.* (14): 2819-2830
- Ribeiro MO (2008) Effects of thyroid hormone analogs on lipid metabolism and thermogenesis; *Thyroid* (18): 197-203
- Ringseis R, Eder K (2011) Regulation of genes involved in lipid metabolism by dietary oxidized fat; *Mol. Nutr. Food Res.* (55): 109-121
- Ris-Stalpers C, Bikker H (2010) Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations; *Mol. Cell. Endocrinology* (322): 38-43
- Rodríguez C, Cabrero A, Roglans N, Adzet T, Sánchez RM, Vázquez M, Ciudad CJ, Laguna JC (2001) Differential induction of stearyl-CoA desaturase and acyl-CoA oxidase genes by fibrates in HepG2 cells; *Biochem Pharmacol* (61): 357-364
- Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW (1988) Cyclic AMP and the induction of eucaryotic gene transcription; *J. Biol. Chem.* (263): 9063-9066
- Roger PP, Dumont JE (1984) Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cAMP and growth factors; *Mol. Cell. Endocrinology* (36): 79-93
- Roglans N, Peris C, Verd JC, Alegret M, Vázquez M, Sánchez RM, Laguna JC (2001) Increase in hepatic expression of SREBP-2 by gemfibrozil administration to rats; *Biochem Pharmacol* (62): 803-809
- Roglans N, Vázquez-Carrera M, Alegret M, Novell F, Zambón D, Ros E, Laguna JC, Sánchez RM (2004) Fibrates modify the expression of key factors involved in bile-acid synthesis and biliary-lipid secretion in gallstone patients; *Eur J Clin Pharmacol.* (59): 855-861

- Roth G, Kotzka J, Kremer L, Lohaus C, Meyer HE, Krone W, Mueller-Wieland D (2000) MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro; *J. Biol. Chem.* (275): 33302-33307
- Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL (1996) Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment; *Cell* (85): 1037-1046
- Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA (1992) Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids; *Mol Endocrinol.* (6): 1634-1641
- Schmidt R, Lang F, Thews G (2005) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* 29. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag
- Schmidt RJ, Ficorilli JV, Zhang Y, Bramlett KS, Beyer TP, Borchert K, Dowless MS, Houck KA, Burris TP, Eacho PI, Liang G, Guo LW, Wilson WK, Micheal LF, Cao G (2006) A 15-ketosterol is a liver X receptor ligand that suppresses sterol-responsive element binding protein-2 activity; *J Lipid Res* (47): 1037-1044
- Schonnjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J (1997) 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
- Schroepfer Jr. GJ (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes; *Physiological Reviews* (80): 361-554
- Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis; *Genes Dev.* (14): 2831-2838
- Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981) Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (78): 3363-3367
- Sheng Z, Otani H, Brown MS, Goldstein JL (1995) Independent regulation of sterol regulatory element binding proteins 1 and 2 in hamster liver; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (92): 935-938
- Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (1997 a) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells; *J. Clin. Invest.* (99): 838-845
- Shimomura I, Bashmakov Y, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (1997 b) Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94): 12354-12359
- Shin D, Osborne TF (2003) Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2); *J. Biol. Chem.* (36): 34114-34118

