



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Neolignanderivate als PPAR $\gamma$ - und RXR $\alpha$ -Modulatoren“

verfasst von

Amina Cocic

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Univ.-Prof. Dr. Verena M. Dirsch

---

## Abstract

---

The nuclear receptors RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  are according to science important transcription factors in metabolic disease and cancer. Diabetes type II, metabolic syndrome as well as cancer, are in the foreground to widespread diseases. About 60 million people in Europe have diabetes and about 13.1 million cancer-deaths are predicted for 2030. These nuclear receptors are involved in Metabolism of lipids and glucose, and some clinical trials report about significant benefits by using a combined therapy with this RXR $\alpha$ - and PPAR $\gamma$ -Agonists.

Aim of this Diploma work was to identify the corresponding receptor agonists from a set of semi- and fully synthetic neolignan derivatives. Screening experiments were performed in HEK-293 cells using a luciferase- and an EGFP-reporter gene. Therefore RXR $\alpha$ - as well as PPAR $\gamma$ -modulating gene expression was simulated in transfection experiments. A further aim is to yield structure-activity relationships between neolignans and RXR $\alpha$ -/PPAR $\gamma$ -receptors, which will be part of a larger project.

Some novel agonists were identified with the luciferase reporter gene assay. While the fully synthetic derivatives were inactive or selective RXR $\alpha$ -agonists like the derivatives 2284, 2285, 2287 and 2288, some of the semi synthetic derivatives were also identified as dual agonists like magnolol, honokiol, the derivatives 752, 753 and 758. Dieugenol, tetrahydro-dieugenol as well as the neolignan derivatives 754 and 759 were identified as PPAR $\gamma$ -agonists.

The achieved results indicate that diverse neolignan derivatives structures show RXR $\alpha$ -modulating activity, while the propyl- or propylene groups, on both benzene rings, are important for the PPAR $\gamma$ -modulating activity.



---

## Zusammenfassung

---

Die beiden nukleären Rezeptoren RXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  sind in der Wissenschaft als bedeutende Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit metabolischen Krankheiten und Krebs bekannt. Diabetes Typ II, Metabolisches Syndrom sowie Krebs gehören zu den weit verbreiteten „Zivilisationskrankheiten“. Etwa 60 Millionen Menschen in Europa leiden unter Diabetes Typ II und etwa 13,1 Millionen Krebs-Todesfälle werden für das Jahr 2030 weltweit prognostiziert. Diese nukleären Rezeptoren sind an Fett- und Glucosestoffwechsel beteiligt und ein kombinierter therapeutischer Einsatz dieser RXR $\alpha$ - und PPAR $\gamma$ -Agonisten bringt, laut einigen Studien, signifikante Vorteile.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, aus einem Set semi- und vollsynthetischer Neolignanderivate entsprechende Rezeptoragonisten zu identifizieren. Die Screeningexperimente wurden in HEK-293 Zellen unter Anwendung eines Luciferase- und eines GFP-Reportergens durchgeführt. Dabei wurde in Transfektionsexperimenten sowohl RXR $\alpha$ - als auch PPAR $\gamma$ -modulierende Genexpression simuliert. Ein weiteres Ziel ist innerhalb Rahmen eines größeren Projekts die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Neolignanderivaten und den in dieser Arbeit verwendeten nukleären Rezeptoren herzustellen.

Mittels Luciferase Reportergen Assay konnten einige neue Agonisten eruiert werden. Während sich die vollsynthetischen Derivate entweder als inaktiv oder als selektive RXR $\alpha$ -Agonisten wie die Derivate 2284, 2285, 2287 und 2288 herausstellten, konnten aus dem Set semisynthetischer Derivate auch duale Agonisten wie Magnolol, Honokiol, Derivate 752, 753 und 758 identifiziert werden. Dieugenol, Tetrahydrodieugenol sowie Neolignanderivate 754 und 759 wurden als PPAR $\gamma$ -Agonisten identifiziert.

Die erzielten Resultate weisen darauf hin dass diverse Neolignanderivatstrukturen eine RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität zeigen, während für eine PPAR $\gamma$ -modulierende Aktivität Propyl- bzw. Propylengruppen an beiden Benzenringen bedeutend sind.



---

# INHALTSVERZEICHNIS

---

## A. INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>II</b>
<b>B.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>1</b>	<b>NUKLEARE REZEPTOREN (NR)</b> .....	<b>2</b>
1.1	Nicht-Steroidrezeptoren.....	4
1.1.1	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) gamma .....	4
1.1.2	Retinoid-X-Rezeptor (RXR)-alpha .....	6
<b>2</b>	<b>PPAR<math>\gamma</math>-RXR<math>\alpha</math> CROSS-TALK</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>DNA-ERKENNUNGSSEQUENZEN</b> .....	<b>10</b>
3.1	Peroxisom-Proliferator-Response Element (PPARE).....	10
3.2	Retinoid-X-Response Element (RXRE).....	12
<b>4</b>	<b>GRÜN FLUORESZIERENDES PROTEIN (EGFP)</b> .....	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>NEOLIGNANE</b> .....	<b>15</b>
5.1	Magnolol .....	15
5.2	Honokiol.....	17
5.3	Dieugenol .....	18
5.4	Tetrahydrodieugenol.....	18
<b>6</b>	<b>ZIEL DER DIPLOMARBEIT</b> .....	<b>20</b>

<b>C.</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>22</b>
<b>1</b>	<b>MATERIAL ZUR PLASMID HERSTELLUNG</b> .....	<b>22</b>
1.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	22
1.2	<i>E. coli</i> Transformation.....	22
1.3	DNA-Miniprep Herstellung.....	23
1.4	DNA-Midiprep Herstellung.....	24
<b>2</b>	<b>MATERIAL ZUR ANALYTISCHEN PLASMID RESTRIKTION</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL FÜR DIE GELELEKTROPHORESE</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL IN DER ZELLKULTUR UND FÜR DEN LUCIFERASE ASSAY</b> .....	<b>27</b>
4.1	Splitten und Aussaat von HEK-293 Zellen .....	27
4.2	Transfektion von HEK-293 Zellen.....	27
4.3	Herstellung der Testsubstanzen-Lösungen.....	28
4.4	Nachsaat von HEK-293 Zellen.....	29
4.5	Luciferase Assay Messung und Auswertung.....	29
<b>5</b>	<b>MEDIEN- UND REAGENTIENZUSAMMENSETZUNGEN</b> .....	<b>31</b>
<b>D.</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>35</b>
<b>1</b>	<b>METHODEN ZUR PLASMIDHERSTELLUNG</b> .....	<b>35</b>
1.1	Vorbereitung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	35
1.2	Transformation der Bakterienzellen.....	35

1.3	DNA Minipreps .....	35
1.3.1	Herstellung bakterieller Glycerinkonzentrate.....	36
1.4	DNA Midipreps .....	36
<b>2</b>	<b>ANALYTISCHE PLASMID RESTRIKTION .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>GELELEKTROPHORESE .....</b>	<b>41</b>
3.1	Probenvorbereitung .....	41
3.2	Herstellung des Gels .....	41
3.3	Auftragung der Proben und Elektrophorese .....	41
<b>4</b>	<b>METHODEN DER ZELLKULTUR.....</b>	<b>42</b>
4.1	Die Zellkultur.....	42
4.2	Auftauen von Zellen.....	42
4.3	Kultivierung von HEK-293 Zellen.....	42
4.4	Zellsplitten und Passagieren .....	42
<b>5</b>	<b>LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAY MIT HEK-293 ZELLEN.....</b>	<b>43</b>
5.1	Durchführung des Luciferase Reportergen Assays.....	43
5.2	Spezielle Bedingungen bei der Durchführung des Luciferase Reportergen Assays ...	43
5.2.1	Splitten und Aussähen der HEK-293 Zellen .....	43
5.2.2	Transfektion.....	43
5.2.3	Herstellung von Testsubstanz-Lösungen .....	44
5.2.4	Aussaat der transfizierten HEK-293 Zellen in 96 well Platten .....	45
5.2.5	Messung und Auswertung des Luciferase Reportergen Assays.....	46

5.3	Datenanalyse.....	48
<b>E.</b>	<b>RESULTATE .....</b>	<b>52</b>
<b>1</b>	<b>HERGESTELLTE PLASMIDE FÜR DEN LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAY .</b>	<b>52</b>
<b>2</b>	<b>RESULTATE DER LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAYS MIT HEK-293 ZELLEN .....</b>	<b>53</b>
2.1	Aktivierung von PPAR $\gamma$ durch Pioglitazon.....	53
2.2	Aktivierung von RXR $\alpha$ durch Alitretinoin (mit TM <sub>2</sub> ).....	55
2.3	Aktivierung von RXR $\alpha$ durch Alitretinoin (mit TM <sub>3</sub> ).....	55
2.4	Untersuchung von Neolignanderivaten auf die PPAR $\gamma$ -Aktivität .....	56
2.4.1	Synthetische Neolignanderivate und deren PPAR $\gamma$ -Aktivität .....	56
2.4.2	Die PPAR $\gamma$ -Aktivität der semisynthetischen Neolignane.....	57
2.5	Untersuchung von Neolignanderivaten auf RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM <sub>2</sub> ) .....	58
2.5.1	Synthetische Neolignanderivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität .....	58
2.5.2	Die RXR $\alpha$ -Aktivität der semisynthetischen Neolignane.....	58
2.6	Untersuchung von Neolignanderivaten auf RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM <sub>3</sub> ) .....	59
2.6.1	Synthetische Neolignanderivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität .....	59
2.6.2	Semisynthetischen Neolignane und deren RXR $\alpha$ -Aktivität .....	60
<b>3</b>	<b>VERGLEICH VON RXR<math>\alpha</math>-AGONISTEN UND DEREN TRANSAKTIVIERUNGS-AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VOM RESPONSE ELEMENT (PPARE UND RXRE).....</b>	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>ÜBERBLICK ALLER GETESTETEN NEOLIGNANDERIVATE.....</b>	<b>62</b>

<b>F.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>1</b>	<b>LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAY .....</b>	<b>64</b>
<b>2</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN VON NEOLIGNANDERIVATEN AUF DEREN POTENTIAL ZUR PPAR<math>\gamma</math>-MODULATION .....</b>	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN VON NEOLIGNANDERIVATEN AUF DEREN POTENTIAL ZUR RXR<math>\alpha</math>-MODULATION (BEI TM<sub>2</sub>).....</b>	<b>68</b>
3.1	RXR $\alpha$ -Homodimere bei Transfektionsmischung 2 .....	70
<b>4</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER NEOLIGNANDERIVATE AUF DEREN POTENTIAL ZUR RXR<math>\alpha</math>-MODULATION (BEI TM<sub>3</sub>).....</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>RXR<math>\alpha</math>-AKTIVITÄT DER NEOLIGNANE IN ABHÄNGIGKEIT VON PPARE- UND RXRE-VERMITTELTEN TRANSAKTIVIERUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>AKTIVE NEOLIGNANE UND DEREN BEDEUTUNG .....</b>	<b>76</b>
<b>G.</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>78</b>
<b>H.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>88</b>
<b>1</b>	<b>SEMISYNTHETISCHE NEOLIGNANDERIVATE .....</b>	<b>88</b>
<b>2</b>	<b>SYNTHETISCHE NEOLIGNANDERIVATE .....</b>	<b>91</b>
<b>3</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>92</b>
<b>4</b>	<b>CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>96</b>

**5 DANKSAGUNG.....97**



---

# EINLEITUNG

---

## B. EINLEITUNG

### 1 NUKLEÄRE REZEPTOREN (NR)

Unter nukleären Rezeptoren versteht man multifunktionelle ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Zielgenen regulieren, indem sie deren Transkription entweder aktivieren oder supprimieren. Nukleäre Rezeptoren zeigen unterschiedliche Aktivitätsmuster, je nachdem ob sie als Homo- oder Heterodimer (mit verschiedenen Heterodimer-Partnern) an ihr Zielgen binden. Bisher wurden nukleäre Rezeptoren ausschließlich in tierischen Zellen gefunden. Bei *homo sapiens* wurden bislang ca. 50 [52] verschiedene NRs nachgewiesen, deren Molekulargewicht zwischen 50 und 100 kD liegt [88]. Charakteristisch für alle bisher bekannten nukleären Rezeptoren ist deren molekularer Aufbau aus konservierten Domänen.

Aufbau der nukleären Rezeptoren:

**A/B**- Aktivierungsdomäne am Amino-Terminalbereich,

**C**- hochkonservierte DNA-Bindedomäne (DBD),

**D**- Zwischenbereich der zwei Bindedomänen C und E,

**E**- weniger konservierte Liganden-Bindedomäne (LBD),

**F**- zweite Aktivierungsdomäne am Carboxy-Terminalbereich.

Die Sequenzlängen der oben genannten Domänen sind unterschiedlich (s. **Abbildung 1**).

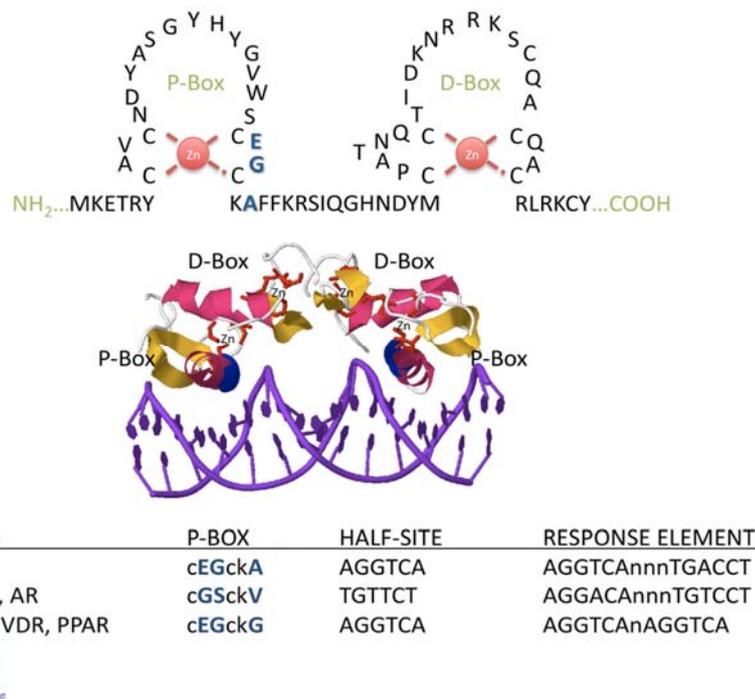


**Abbildung 1. Darstellung der NR-Domänen. Die dargestellten Domänen A bis F zeigen schematisch das Verhältnis derer Sequenzlängen. Die LBD dominiert mit ihrer Sequenzlänge.**

Die A/B-Aktivierungsdomäne kann auch in Abwesenheit eines Liganden die Expression von Zielgenen mit der Aktivierungsfunktion AF-1 modulieren, während die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion AF-2, die sich am Carboxy-Teil der LBD befindet, erst nach Ligandenbindung aktiv wird [52, 82]. Größte strukturelle Variabilität zeigt die A/B-Domäne, sie tritt auch mit anderen Transkriptionsfaktoren in Interaktion.

Auf die A/B-Domäne folgt die DNA-Bindedomäne, bestehend aus 40 bis 100 Aminosäuren (AS), innerhalb der eine konservierte Kernsequenz mit ca. 65 AS liegt [82]. Für die Kernsequenz sind zwei Zinkfinger-Motive charakteristisch, jedes bestehend aus einem Zinkatom,

das von jeweils zwei Cystein-Paaren koordiniert wird, so dass es zur Ausbildung von zwei  $\alpha$ -Helices kommt [108]. Der erste Zinkfinger (am NH<sub>2</sub>-Ende) bildet eine P-Box, während der zweite Zinkfinger (am COOH-Ende) eine D-Box bildet (s. **Abbildung 2**).



**Abbildung 2.** Zinkfinger-Motive der DBD mit P- und D-Box. Die beiden Zinkatome werden jeweils durch vier Cystein-AS umkreist und stabilisiert. Die P-Box der zehn hier angeführten NR unterscheidet sich nur durch drei Aminosäuren [33].

Beide Zinkfinger sind sowohl für die DNA-Erkennung [100] als auch für die Rezeptor Dimerisierung wichtig [78, 81, 106].

Zwischen DBD und LBD liegt die D-Domäne, verantwortlich für die nukleare Lokalisation der Rezeptoren.

Die Liganden-Bindedomäne besteht aus 11 bis 13  $\alpha$ -Helices und verfügt über mehrere Funktionen; einerseits Ligandenbindung, andererseits aber auch Aktivierung der Transkription, Dimerisierung und bei einigen NRs auch die Bindung von Corepressoren [82]. Am Carboxy-Ende der LBD ist die ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion (AF-2) lokalisiert, die zudem die am meisten konservierte Region der LBD darstellt [82]. Spezifische Rezeptor-Dimerisierungen entscheiden welche Coaktivatoren oder Corepressoren zum Transkriptionskomplex rekrutiert werden [22].

Auf die AF-2 folgt die F-Domäne die den Carboxy-Terminalrest des NR darstellt. Diese Domäne ist bei den meisten NRs, wie auch bei PPAR und RXR, nicht vorhanden [82].

Nukleäre Rezeptoren lassen sich in drei Gruppen einteilen (s. **Tabelle 1**). Viele verfügen darüber hinaus noch über zwei oder mehrere Varianten, die auf separate Gene oder alternatives mRNA-*Splicing* (Isoformen und -typen) zurückzuführen sind [48].

NR- GRUPPEN	VERTRETER
1. Steroidrezeptoren	Östrogen-, Progesteron-, Testosteron-, Glukokortikoid-, Mineralkortikoidrezeptoren
2. Nicht-Steroidrezeptoren	RXR, RAR, TR, VDR, PPAR
3. Orphan Rezeptoren	NGFI-B, GCNF, TR2

**Tabelle 1.** Die drei verschiedenen Typen nukleärer Rezeptoren und einige deren Vertreter [48]. RXR-Retinoid X Rezeptor, RAR-*all-trans* Retinoidsäure Rezeptor, TR-Thyroid Hormonrezeptor, VDR-Vitamin D Rezeptor, PPAR-Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, NGFI-B-*Nerve Growth factor B*, GCNF-*germ cell nuclear factor*, TR2-Thyroid Rezeptor 2.

## 1.1 Nicht-Steroidrezeptoren

Nicht-Steroidrezeptoren zeigen hohe Affinität zur DNA und können auch ohne Liganden an verschiedene Response Elemente (RE) binden [48]. Zu dieser Gruppe von NRs gehören neben dem in dieser Arbeit verwendeten RXR (Retinoid X Rezeptoren) und PPAR (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor), auch folgende Rezeptoren: RAR (*all-trans* Retinoidsäure Rezeptor), TR (Thyroid Hormonrezeptor), VDR (Vitamin D Rezeptor), LXR (Leber X Rezeptor), PXR (Pregnan X Rezeptor), FXR (Farnesoid X Rezeptor), CAR (Constitutive androstane Rezeptoren), HNF-4 (Hepatozyten Kernfaktor-4) und SF-1 (*Steroidogenic factor 1*)[88].

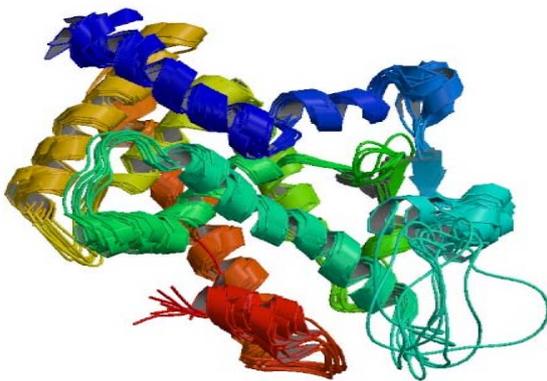
Von allen NRs besitzt RXR eine zentrale Rolle in der Hormon-Signalleitung, da er in der Lage ist mit einer Vielzahl von Partnern (wie RAR, VDR, TR, und PPAR) Heterodimere zu bilden [108]. Die Vielfältigkeit der Transkriptionsprodukte und deren Effekte sind auf zahlreiche Kombinationen von Rezeptoren, sowie deren Isotypen und Isoformen zurückzuführen.

### 1.1.1 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) gamma

Diese Rezeptoren gehören zur nukleären Rezeptorsubfamilie 1, Gruppe C und Mitglied 3, weswegen sie manchmal auch mit der Abkürzung NR1C3 bezeichnet werden [83]. In der Mausleber wurden Proteine entdeckt, die zur Proliferation von Peroxisomen führten, wodurch der Name „Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren“ (PPAR) zustande kam [56]. Der in den 1990ern zuerst entdeckte PPAR, wird heute zum Subtyp PPAR $\alpha$  gezählt, da in Folge auch noch die weiteren Subtypen PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  entdeckt wurden. Der PPAR $\gamma$  ist einer der besterforschten NRs dank seiner vielfältigen klinischen Relevanz [28, 65, 91]. Beim Menschen unterscheidet man zwischen zwei Isoformen von PPAR $\gamma$ , einerseits  $\gamma_1$ -

Rezeptoren, die in fast allen Geweben außer Muskelzellen vorhanden sind und  $\gamma_2$ -Rezeptoren, die überwiegend in den Fettgeweben und im Gastrointestinal-Trakt zu finden sind [89]. Eine höhere Expression von PPAR $\gamma$  wurde bis jetzt im Herz, Pankreas, Leber, Kolon Epithelzellen und in Zellen des Immunsystems wie den Splenozyten, T-Helfer Zellen und Makrophagen, gefunden [15, 51, 87]. Insgesamt gesehen befinden sich die höchsten Expressionslevels von PPAR $\gamma$  im Fettgewebe [2].

Die entzündungshemmende Wirkung einer Aktivierung von PPAR $\gamma$  wurde durch die Senkung von IL-8 gezeigt. Dieses Interleukin ist ein Biomarker für Entzündung, deren Konzentrationssenkung mit der Abnahme der Entzündung korreliert [64].



**Abbildung 3. Kristallstruktur der PPAR $\gamma$ -LBD (AS 235-504)[39].**

Wie bei allen NRs, besteht auch PPAR $\gamma$  aus mehreren Domänen. Von besonderem Interesse bei PPAR $\gamma$  ist die LBD mit ihrer großen hydrophoben Bindungstasche, die die Bindung einer Vielzahl von strukturell sehr diversen Liganden ermöglicht. Sie ist mit der LBD von RXR $\alpha$  vergleichbar und besteht aus 15  $\alpha$ -Helix und vier  $\beta$ -Strängen (s. **Abbildung 3**) [47].

Als endogene Liganden des PPAR $\gamma$  sind ungesättigte Fettsäuren und Eikosanoide bekannt. Der PPAR $\gamma$  ist in der Expression von Genen involviert, die den Glucose- und Fettmetabolismus regulieren [16]. Deswegen sind diese Rezeptoren als mögliche Targets für diverse metabolische Krankheiten wie Übergewicht, Diabetes, Entzündungen, Hypertonie, nicht alkoholische Fettleber, Krebs und Atherosklerose interessant [12, 23]. PPARs spielen außerdem eine essentielle Rolle bei der Embryonalentwicklung[104]. PPAR $\gamma$ -Agonisten sind bereits jetzt in klinischer Anwendung bei Hyperglykämie, Hyperinsulinämie [55] sowie Senkung der Triglyceride in Fettzellen, Muskeln und Leber. Weitere Schlüsselfunktionen von PPAR $\gamma$  sind die Differenzierung von Adipozyten sowie die Triglyzeridsynthese [89].