- Skufca P, Brandsch C, Hirche F, Eder K (2003) Effects of a dietary thermally oxidized fat on thyroid morphology and mRNA concentrations of thyroidal iodide transporter and thyroid peroxidase in rats; *Ann Nutr Metab* (47): 207-213
- Smith LL (1996) Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995; *Lipids* (31): 454-487
- Spiegelmann BM, Hu E, Kim JB, Brun R (1997) PPAR gamma and the control of adipogenesis; *Biochimie* (79): 111-112
- Spitzweg C, Morris JC (2002) The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications; *Clin Endocrinol* (57): 559-574
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC (1998) Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism; *Circulation* (98): 2088-2093
- Stevenson J, Brown AJ (2009) How essential is cholesterol?; *Biochem. J.* (420): e1-e4
- Stoeckmann AK, Towle HC (2002) The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression; *J. Biol. Chem.* (277): 27029-27035
- Stubbe P, Schulte FJ, Heidemann P (1986) Iodine deficiency and brain development; *Bibl Nutr Dieta* (38): 206-208
- Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS (2005) Insig required sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COP II proteins in vitro; *J. Biol. Chem.* (280): 26483-26490
- Sundqvist A, Ericsson J (2003) Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (100): 13833-13838
- Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, jin J, Harper JW, Ericsson J (2005) Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7); *Cell Metab* (1): 379-391
- Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G (2000) Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway; *Oncogene* (19): 5173-5181
- Takahashi S, Conti M, Van Wyk JJ (1990) Thyrotropin potentiation of insulin-like growth factor-I dependent deoxyribonucleic acid synthesis in FRTL-5 cells: mediation by an autocrine amplification factor(s); *Endocrinology* (126): 736-745
- Takeuchi K, Reue K (2009) Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis; *Am J Physiol Endocrinol Metab* (269): E1195-E1209

- Taki K, Kogai T, Kanamoto Y, Hershman JM, Brent GA (2002) A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells; *Mol Endocrinol* (16): 2266-2282
- Taurog A (1970) Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis; *Recent Prog. Horm Res.* (26): 189-247
- Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH, Deng HF, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N (2000) The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer; *Nature Med* (6): 871-878
- Tian L, Song Y, Xing M, Zhang W, Ning G, Li X, Yu C, Qin C, Liu J, Tian X, Sun X, Fu R, Zhang L, Zhang X, Lu Y, Zou J, Wang L, Guan L, Gao L, Zhao J (2010) A novel role for thyroid-stimulating hormone: upregulation of hepatic 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase expression through the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A/cyclic adenosine monophosphate-responsive element binding protein pathway; *Hepatology* (52): 1401-1409
- Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK (2008) Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis; *Med Res Rev* (28): 483-544
- Tobin KA, Steineger HH, Alberti S, Spydevold O, Auwerx J, Gustafsson JA, Nebb HI (2000) Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha; *Mol Endocrinol* (14): 741-752
- Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelmann BM (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation; *Mol Cell Biol* (13): 4753-4759
- Tontonoz P, Nagy L (1999) Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease; *Curr Opin Lipidol.* (10): 485-490
- Van Renterghem P, Vassart G, Christophe D (1996) Pax8 expression in primary cultured dog thyrocyte is increased by cyclic AMP; *Biochimica et Biophysica Acta* (1307): 97-103
- Van Sande J, Dequanter D, Lothaire P, Massart C, Dumont J, Erneux C (2006) Thyrotropin stimulates the generation of Inositol 1,4,5- trisphosphate in human thyroid cells; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (91): 1099-1107
- Vassart G, Dumont JE (1992) The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth; *Endocrine Reviews* (13): 596-611
- Vaya J, Schipper HM (2007) Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease; *J Neurochem* (102): 1727-1737
- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL (1994) SREBP-1, a membrane bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis; *Cell* (77): 53-62