Die Expression von PPAR $\gamma$  in Adipozyten wird durch einige Substanzen stimuliert, die sich schließlich auch als PPAR $\gamma$ -Agonisten herausgestellt haben. Zu ihnen gehören Prostaglandin J<sub>2</sub>, Thiazolidindione, sowie die Nichtsteroidalen Entzündungshemmer (NSAIDs) [46].

Thiazolidindione (TZD) wie Rosiglitazon und Pioglitazon, sind prototypische synthetische PPAR $\gamma$  Liganden, weswegen PPAR $\gamma$  auch manchmal als Glitazon-Rezeptor bezeichnet wird. Klinische Anwendung finden sie als hochwirksame *Insulinsensitizer* [55, 79], deren Anwendungspotential allerdings durch ausgeprägte Nebenwirkungen wie Übergewicht, Knochenfrakturen, Fluidretention und Herzinsuffizienz stark eingeschränkt ist [84]. Neue PPAR $\gamma$  Agonisten mit besserem Sicherheitsprofil zu finden ist daher Ziel intensiver Forschungsbemü-

hungen [107]. Dadurch das TZD als volle Agonisten maximale Rezeptoraktivität zeigen, wird von Partialagonisten, die geringere Affinität aufweisen auch ein geringeres Nebenwirkungspotential erwartet. Es wurde beobachtet, dass einige Partialagonisten im Vergleich zu TZD andere Coaktivatoren rekrutieren, was in anderen Transkriptionseffekten resultiert [10].

Proteine, die für die Expression von Genen notwendig sind, werden als nukleäre Coaktivatoren (N-CoA) bezeichnet [52]. Einige NR-Coaktivatoren besitzen intrinsische Histonacetylierungsaktivität [77, 96]. Sie führen zu Hyperacetylierung der Histone, wodurch die Promotersequenzen von Zielgenen zugänglich für Rezeptoren werden und die Transkriptionsaktivierung stattfinden kann. Der PPAR rekrutiert nach seiner Aktivierung verschiedene Coaktivatoren, wie z. B. den Steroid Rezeptor Coaktivator 1 (SRC1) [105]. Einige weitere PPAR-Coaktivatoren sind PPAR Binding Protein (PBP), PPAR $\gamma$  Coaktivator 1 und 2 (PCG), als auch das Androgen Rezeptor assoziiertes Protein 70 [26, 110]. Umgekehrt zu den Coaktivatoren, verhalten sich die NR-Corepressoren: sie führen zur Hypoacetylierung und blockieren somit die Bindung aktivierter Rezeptorkomplexe an die DNA [27, 75].

### 1.1.2 Retinoid-X-Rezeptor (RXR)-alpha

Der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) gehört zur nukleären Rezeptorsubfamilie 2, Gruppe B und Mitglied 1, abgekürzt mit der Bezeichnung NR2B1 [30]. Von diesem Rezeptor existieren drei Isotypen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) und zusätzlich noch für jeden Isotyp zwei Isoformen [72]. RXRs bilden Homodimere und Heterodimere mit über 20 verschiedenen nukleären Rezeptoren und binden an verschiedene Response Elemente [57]. Die Heterodimere werden entweder als permissiv oder nicht permissiv klassifiziert [20]. Permissive Heterodimere können durch Liganden von RXR $\alpha$  oder deren Partner aktiviert werden [67]. Nicht permissive Heterodimere werden überwiegend durch Liganden der Rezeptor-Partner aktiviert und können laut neuerer Studien unter gewissen Bedingungen aber auch nur durch RXR $\alpha$ -Liganden aktiviert werden [85].

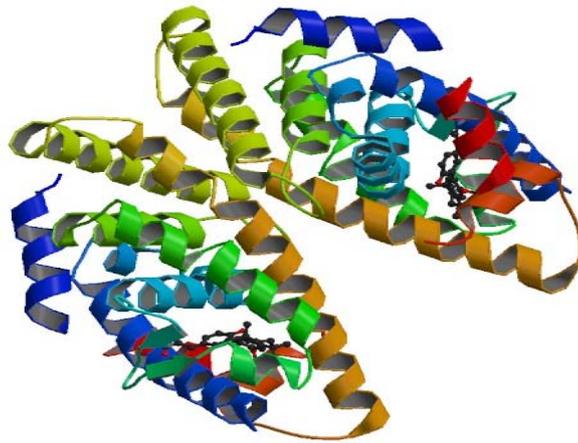
RXRs sind je nach Isotyp in verschiedenen Geweben vorhanden, wobei RXR $\alpha$  vor allem in Leber, Niere, Epidermis und GI-Trakt exprimiert wird.

Die hRXR $\alpha$  DBD (DNA-Bindungsdomäne) besteht aus einer konservierten Hauptsequenz („Core DBD“); dem Rest 1-66 AS und dem C-Terminalen Teil, der auch als T-Box bezeichnet wird und zuständig für die kooperative Dimerisierung an das Response Element ist. Die „Core DBD“ beinhaltet zwei Zinkfingerstrukturen [108] in denen zwei Zinkatome von jeweils 4 Cysteinen umgeben sind und jeweils eine  $\alpha$ -Helix bilden. Da die RXR DBD flexibel ist, kann sie sich strukturell verändern, um sich der DBD verschiedener NR Partner anzupassen [8].

Die RXR $\alpha$ -LBD besteht aus 12  $\alpha$ -Helices (H1-H12) und zwei kurzen  $\beta$ -Strängen (s1 und s2) die ein antiparalleles  $\alpha$ -Helikalsandwich formen [6]. Die große hydrophobe Bindungstasche von RXR erlaubt Bindung von vielen verschiedenen Liganden, ein Beispiel ist in der **Abbildung 4** zu sehen.

Eine relativ kurze Region der LBD (AS 413-443) ist für die Dimerisierung verantwortlich [8].

RXR $\alpha$  spielt bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie Zellproliferation, Entzündung, Apoptose als auch bei der Haut- und Energiehomöostase, eine Rolle [21, 97].



**Abbildung 4.** Ein RXR $\alpha$  Homodimer mit dem Liganden 3-(2'-methoxy)-tetrahydronaphthyl cinnamic acid (in Schwarz eingezeichnet) [36].

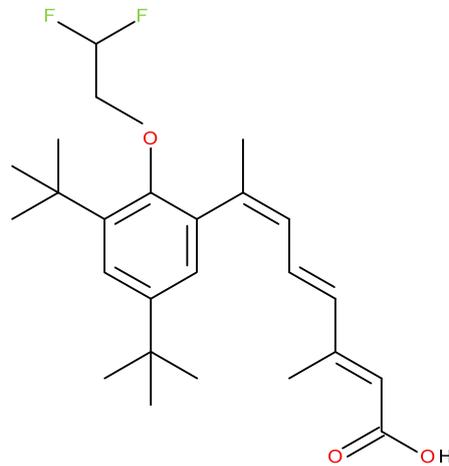
Die Behandlung von Mäusen in präklinischen Studien mit RXR $\alpha$ -Agonisten senkte den Blutzuckerspiegel, erhöhte die Insulinsensitivität und zeigte gewichtsreduzierende Effekte [71]. In einigen Studien wurde gezeigt dass RXR-Agonisten die Aufnahme und  $\beta$ -Oxidation von gesättigten Fettsäuren in kultivierten Skelettmuskeln von Diabetikern fördern [54]. Außerdem wirken sie *in vitro* schützend auf Cardiomyocyten[90] und Endothelzellen der Venen [7], die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Glucose induzierten oxidativen Stress beschädigt werden. Ähnlich wie bei PPAR $\gamma$  zeigt die Aktivierung von RXR $\alpha$  antiarthritische Effekte [74]. Eine weitere wichtige Funktion von RXR $\alpha$  ist deren Beteiligung an der Embryogenese [68]. Allerdings wurden bei einigen Rexinoiden (selektive RXR-Liganden) *in vivo* als Nebenwirkungen eine Erhöhung der Triglyceride, Hepatomegalie sowie Blockierung der Thyroidhormon-Achse beobachtet [54].

Natürliche oder synthetische Modulatoren von RXR werden als Retinoide oder Rexinoide bezeichnet [72]. Bis jetzt sind noch nicht viele selektive RXR $\alpha$ -Agonisten entdeckt worden [72].

Als endogene RXR $\alpha$ -Liganden sind Alitretinoin (9-cis Retinoidsäure), Phytansäure sowie ungesättigte Fettsäuren (wie DHA-Docosahexaensäure) bekannt. Die physiologische Bedeutung von Alitretinoin als RXR Ligand ist noch nicht endgültig geklärt [103].

Einer der wenigen selektiven RXR Agonisten ist eine Substanz mit der Bezeichnung LG101506 (s. **Abbildung 5**), die als Insulinsensitizer wirkt [60].

Der einzige bislang klinisch eingesetzte RXR Agonist ist Bexaroten, der an alle drei Isotypen binden kann [24].



**Abbildung 5.** LG101506; (2E, 4E, 6Z)-7-[2-(2,2-Difluoroethoxy)-3,5-bis(1,1-dimethylethyl)phenyl]-3-methyl-2, 4, 6-octatrienoic acid.

Verwendung findet Bexaroten bei verschiedenen Krebsbehandlungen (zB. Lungenkrebs [102], T- Zell Lymphome [80], Brustkrebs [92]) als auch bei der Behandlung von diversen Hauterkrankungen [72].

## 2 PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ CROSS-TALK

RXR spielt in der Signalleitung vieler NR eine zentrale Rolle, da er mit über 20 NRs Dimere bildet. Einer seiner, in Hinblick auf die bisher erkannte klinische Relevanz, wichtigsten Partner ist PPAR $\gamma$ . Liganden die PPAR $\gamma$  oder RXR $\alpha$  aktivieren, können zur Bildung von PPAR-RXR-Heterodimeren führen [57]. Beide, PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$ , können auch durch denselben Liganden aktiviert werden, wie das beispielsweise mit DHA gezeigt wurde [45]. Ligandenaktivierte PPAR und RXR können auch Homodimere bilden und an die DNA binden, aber es besteht in der Literatur weitgehend Einigkeit darüber, dass um alle bekannten Funktionen zu entfalten, PPAR-RXR Heterodimere benötigt werden [8]. PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Heterodimere präferieren die Bindung an DR1 (*direct repeat*) und DR2 Sequenzen (s. Kapitel 3.2), ebenso wie RXR $\alpha$ - Homodimere [108].

Duale Agonisten werden in der Literatur positiv bewertet, da einige Studien von synergistischen Effekten durch Kombinationsbehandlungen mit PPAR- und RXR-Agonisten berichten. Vor allem zur Behandlung bzw. Prävention von Krebserkrankungen scheint die Kombinationstherapie mit PPAR- und RXR-Agonisten vielversprechend zu sein [5, 53, 94].

### 3 DNA-ERKENNUNGSSEQUENZEN

DNA-Erkennungssequenzen sind spezifische DNA-Abschnitte, die von nukleären Rezeptoren erkannt werden. Einige NRs befinden sich bereits auf ihren spezifischen DNA-Abschnitten, den sogenannten Response Elementen (RE). Ob es zu einer Aktivierung oder Suppression von Zielgenen kommt, hängt auch entscheidend davon ab, welche Cofaktoren rekrutiert werden. Ligandbindung führt zu spezifischen Änderungen der Rezeptorkonformation, wodurch bestimmt wird welche Proteine weiter binden können. Derselbe NR kann auch an verschiedene RE binden und sie aktivieren oder supprimieren [108]. In **Abbildung 6** sind exemplarisch mehrere verschiedene Erkennungssequenzen, die sich alle auf demselben Gen befinden, dargestellt. Von RXR sind bis jetzt sechs Isoformen und Isotypen bekannt, die in Kombination mit einem seiner zahlreichen Partner, der jeweils wieder in mehreren Isoformen und Isotypen vorkommt, eine hohe Anzahl an Heterodimer-Kombinationen bilden. Das hat zur Folge, dass je nach Dimerisierungspartner, verschiedene Gene transkribiert werden, was wiederum zu verschiedenen Effekten führt [72].

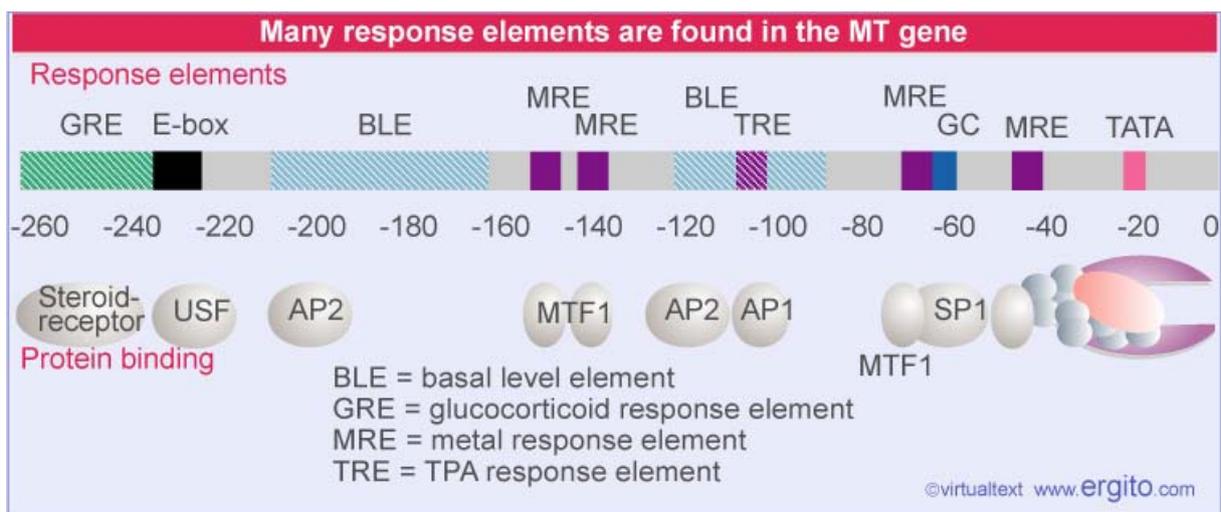
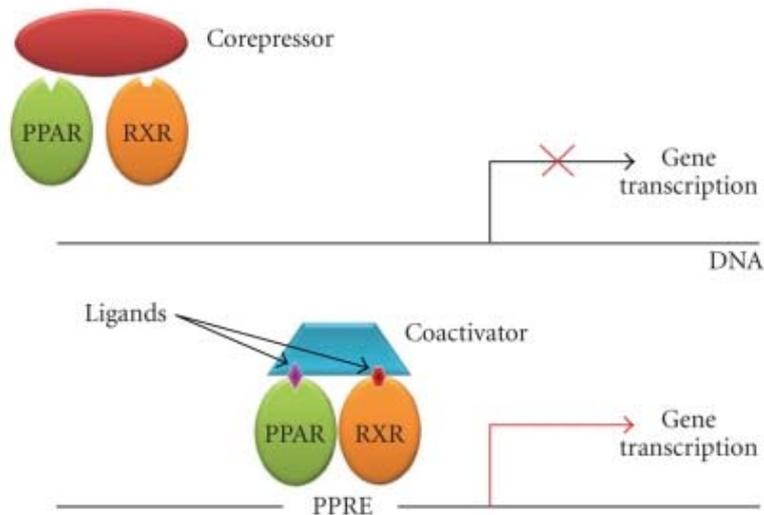


Abbildung 6. Response Elemente verschiedener Transkriptionsfaktoren in Metallothionein-Genen [62].

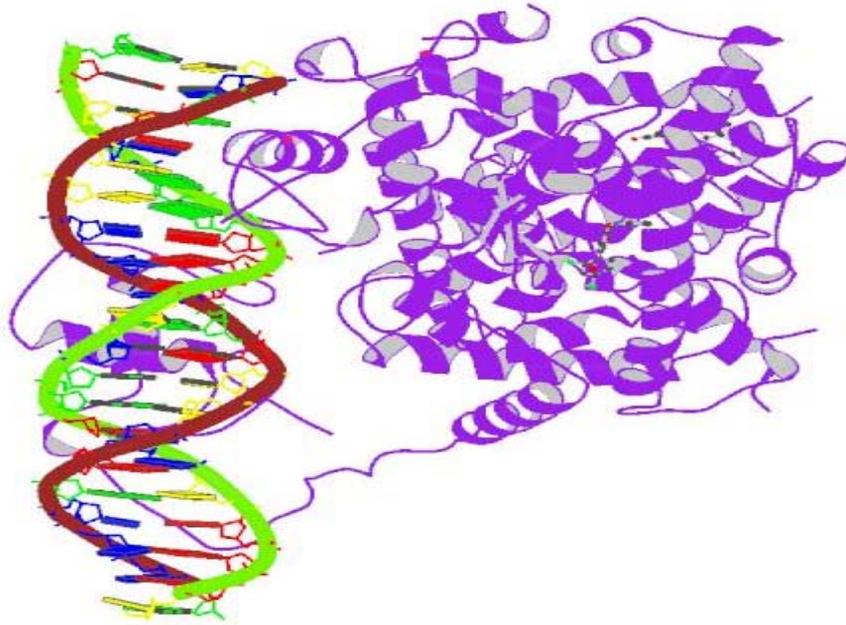
#### 3.1 Peroxisom-Proliferator-Response Element (PPARE)

An das PPARE bindet ein Komplex aus Rezeptoren, die vorher durch Liganden zu Konformationsänderung und Dimerisierung angeregt wurden, wodurch Corepressoren freigesetzt werden und Coaktivatoren binden können (s. **Abbildung 7**).



**Abbildung 7. Mechanismus der Bindung an das PPARE.** An inaktiven Rezeptor-Komplexen sind Corepressoren gebunden. Aktivierter PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Komplex mit Liganden und Coaktivator bindet an PPARE und führt zu Gentranskription [61].

Das PPARE ist auf einem Acyl-CoA Oxidase (AOX)-Promoter loziert und besteht aus zwei direkt wiederholten Sequenzen, die als *direct repeat* (DR) bezeichnet werden und durch ein Nukleotid getrennt sind [50]. Bei PPARE lautet diese Sequenz **AGG(A/T)CA**. Oberhalb der DR befindet sich bei PPARE die konservierte Verlängerungssequenz AAAC [44]. Die Kristallstruktur von PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  zeigt das die *hinge* Region von PPAR $\gamma$  die konservierte AAAC Sequenz von PPARE erkennt und so spezifische Bindung erlaubt [9]. In **Abbildung 8** ist die Kristallstruktur eines PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Dimers und dessen Interaktion mit der DNA dargestellt. Interessanterweise wird diese Interaktion auch vom Vorhandensein anderer nukleärer Rezeptoren beeinflusst. So wurde in einer Studie gezeigt, dass unterschiedliche Levels an LXR mit der Bindungsaffinität des PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Komplex an PPARE korrelieren [43].



**Abbildung 8.** Intakter PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Komplex (rechts) an der DNA (links) gebunden mit Ligand BVT.13, 9-cis Retinoidsäure und Coaktivator NCOA2 Peptid (rechts im PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Komplex). Die PPAR $\gamma$ -LBD kooperiert mit beiden DBD um an DNA zu binden [37].

### 3.2 Retinoid-X-Response Element (RXRE)

Die spezifische Sequenz der DNA an die RXR mit seinen Partner bindet, besteht aus den zwei wiederholbaren Nukleotidreihenfolgen (DR) **5'-AGGTCA-n<sub>x</sub>-AGGTCA-3'**. Zwischen diesen DRs können ein bis fünf beliebige Nukleotide sein und je nach dem werden sie als DR1, DR2, DR3, DR4 oder DR5 bezeichnet. In **Tabelle 2** sind RXR-Komplexe mit jenen DRs die sie präferieren, angeführt. RXR kann nicht als Monomer, sondern ausschließlich entweder als Homodimer oder mit seinen Partnern wie RAR, PPAR, VDR oder LXR mit denen Heterodimere ausgebildet werden an RXRE binden, wobei mehrere NR-Komplexe die gleichen DRs teilen. RXR-Homodimere binden an DR1 und DR2 wobei die Bindung an DR1 mit etwas höherer Affinität erfolgt [108].

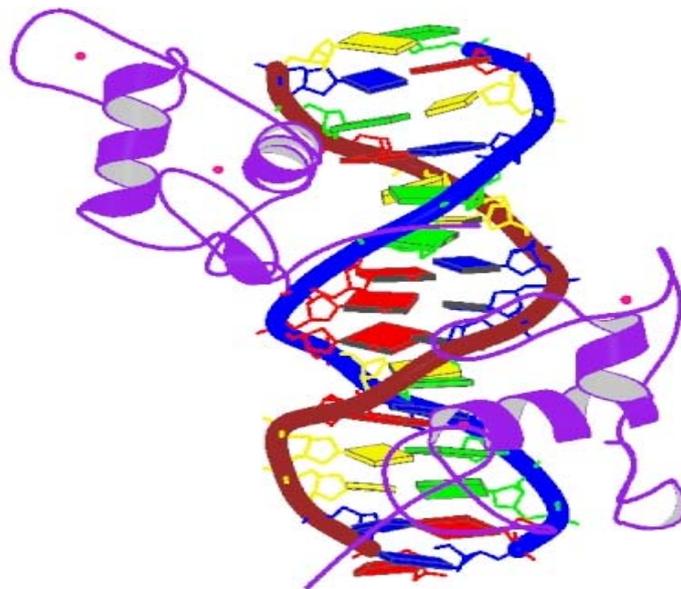
DR	DNA- Sequenz	RXR- Partner
DR1	AGGTCA <sub>n</sub> AGGTCA	RAR
	TCCAGT <sub>n</sub> TCCAGT	PPAR
		RXR
DR2	AGGTCA <sub>n</sub> AGGTCA	PPAR
	TCCAGT <sub>n</sub> TCCAGT	RAR
		RXR
DR3	AGGTCA <sub>n</sub> AGGTCA	VDR
	TCCAGT <sub>n</sub> TCCAGT	

<b>DR4</b>	AGGTCAnnnnAGGTCA	TR
	TCCAGTnnnnTCCAGT	LXR
<b>DR5</b>	AGGTCAnnnnnAGGTCA	RAR
	TCCAGTnnnnnTCCAGT	

**Tabelle 2.** Überblick der DR 1-5 und RXR-Komplexe die an sie binden[108]. n-Nukleotid.

Somit zeigt sich, dass das DNA Response Element als ein allosterischer Effektor fungiert, da die DNA Bindungsstelle verschiedene Rezeptorkonformationen und Signalwege erlauben [59]. Die DR Sequenz ist asymmetrisch und kann nur in einer Richtung korrekt gelesen werden dadurch kann der NR-Komplex nur in einer Orientierung binden, weswegen sie auch *direct repeats* heißen [19, 66].

In der **Abbildung 9** bindet ein RXR $\alpha$ -Homodimer an die DNA-Erkennungssequenz.



**Abbildung 9.** Kristallstruktur der RXR $\alpha$ -DBD (lila) an der DNA (Mitte) [34]. Eine RXR $\alpha$ -DBD bindet an das 5'-Ende und die zweite RXR $\alpha$ -DBD an das 3'-Ende des Response Element.