- Wieneke N, Neuschäfer-Rube F, Bode LM, Kuna M, Andres J, Carnevali Jr. LC, Hirsch-Ernst KI, Püschel GP (2009) Synergistic acceleration of thyroid hormone degradation by phenobarbital and the PPAR α agonist WY14643 in rat hepatocytes; *Toxicology and Applied Pharmacology* (240): 99-107
- Xu L, Bai Q, Rodriguez-Agudo D, Hylemon PB, Heuman DM, Pandak WM, Ren S (2010) Regulation of hepatocyte lipid metabolism and inflammatory response by 25-Hydroxycholesterol and 25-Hydroxycholesterol-3-sulfate; *Lipids* (45): 821-832
- Yabe D., Brown MS, Goldstein JL (2002) Insig-2, a second endoplasmatic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (99): 12753-12758
- Yabe D, Komuro R, Liang G, Goldstein JL, Brown MS (2003) Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: Implications for fatty acid synthesis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (100): 3155-3160
- Yamamoto K, Hirai A, Ban T, Saito J, Tahara K, Terano K, Tamura Y, Saito Y, Kitagawa M (1996) Thyrotropin induces G1 cyclin expression and accelerates G1 phase after insulin-like growth factor I stimulation in FRTL-5 cells; *Endocrinology* (137): 2036-2042
- Yang T, Espenshade TJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER; *Cell* (110): 489-500
- Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, Westover EJ, Covey DF, Mangelsdorf DJ, Cohen JC, Hobbs HH (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands; *J. Biol. Chem.* (281): 27816-27826
- Yellaturu CR, Deng X, Cagen LM, Wilcox HG, Park EA, Raghow R, Elam MB (2005) Posttranslational processing of SREBP-1 in rat hepatocytes is regulated by insulin and cAMP; *Biochem Biophys Res Commun* (332): 174-180
- Yellaturu CR, Deng X, Park EA, Raghow R, Elam MB (2009) Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2a and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex; *J. Biol. Chem.* (284): 31726-31734
- Yessoufou A, Wahli W (2010) Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels; *Swiss Med Wkly.* (140): E1-E10
- Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS (1993) SREBP-1, a basic helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene; *Cell* (75): 187-197

- Yokoyama A, Makishima M, Choi M, Cho Y, Nishida S, Hashimoto Y, Terui T (2009) Induction of SREBP-1c mRNA by differentiation and LXR ligand in human keratinocytes; *J Invest Dermatol* (129): 1395-1401
- Zakarija M, McKenzie JM (1989) Variations in the culture medium for FRTL5 cells: effects on growth and iodide uptake; *Endocrinology* (125): 1253-1259
- Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di 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
- Zhang Y, Yin L, Hillgartner F (2003) SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC transcription in hepatocytes; *J. Lipid Research* (44): 356-368
- Zhou RH, Yao M, Lee TS, Zhu Y, Martins-Green M, Shyy JYJ (2004) Vascular endothelial growth factor activation of sterol regulatory element binding protein: a potential role in angiogenesis; *Circ. Res.* (95): 471-478

Danksagung

Allen, die mich während der Entstehung dieser Arbeit begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Eder gilt mein Dank für die Überlassung des überaus interessanten Themas und für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie anfertigen zu dürfen. Weiterhin möchte ich mich für die fortwährende Unterstützung in dieser Zeit und die konstruktive Betreuung bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. habil. Robert Ringseis und Frau Dr. Gaiping Wen für die sehr unkomplizierte Zusammenarbeit, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die wertvollen Ratschläge für das Erstellen dieser Arbeit bedanken. Ihr steter Optimismus, die aufmunternden Worte und die vielen angenehmen Gespräche haben stark zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für die angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen lustigen Momente im Büro. Im Besonderen danke ich Christine Rauer für die gegenseitige Unterstützung im Labor, das Korrekturlesen der Manuskripte trotz ausgebuchten Zeitplans und die nette gemeinsame WG-Zeit.

Ferner gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg für die freundliche Zusammenarbeit während der ersten Phase meiner Doktorandenzeit. Dabei möchte ich besonders Frau Dr. habil. Bettina König für die guten Tipps zum Western Blot danken.

Katharina Weil und Jens Hausner danke ich für ein immer offenes Ohr, die vielen guten Ratschläge zu dieser Arbeit, meinen Stammplatz auf ihrem Sofa und für alles, was unsere Freundschaft ausmacht.

Von Herzen danke ich meinem Vater und meiner Oma für ihre emotionale Unterstützung, den Glauben an mich und ihr Verständnis während der Doktorandenzeit und darüber hinaus.