## 4 GRÜN FLUORESZIERENDES PROTEIN (EGFP)

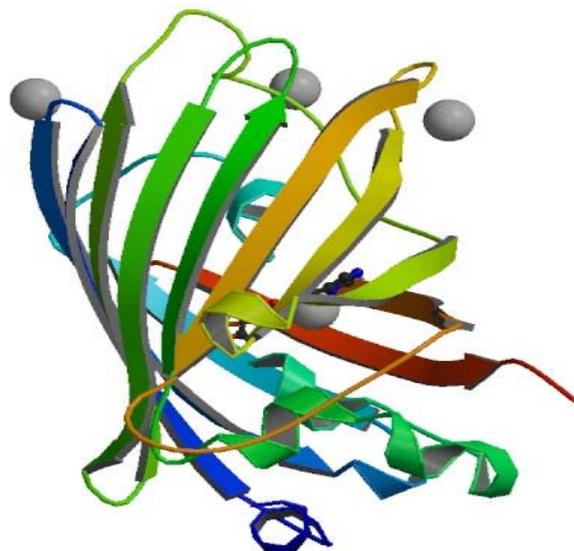
EGFP (engl. *enhanced green fluorescent protein*) wurde 1961 vom japanischen Biochemiker Osamu Shimomura in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt [93]. Der Wissenschaftler Martin Chalfie ist für die Einführung von EGFP in die Biowissenschaften verantwortlich. Shimomura O., Chalfie M. und Roger Y. haben für die Entdeckung und Entwicklung von EGFP 2008 den Nobelpreis gekriegt.

Dieses Protein fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht, wobei EGFP die Funktion eines Energie-Transfer-Akzeptors einnimmt. Die blaue Chemilumineszenz der Qualle ist durch die Beteiligung anderer Proteine erklärbar.

EGFP hat in der Forschung ein weites Spektrum an Anwendungen, das von seiner Verwendung als Biosensor, Fusionsprotein oder Fluoreszenzmarker bis hin zur Verwendung als Reporter für Genexpression, oder die Anwendung bei Protein-Protein Interaktionsmessungen reicht [41]. Mit EGFP ist die Visualisierung von Prozessen und damit die zeitliche Abfolge von Ereignissen in lebendigen Systemen möglich [109].

Die Primärsequenz von EGFP ist verhältnismäßig kurz und besteht aus 238 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26,9 kDa [109]. In **Abbildung 10** ist die Kristallstruktur von EGFP dargestellt.

**Abbildung 10.** Kristallstruktur von Zn-gebundenen EGFP Biosensor (graue Kugeln= Zink Ionen) [35].



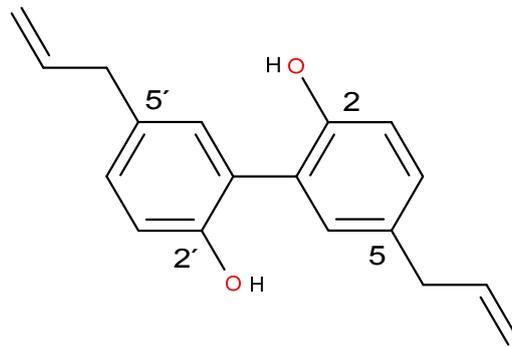
## 5 NEOLIGNANE

Neolignane sind Dimere von Phenylpropanderivaten, bei denen meistens zwei C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> Einheiten in den Positionen 8-8' verknüpft sind, während für Lignane eine Verknüpfung über die β-β' Position charakteristisch ist [73]. Beide, Lignane sowie Neolignane, wurden erstmals in Pflanzen entdeckt. Nachdem sich verschiedene Neolignan-Extrakte als aktiv gegenüber PPAR herausstellten, wurde die partial- sowie die vollsynthetische Herstellung von Neolignanen realisiert. In *Magnolia officinalis*- und *obovata*-Rindenextrakten wurden die Neolignane Magnolol und Honokiol gefunden [14, 54]. Beide wurden als PPAR $\gamma$ -Modulatoren identifiziert, wobei später auch erkannt wurde, dass beide Substanzen auch RXR $\alpha$  modulieren können. Partialsynthetische Neolignane wie Dieugenol und Tetrahydrodieugenol wurden als Dimere der Natursubstanz Eugenol synthetisiert. Beide Neolignane zeigten sich als selektive PPAR $\gamma$ -Agonisten, im Gegensatz zu Eugenol, das keine PPAR $\gamma$ -Modulation bewirkt [17].

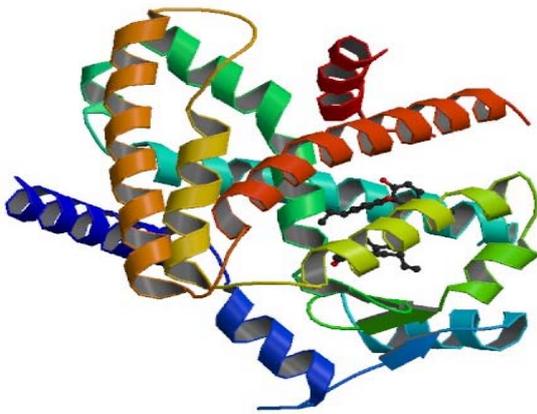
### 5.1 Magnolol

Magnolol ist eine der Hauptkomponenten, die sich aus der Rinde von *Magnolia officinalis* isolieren lässt. In der Traditionellen Chinesischen Medizin wird diese Pflanze gegen Durchfall, bei Husten und allergischer Rhinitis verwendet [58]. Die Magnoliarinde scheint auch effektiv bei der Bekämpfung des Metabolischen Syndroms zu sein [4]. In *in vitro* Studien wurde die Fähigkeit der Adipozytendifferentiation und Glucose- Aufnahme in 3T3-L1 Adipozytenzellen, sowie die Prävention vor Entwicklung diabetischer Komplikationen wie Nephropathie, von Magnolol beschrieben [13, 95]. Darüber hinaus zeigt Magnolol antioxidative und hepatoprotektive Effekte [11].

Nach der IUPAC Nomenklatur ist Magnolol ein 4-Allyl-2-(5-allyl-2-hydroxy-phenyl)phenol (s. **Abbildung 11**). Magnolol wurde in der Literatur als dualer Agonist von PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  beschrieben. In den **Abbildungen 12** und **13** sind die Kristallstrukturen der PPAR $\gamma$ - und RXR $\alpha$ -LBD an die Magnolol gebunden ist illustriert.

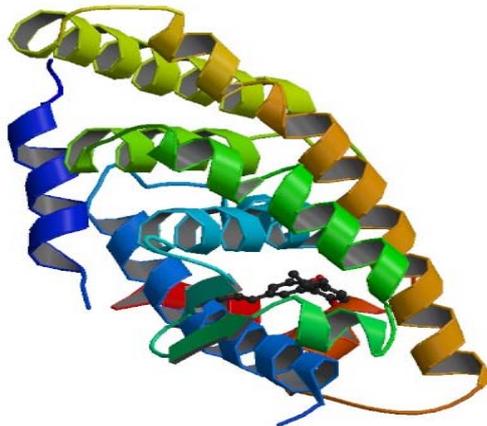


**Abbildung 11.** Chemische Struktur von Magnolol; 5,5'-Di-(2-propenyl)-biphenyl-2,2'-diol. Bei Magnolol sind zwei Phenylpropenyle über 1-1' Positionen verknüpft.



Magnolol ist ein partieller PPAR $\gamma$ -Agonist da es im Vergleich zum bekannten PPAR $\gamma$ -Vollagonisten Pioglitazon, im Luciferase Assay deutlich geringere Transaktivierung zeigt [17]. Auch die Affinität zu hPPAR $\gamma$  in Protein-Protein Bindungsexperimenten ist geringer als die von Pioglitazon [17].

**Abbildung 12.** Kristallstruktur der PPAR $\gamma$ -LBD mit, als Agonisten gebundenem Magnolol [38].

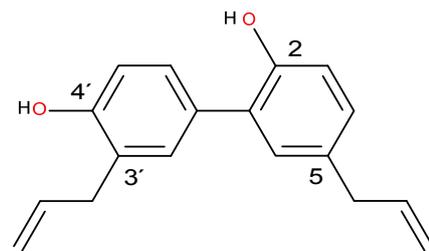


**Abbildung 13.** Kristallstruktur der RXR $\alpha$ -LBD mit, als Agonisten gebundenem Magnolol [40].

## 5.2 Honokiol

Honokiol ist ein Magnololderivat, das ebenfalls in Extrakten der Magnoliarinde zu finden ist [54]. Dieses Neolignan zeigt viele pharmakologische Eigenschaften, wie in verschiedenen Studien beobachtet wurde. Zusammengefasst zeigte sich Honokiol als entzündungshemmend [1, 49], antiarrhythmisch [99], anxiolytisch [69], anticancerogen [3], antithrombotisch [42], antiarthritisch [74] sowie antiallergisch [25].

Weitere Studien haben ergeben, dass die Behandlung von RAW264.7 Zellen (eine murine Makrophagen Zelllinie) mit Honokiol zu erhöhten mRNA Levels von ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) und ABCG1, durch Bildung eines RXR/LXR-Heterodimers führen, somit ist Honokiol in der Kontrolle der Cholesterolemie involviert [54]. Zudem aktiviert Honokiol ApoA1-medierte Cholesterolefflux aus Makrophagen [54]. Honokiol wurde als ein Naturprodukt beschrieben, dass im Vergleich zu den RXR $\alpha$ -Agonisten Phytansäure und DHA eine höhere Bindungsaffinität zeigt [54].



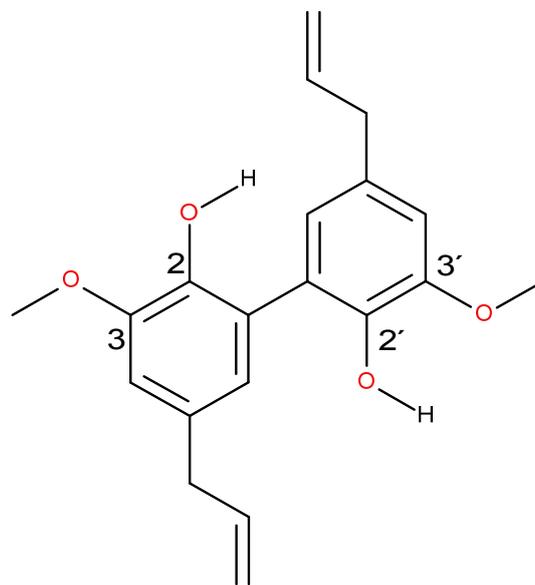
**Abbildung 14. Chemische Struktur von Honokiol; 5,3'-Di-(2-propenyl)-biphenyl-2,4'-diol.**

Nach IUPAC Nomenklatur ist Honokiol ein 2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enylphenol. Der Unterschied zu Magnolol liegt in der Position der OH-Gruppe, die hier in Position 4' statt 2' ist, wie in **Abbildung 14** gezeigt.

### 5.3 Dieugenol

Hierbei handelt es sich um ein partialsynthetisches Neolignan, nämlich ein Dimer des Phenylpropanoids Eugenol. Dieugenol ist ein PPAR $\gamma$ -Agonist, der keine Aktivität gegenüber PPAR $\alpha$  oder  $-\beta/\delta$  zeigt. In einem Rezeptor *Binding Assay* wurde die höhere Affinität von Dieugenol zu hPPAR $\gamma$  gegenüber den bekannten Vollagonisten Pioglitazon gezeigt. Dieugenol führt PPAR $\gamma$ -abhängig zu Adipozyten Differenzierung in 3T3-L1 Zellen [17].

Die Struktur von Dieugenol hat im Vergleich zu Magnolol noch CH<sub>3</sub>O-(Methoxy-) Gruppen an den Benzenringen, jeweils in ortho-Position zu den OH-Gruppen (s. **Abbildung 15**).



**Abbildung 15.** Chemische Struktur von Dieugenol; 3,3'-Dimethoxy-5,5'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2,2'-diol.

### 5.4 Tetrahydrodieugenol

Tetrahydrodieugenol (THDE) ist wie Dieugenol ein partialsynthetisches Neolignan. Die bisher bekannten Eigenschaften sind vergleichbar mit Dieugenol. THDE ist auch ein selektiver partialer PPAR $\gamma$ -Agonist der mit höherer Affinität als Pioglitazon an hPPAR $\gamma$  bindet. Wie Dieugenol führt THDE in 3T3-L1 Zellen zur Differenzierung zu Adipozyten [17]. Zudem zeigen beide antioxidative Wirkungen [76].

Der Unterschied zwischen Tetrahydrodieugenol und Dieugenol liegt in den beiden Doppelbindungen, die bei THDE in den Propanseitenketten fehlen (s. **Abbildung 16**).

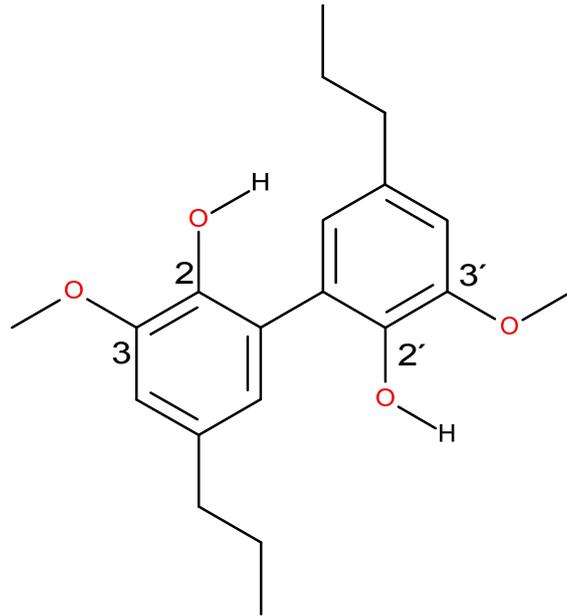


Abbildung 16. Chemische Struktur von Tetrahydrodieugenol; 3,3'-Dimethoxy-5,5'-dipropyl-biphenyl-2,2'-diol.

## 6 ZIEL DER DIPLOMARBEIT

Weltweit wird nach neuen aktiven Pharmakophoren gesucht. Das Nebenwirkungsprofil der Substanzen soll möglichst gering und somit klinisch einsetzbar sein. In Hinblick auf Zivilisationskrankheiten wie Krebs, Diabetes aber auch Entzündungen sind die PPAR- und RXR-Modulatoren vielversprechende Therapeutika [94].

Derzeit ist von den Rexinoiden nur Bexaroten klinisch in Verwendung bei Krebserkrankungen [63]. Ein anderer Rexinoid, bekannt unter den Namen LG100268, in Kombination mit Tamoxifen, bewährte sich in präklinischen Untersuchungen zur Prävention von Brustkrebs [54]. Zu der weit verbreiteten und bekanntesten Gruppe von PPAR $\gamma$ -Agonisten, die in der Klinik ihre Einsetzung als Insulinsensitizer fanden, gehören die TZD. Letztere zeigen aber viele Nebenwirkungen und sind deswegen kein Therapeutikum erster Wahl mehr. Diese Beispiele zeigen dass das Potential von PPAR $\gamma$ - und RXR $\alpha$ -Agonisten in Anwendung zur Behandlung verschiedener und schwerwiegender Krankheiten besteht, aber noch ein weiter Weg hin zu sicheren und effektiv einsetzbaren Stoffen bevorsteht.

Somit war das Ziel dieser Diplomarbeit aus einem Set an partialsynthetischer und vollsynthetischer Neolignane neue potentielle PPAR $\gamma$ - und RXR $\alpha$ -Modulatoren zu identifizieren. Dazu wurde ein auf Luciferase basierendes Transaktivations-Screening in HEK 293 Zellen angewendet. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse werden (im Rahmen eines größeren Projekts) dazu verwendet, Struktur-Aktivitäts Verhältnisse von Neolignanen zu RXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  zu erforschen. Somit stellt diese Arbeit einen Beitrag zur Wirkstoffentwicklung dar.

---

# MATERIAL

---

## C. MATERIAL

### 1 MATERIAL ZUR PLASMID HERSTELLUNG

#### 1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Reagenzien:	Bezugsquellen:
<i>E. coli</i> -Glycerin Stock	<i>Invitrogen (CA, USA)</i>
Lysogeny broth medium (LBM)	<i>Sigma (MO, USA)</i>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung, pH 7	(s. <b>Tabelle 14</b> )
Geräte:	Hersteller:
<i>Beckman JS-5.2 Rotor</i>	<i>Beckman Coulter (CA, USA)</i>
Mikrowelle	<i>Silva Schneider</i>

Tabelle 3. Reagenzien und Geräte zur Herstellung kompetenter Bakterien.

#### 1.2 *E. coli* Transformation

Reagenzien:	Bezugsquellen:
LBM	<i>Sigma (MO, USA)</i>
<i>PeqGOLD Universal Agarose</i>	<i>Peqlab (Erlangen, Germany)</i>
Ampicillin, Kanamycin	<i>Sigma (MO, USA)</i>
Super optimal catabolite repression (SOC)	<i>Sigma (MO, USA)</i>
Desoxyribonukleinsäure (DNA) Plasmid 50 ng	(s. <b>Tabelle 10</b> )
Geräte:	Hersteller:
Mikrowelle	<i>Silva Schneider</i>
Bakterieninkubator	<i>Edmund Buehler (Hechingen, Germany)</i>

<i>Thermomixer® compact</i>	<i>Eppendorf (Eppendorf, Austria)</i>
<i>Heraeus™ Biofuge™ fresco</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. ( CA, USA)</i>

**Tabelle 4. Reagenzien und Geräte zur E. coli Transformation.**

### 1.3 DNA- Miniprep Herstellung

Reagenzien:	Bezugsquellen:
LBM	<i>Sigma (MO, USA)</i>
Glycerin	<i>Promega (Wi, USA)</i>

#### Agar- Platten (s. **Tabelle 15**):

*PeqGOLD Universal Agarose* *Peqlab (Erlangen, Germany)*

Ampicillin, Kanamycin *Sigma(MO,USA)*

LBM *Sigma (MO, USA)*

*Miniprep- Kit:* *Promega (Wi, USA)*

*Neutralization Solution*

*Column Wash Solution + EtOH 95%*

*Cell Lysis Buffer*

*Endotoxin Removal Wash*

*Elution Buffer oder*

*Nuclease- Free Water*

Geräte:	Hersteller:
Bakterieninkubator	<i>Edmund Bühler ( Hechingen, Germany)</i>
<i>Heraeus™ Biofuge™ fresco</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>PureYield™ Minicolumn</i>	<i>Promega (Wi, USA)</i>

<i>VacMan® Jr. Laboratory Vacuum Manifold</i>	<i>Beckmann Coulter (CA, USA)</i>
<i>PureYield™ Collection Tube</i>	<i>Promega (Wi, USA)</i>
<i>NanoDrop 2000c</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>

**Tabelle 5. Reagenzien und Geräte zur DNA-Miniprep Herstellung.**

### 1.4 DNA- Midiprep Herstellung

Reagenzien:	Bezugsquellen:
LBM	<i>Sigma (MO, USA)</i>
Ampicillin, Kanamycin	<i>Sigma (MO, USA)</i>
<u><i>Midiprep-Kit:</i></u>	
<i>Miniprep-Kit</i>	(s. <b>Tabelle 5</b> )
<i>Cell Resuspension Solution</i>	<i>Promega (Wi, USA)</i>
Geräte:	Hersteller:
Bakterieninkubator	<i>Edmund Bühler ( Hechingen, Germany)</i>
<i>Sorvall RC 5C Plus Ultracentrifuge</i>	<i>GMI (USA)</i>
<i>PureYield™ Clearing Column</i>	<i>Promega (Wi, USA)</i>
<i>PureYield™ Binding Column</i>	<i>Promega (Wi, USA)</i>
<i>Vacuum manifold</i>	<i>Promega (Wi, USA)</i>
<i>Eluator™ Vacuum Elution Device</i>	<i>Promega (Wi, USA)</i>
<i>Heraeus™ Biofuge™ fresco</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>NanoDrop 2000c</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>

**Tabelle 6. Reagenzien und Geräte zur DNA-Midiprep Herstellung.**

## 2 MATERIAL ZUR ANALYTISCHEN PLASMID RESTRIKTION

Reagenzien:	Bezugsquellen:
DNA-Plasmide	(s. <b>Tabelle 10</b> )
<u>Restriktionsenzyme:</u>	
<i>EcoRI, HindIII, XhoI, NheI, BamHI</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<u>Puffer:</u>	
<i>Buffer R, Buffer Tango, Buffer BamHI</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<u>Weiteres:</u>	
<i>Loading buffer 10x</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
Geräte:	Hersteller:
<i>Thermomixer® compact</i>	<i>Eppendorf (Eppendorf, Austria)</i>

**Tabelle 7. Reagenzien und Geräte zur analytischen Plasmid Restriktion.**

### 3 MATERIAL FÜR DIE GELELEKTROPHORESE

Reagenzien:	Bezugsquellen:
<i>PeqGOLD Universal Agarose</i>	<i>Peqlab (Erlangen, Germany)</i>
Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer 0,5x	(s. <b>Tabelle 16</b> )
<i>Syber Safe DNA gel stain 10 000x</i>	<i>Invitrogen (CA, USA)</i>
Geräte:	Hersteller:
<i>Owl EasyCast B1 Mini Gel Electrophoresis System</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>PowerPac™ Basic Power Supply</i>	<i>Bio- Rad (Vienna, Austria)</i>

**Tabelle 8. Reagenzien und Geräte zur Gelelektrophorese.**

## 4 MATERIAL IN DER ZELLKULTUR UND FÜR DEN LUCIFERASE ASSAY

### 4.1 Splitten und Aussaat von HEK-293 Zellen

Reagenzien:	Bezugsquellen:
Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4	(s. <b>Tabelle 17</b> )
Trypsin/EDTA	<i>Invitrogen (CA, USA)</i>
Wachstumsmedium für HEK-293 Zellen, mit Phenolrot, ( <i>red completed medium</i> )	<i>Lonza Group Lt. (Basel, Switzerland)</i> (s. <b>Tabelle 19</b> )
Geräte:	Hersteller:
<i>Herasafe™ Biological Safety Cabinets</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>Heraeus™ Multifuge™ 1 S-R</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>Vi-Cell™</i>	<i>Beckmann Coulter</i>
<i>Hera cell 150 Incubator</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>

**Tabelle 9. Reagenzien und Geräte zum Splitten der HEK-293 Zellen.**

### 4.2 Transfektion von HEK-293 Zellen:

Reagenzien:	Bezugsquellen:
<u>Plasmide:</u>	
pSG5-PL-hPPAR $\gamma$	<i>Genomics, University of Lausanne</i> (Switzerland)
Tk-PPAREx3-luc	<i>Prof. Ronald M. Evans (Howard Hughes Medical Institute, California, USA)</i>
<i>Retinoid X nuclear receptor alpha</i>	<i>Missouri S&amp;T (Missouri, USA)</i>
<i>RXR Luciferase Reporter Vector</i>	<i>Panomics Affymetrix (Milano, Italia)</i>

pEGFP-N1	<i>Clontech (CA, USA)</i>
<u>Weiteres:</u>	
H <sub>2</sub> O (steril)	
HEPES gepufferte Salzlösung (HBS) 2x, 7,5 pH	(s. <b>Tabelle 21</b> )
CaCl <sub>2</sub> -Lösung 2 M	(s. <b>Tabelle 14</b> )
<b>Geräte:</b>	<b>Hersteller:</b>
<i>Mini Vortexer</i>	<i>VWR International (West Chester, PA, USA)</i>
<i>Hera cell 150 Incubator</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>Herasafe Biological Safety Cabinets</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>

**Tabelle 10. Reagenzien zur HEK-293 Zellen Transfektion.**

### 4.3 Herstellung der Testsubstanzen-Lösungen

<b>Reagenzien:</b>	<b>Bezugsquellen:</b>
<u>Positivkontrollen:</u>	
Pioglitazon-Hydrochlorid	<i>Molekula (Shaftesbury, UK)</i>
9-cis-Retinoinsäure (Alitretinoin)	<i>Enzo® Life Science (Lausen, Switzerland)</i>
<u>Weiteres:</u>	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Fluka (MO, USA)</i>
Wachstumsmedium für HEK-293 Zellen, ohne Phenolrot, mit stripped FBS ( <i>stripped serum medium</i> )	<i>Lonza Group Ltd. (Basel Switzerland)</i> (s. <b>Tabelle 20</b> )
<b>Geräte:</b>	<b>Hersteller:</b>

<i>Mini Vortexer</i>	<i>VWR International (West Chester, PA, USA)</i>
<i>Herasafe Biological Safety Cabinets</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>

**Tabelle 11. Reagenzien und Geräte zur Herstellung der Testsubstanzen-Lösungen.**

#### 4.4 Nachsaat von HEK-293 Zellen

Reagenzien:	Bezugsquellen:
PBS	(s. <b>Tabelle 17</b> )
Trypsin	<i>Invitrogen (MO, USA)</i>
Wachstumsmedium für HEK-293 Zellen, ohne Phenolrot, ( <i>white completed medium</i> )	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i> (s. <b>Tabelle 19</b> )
Wachstumsmedium für HEK-293 Zellen, ohne Phenolrot, mit stripped FBS, ( <i>stripped serum medium</i> )	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i> (s. <b>Tabelle 20</b> )
Geräte:	Hersteller:
<i>Heraeus Multifuge 1 S-R</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>Vi-Cell<sup>TM</sup></i>	<i>Beckmann Coulter (CA, USA)</i>
<i>Herasafe Biological Safety Cabinets</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>
<i>Hera cell 150 Incubator</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, CA, USA)</i>

**Tabelle 12. Reagenzien zur Nachsaat der HEK-293 Zellen.**

#### 4.5 Luciferase Assay Messung und Auswertung

Reagenzien:	Bezugsquellen:
Luciferin 0,01 M	<i>Synchem (Flesberg, Germany)</i>

---

Adenosintriphosphat (ATP) 0,1 M	<i>Sigma, (MO, USA)</i>
<i>Luciferase assay lyse buffer</i>	(s. <b>Tabelle 22</b> )
Geräte und Software:	Hersteller:
<i>Tecan GENiosPro</i>	<i>Tecan (Mannedorf, Switzerland)</i>
<i>Multi- MicroPlate Genie®</i>	<i>Carl Roth (Germany)</i>
<i>GraphPad PRISM<sup>TM</sup> Version 6.</i>	<i>GraphPad Software, Inc. (CA, USA)</i>

---

**Tabelle 13. Reagenzien und Geräte zur Luciferase Assay Messung.**

## 5 MEDIEN- UND REAGENTIENZUSAMMENSETZUNGEN

---

### CaCl<sub>2</sub>-Lösung, pH 7, 250ml:

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,2 g
Glycerin (85%)	37,5 ml
Piperazin-N,N-bis(2-hydroxylpropansulfonsäure) ( <i>PIPES</i> )	0,76 g
H <sub>2</sub> O	212,5 ml

---

Tabelle 14. Zusammensetzung der CaCl<sub>2</sub>-Lösung.

---

### Agar Platte (für ca. 5-10 Platten):

LBM 100,0 ml

Agarose 1,5 g

mit entsprechen AB;

Ampicillin, Kanamycin

---

Tabelle 15. Zusammensetzung des Agar-Nährbodens.

---

### TBE Buffer 0,5x:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)  
Base 89 mM

Borsäure 89 mM

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Na<sub>2</sub>  
2 mM

H<sub>2</sub>O

---

Tabelle 16. Zusammensetzung des TRIS-Borat-EDTA Puffer.

---

**PBS, pH 7,4:**MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,10 gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,20 g

NaCl 8,00 g

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,10 g

KCl 0,20 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 gH<sub>2</sub>O destilliertes auf 1L

---

**Tabelle 17. Zusammensetzung des PBS.**

---

**Trypsin/EDTA:**

EDTA 0,02%

Trypsin 0,05%

PBS 1L

---

**Tabelle 18. Zusammensetzung des Trypsin-EDTA Komplexes.**

---

**Wachstumsmedium für HEK-293 Zellen:**

Dulbecco's modifiziertes Adler Medium (DMEM) mit oder ohne Phenolrot, 500 ml	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
--	--

Penicillin 100 U/ml	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
---------------------	--

Streptomycin 100 µg/ml	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
------------------------	--

L-Glutamin 2 mM	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
-----------------	--

Fetales Rinderserum 10%	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
-------------------------	--

---

**Tabelle 19. Zusammensetzung des HEK-293 Zellen Wachstumsmedium.**

**Stripped Serum Medium:**

DMEM ohne Phenolrot, 500 ml	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
Penicillin 100 U/ml	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
Streptomycin 100 µg/ml	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
L-Glutamin 2mM	<i>Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland)</i>
Mit Aktivkohle gefiltertes FBS 5%	

**Tabelle 20. Zusammensetzung des stripped Serum Medium.****HBS 2x, pH 7,5:**

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Dextrose	12 mM
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES), pH 7,6	50 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,5 mM

**Tabelle 21. Zusammensetzung der HBS-Lösung.****Luciferase Assay Lyse Puffer (1x Platte);**

H <sub>2</sub> O 4,8 ml	
<i>Reporter lysis 5x buffer</i> 1,2 ml	<i>Promega (WI, USA)</i>
CoA 270 mM 6 µl	<i>Sigma (MO, USA)</i>
DTT 1 M 6 µl	<i>Fluka (MO, USA)</i>

**Tabelle 22. Zusammensetzung des Luciferase Assay Lyse Puffer.**



---

# Methoden

---

## D. METHODEN

### 1 METHODEN ZUR PLASMIDHERSTELLUNG

#### 1.1 Vorbereitung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Bakterienzellen wurden in LB (engl. lysogeny broth) Medium bei 37°C unter Rühren in einem Inkubator bis zu einer OD<sub>590</sub> von 0,375 kultiviert. Die Bakterienkultur wurde auf fünf Polypropylenröhrchen aufgeteilt und das Zellmaterial mittels Zentrifugation (Beckmann JS-5.2) bei 1 600 x g für 7 min abgetrennt. Daraufhin wurde das Zellpellet in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen wieder durch Zentrifugation bei 1 100 x g für 5 min abgetrennt.

Das so erhaltene Pellet wurde erneut in 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis gehalten, woraufhin eine neuerliche Zentrifugation bei 1 100 x g und 4°C für 5 min erfolgte. Das Pellet wurde schließlich wieder in 2 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und bei -70°C eingefroren.

#### 1.2 Transformation der Bakterienzellen

In fünf Eppendorfgläsern wurden 40 µl kompetenter *E. coli* Kultur mit ca. 50 ng des entsprechenden DNA-Plasmids (PPAR $\gamma$ , PPARE, RXR $\alpha$ , RXRE oder EGFP) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Parallel dazu wurden fünf Kontrollen, die nur die kompetenten Bakterien ohne Plasmid enthielten, inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für 45 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Anschließend wurden 450 µl SOC Medium hinzugefügt und die Zellen bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen abgetrennt und anschließend in ca. 50 µl LBM mit entsprechendem Antibiotikum (für EGFP Kanamycin (50 µg/ml) und für alle anderen Plasmide Ampicillin (100µg/ml)) resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden auf die entsprechenden Antibiotikum enthaltenden Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 1.3 DNA Minipreps

Für die DNA Miniprep Herstellung wurden drei *E. coli*-KbE (Koloniebildende Einheiten) von jeder Agar-Platte genommen und über Nacht in 5 ml LBM mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C inkubiert. Pro Plasmid wurde ein Eppendorfgläser mit 1,5 ml der entsprechenden Bakterienkultur gefüllt und mit der Mikrozentrifuge für eine Minute bei 16 060 x g zentrifugiert. So erhaltene Pellets wurden in 600 µl Wasser resuspendiert. Schließlich wurden 100 µl *Cell Lysis Buffer* zugegeben und für eine bis zwei Minuten geschüttelt, wodurch die Suspen-

sion deutlich blau gefärbt wurde. Daraufhin erfolgte die Zugabe 350 µl kalter *Neutralization Solution*. Eine gelbliche Fällung war zu beobachten. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 16 060 x g, um anschließend die Überstände in fünf *PureYield™ Minicolumn* zu transfieren. Durch das Anlegen von Vakuum wurde die Flüssigkeit aus dem *PureYield™ Minicolumns* entfernt. Daraufhin wurden die Minisäulen mit 200 µl *Endotoxin Removal Wash Solution* und danach mit 400 µl *Column Wash Solution* gewaschen. Die gewaschenen Minisäulen wurden in eine *PureYield™ Collection Tube* gestellt und in der Mikrozentrifuge bei 16 060 x g für eine Minute zentrifugiert. Danach wurden die Minisäulen auf Eppendorfgefäße gesetzt, die Minisäulenmatrix mit 30 µl *Elution Buffer* versetzt und eine Minute inkubiert. Schließlich wurden die DNA-Plasmide mittels Mikrozentrifuge in Eppendorfgefäße eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Plasmidkonzentrationen und die Qualität der Plasmide (Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$ ) wurden spektrophotometrisch ermittelt (s. **Tabelle 23**).

Plasmide	Konz. (ng/µl)	$A_{260}/A_{280}$
PPAR $\gamma$	51,0	1,81
PPARE	54,9	1,85
RXR $\alpha$	67,8	1,80
RXRE	30,5	1,80
GFP	53,0	1,85

**Tabelle 23.** PPAR $\gamma$ -, PPARE-, RXR $\alpha$ -, RXRE- und GFP-Plasmidkonzentrationen und deren  $A_{260}/A_{280}$  Verhältnis.

### 1.3.1 Herstellung bakterieller Glycerinkonzentrate

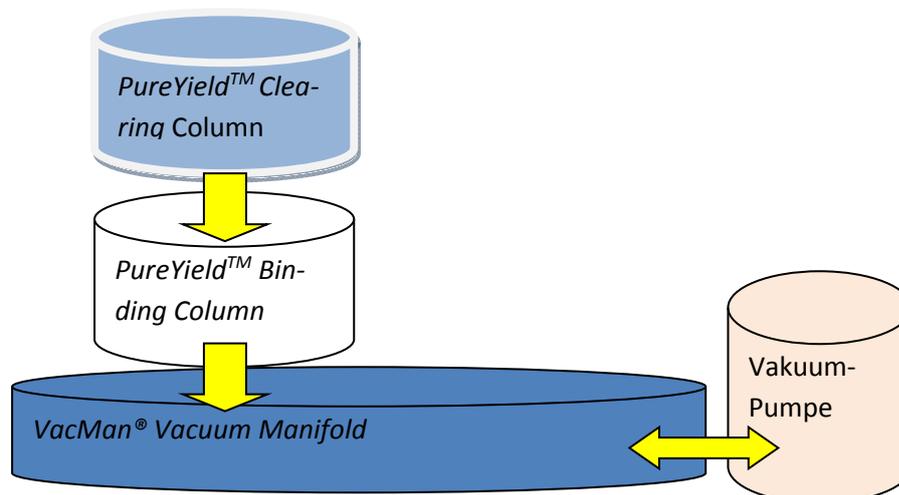
Jeweils drei transformierte KBE für jedes herzustellende Plasmid wurden in 5 ml LBM (mit entsprechendem Antibiotikum) über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 300 µl der Bakterienkultur mit 150 µl 50 % (v/v) Glycerin gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

## 1.4 DNA Midipreps

Es wurden 4 x 5 ml LBM mit Ampicillin (100 µg/ml) und 1 x 5 ml LBM mit Kanamycin (50 µg/ml) vorbereitet, um sie mit den entsprechenden bakteriellen Glycerolkonzentraten zu inkubieren. Nach ca. sechs Stunden Inkubation wurden die Vorkulturen zu 5 x 150 ml LBM mit entsprechendem Antibiotikum zugegeben und diese über Nacht bei 37°C weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 5 000 x g für 10 min abgetrennt.

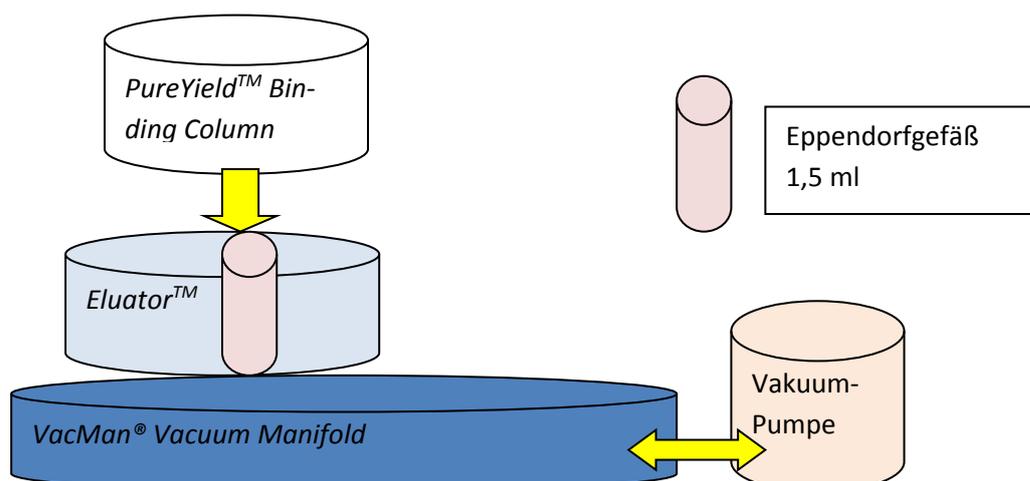
Das so erhaltene Pellet wurde in 6 ml *Cell Resuspension Solution* resuspendiert. Unmittelbar darauf wurden 6 ml *Cell Lysis Solution* zugegeben, für 3 min inkubiert, und dann mit 10 ml *Neutralization Solution* versetzt. Als nächster Schritt folgte eine Zentrifugation mit 15 000 x g für 15 min. Die Lysate wurden mit einem *PureYield™ Midiprep System* aufgereinigt. Dazu diente im ersten Schritt eine *PureYield™ Clearing Column*, um Zellreste in der Flüssigkeit zu entfernen. Die Lysate wurden in den Reinigungssäulen für 2 bis 3 min belassen um Zellreste an die Oberfläche der Flüssigkeit aufsteigen zu lassen. Unter der Reinigungssäule befindet sich eine Bindungssäule. Durch Anlegen des Vakuums passieren die Lysate die Reinigungssäulen und kommen in die Bindungssäule wo die Plasmide an der Bindungssäulenmembran zurückbleiben. Danach erfolgte die Aufreinigung der Plasmidlösungen mit 5 ml *Endotoxin Removal Wash* und 20 ml *Column Wash Solution*. Die Membranen wurden anschließend sorgfältig durch das Anlegen von Vakuum getrocknet.

#### Aufbau des *PureYield™ Midiprep System*



Um die Plasmide von der Membran zu eluieren verwendet man die *Eluator™ Vacuum* Elutionseinheit. Die Bindungssäulen kommen auf *Eluator™ Vacuum* Elutionseinheiten, in deren Mitte sich noch 1,5 ml Eppendorfgefäße befinden, wohin letztendlich auch die Plasmide eluiert wurden.

#### *PureYield™ Midiprep System mit Eluator™*



Als Elutionsmittel wurden pro Säule 1,3 ml *Nuclease-Free Water* verwendet. Die Eluierung erfolgte in zwei Schritten mit je 650 µl, die möglichst großflächig auf die Membran getropft wurden um eine bessere Eluierung der Plasmide zu ermöglichen. Zuletzt wurden die Eppendorfgefäße für eine Minute bei 16 060 x g zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt.

Die Plasmidkonzentrationen wurden spektrophotometrisch ermittelt (siehe **Tabelle 22**).

Plasmide	Konz. (ng/µl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/320</sub>
PPAR $\gamma$	460,4	9,211	4,924	1,87	2,22
PPRE	358,2	7,164	3,816	1,88	2,23
RXR $\alpha$	384,0	7,713	4,107	1,88	2,17
RXRE	352,1	7,031	3,738	1,88	2,22
GFP	423,9	8,472	4,505	1,88	2,19

**Tabelle 24.** PPAR $\gamma$ -, PPRE-, RXR $\alpha$ -, RXRE- und GFP-Plasmidkonzentrationen und deren Absorptionswerte bei 260, 280 und 320 nm.

Die Plasmidkonzentrationen wurden mit der Formel  $c = \frac{A \cdot \epsilon}{b}$  berechnet [31];

c- Konzentration in ng/µL,

A- Absorption in AU (*Absorbance units*),

$\epsilon$ - Wellenlänge-abhängiger Extinktionskoeffizient in ng-cm/µL,

b- Wellenlänge in cm.

Diese Formel stellt eine Modifikation der Lambert-Beerschen Gleichung dar. Die Absorption der Nukleinsäuren wurde bei 260 nm bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten bei 260 nm sind allgemein für DNA-Doppelstränge; 50 ng-cm/µL und für –Einzelstränge; 33 ng-cm/µL. Die hergestellten Plasmide sind doppelsträngig.

## 2 ANALYTISCHE PLASMID RESTRIKTION

Um die Identität der Plasmide zu bestätigen wurden analytische Restriktionen sowohl der Miniprep-Isolate (s. **Tabelle 26**) als auch der Midiprep-Isolate (s. **Tabelle 27**) durchgeführt.

Bestandteile eines analytischen Verdau sind in **Tabelle 25** angeführt.

<u>Material</u>	<u>Volumen</u>
DNA	500 ng
Enzym A	0,3 µl
Enzym B	0,3 µl
Puffer	2,0 µl
H <sub>2</sub> O bis auf	20 µl

**Tabelle 25.** Bestandteile des enzymatischen Verdau.

Die Bestandteile der Restriktionsmischung wurden in folgender Reihenfolge zugegeben: H<sub>2</sub>O, Puffer, DNA, und zuletzt die Enzyme. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Lösung homogenisiert und anschließend bei 37°C für zwei Stunden ohne schütteln in einem Thermomixer inkubiert. Beim analytischen Verdau des EGFP-Plasmids gibt es eine Ausnahme: hier wird das zweite Enzym nach einer Stunde Inkubation zusammen mit zweitem Teil des Puffers zugegeben. Nach der Inkubation wurden 4 µl eines 6 x DNA *Loading* Puffers zugegeben und die verdauten Plasmide bei -20°C aufbewahrt.

Für den Verdau wurden jene Enzyme verwendet, die auf den Plasmidkarten eingezeichnet sind. Die optimalen Pufferzusammensetzungen wurden unter Benutzung des Online-Tools <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest> eruiert.

## Analytische Restriktion der Minipreps:

Plasmide	Konz. (ng/μl)	Vol. (μl)	Enzym A	Vol. (μl)	Enzym B	Vol. (μl)	Puffer	Vol. (μl)	H <sub>2</sub> O (μl)
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	51	9,8	EcoRI	0,3	HindIII	0,3	Buffer R	2,0	7,6
<b>PPRE</b>	54,9	9,1	EcoRI	0,3	HindIII	0,3	Buffer R	2,0	8,3
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	67,8	7,4	EcoRI	0,3	XhoI	0,3	2 x Tango	4,0	8,0
<b>RXRE</b>	30,5	16,4	HindIII	0,6	BamHI	0,3	BamHI	2,0	0,7
<b>EGFP</b>	53,0	9,4	NheI	0,3	<b>EcoRI</b>	<b>0,3</b>	Tango		8,0
							1x	2,0	
							<b>10x</b>	<b>2,3</b>	

**Tabelle 26.** Zusammensetzung der analytischen Restriktion der Minipreps, (rot markierte Bestandteile werden erst nach einer Stunde Inkubation zugegeben)

## Analytische Restriktion des Midipreps:

Plasmide	Konz. (ng/μl)	Vol. (μl)	Enzym A	Vol. (μl)	Enzym B	Vol. (μl)	Puffer	Vol. (μl)	H <sub>2</sub> O (μl)
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	460,4	1,1	EcoRI	0,3	HindIII	0,3	Buffer R	2,0	16,3
<b>PPRE</b>	358,2	1,4	EcoRI	0,3	HindIII	0,3	Buffer R	2,0	16,0
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	520,0	0,96	EcoRI	0,3	XhoI	0,3	2x Tango	4,0	14,4
<b>RXRE</b>	352,1	1,4	HindIII	0,6	BamHI	0,3	BamHI	2,0	15,7
<b>EGFP</b>	423,9	1,2	NheI	0,3	<b>EcoRI</b>	<b>0,3</b>	Tango		16,2
							1x	2,0	
							<b>10x</b>	<b>2,3</b>	

**Tabelle 27.** Zusammensetzung der analytischen Restriktion der Midipreps, (rot markierte Bestandteile werden erst nach einer Stunde Inkubation zugegeben)

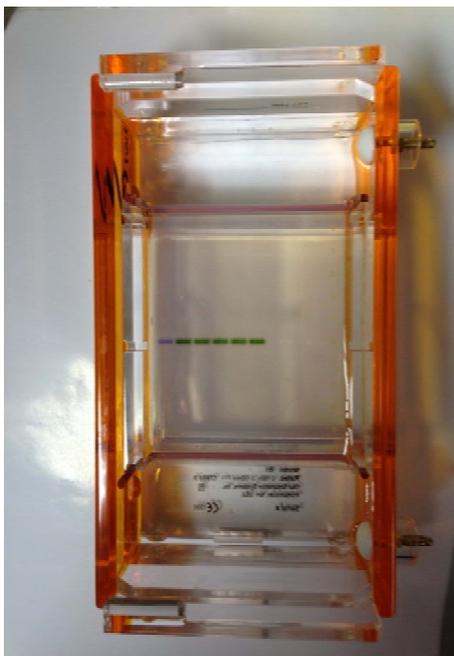
### 3 GELELEKTROPHORESE

#### 3.1 Probenvorbereitung

Für die Gelelektrophorese wurden 100 ng verdaut DNA verwendet und mit 1x *Loading* Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l aufgefüllt.

#### 3.2 Herstellung des Gels

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 1 g Agarose in 100 ml 0,5x TBE Puffer unter Zuhilfenahme einer Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen unter 50°C wurden 10  $\mu$ l *Syber Safe* dazugegeben. Das noch heiße Gel wurde in die Gelkammer gegossen und eventuell entstandene Luftblasen mit einer Pipettenspitze entfernt. Daraufhin wurde der Gelkamm gesetzt und das Gel für ca. 45 min zum Polymerisieren stehen gelassen. Anschließend wurde der Gelkamm herausgenommen und die Gelkammer mit 0,5x TBE Puffer befüllt.



#### 3.3 Auftragung der Proben und Elektrophorese

Auf das vorbereitete Gel wurden in die Geltaschen 20  $\mu$ l der verdauten Proben aufgetragen. Im Gel sollten sich klar geformte Banden bilden, wie in **Abbildung 17** zu sehen ist. Schließlich wurde die Gelapparatur an den Strom angeschlossen und bei 120 V für 45 min laufen gelassen. Aufnahme und Auswertung des Gels wurde mit Dunkelhaube DH-30/32 durchgeführt.

**Abbildung 17.** Gelapparatur mit aufgetragenen Proben am Gel.

## 4 METHODEN DER ZELLKULTUR

### 4.1 Die Zellkultur

Alle Manipulationen von Säugetierzellen wurden ausschließlich in der *Laminar Air Flow* durchgeführt. Vor jeder Anwendung wurde die Laminar gründlich mit Ethanol desinfiziert, ebenso alle Gegenstände und Materialien die innerhalb der *Laminar Air Flow* verwendet wurden. Nicht mehr benötigtes Zellmaterial wurde vor der Entsorgung mit Hexaquaart dekontaminiert.

### 4.2 Auftauen von Zellen

Eine Phiolen mit gefrorenen Zellen wurde ins Wasserbad bei 37°C zum Auftauen gestellt. Die aufgetauten Zellen wurden mit 15 ml Wachstumsmedium in ein 50 ml Falcon übergeführt und bei 412 x g für 4 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet mit 20 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in eine 175 cm<sup>2</sup> Flasche übergeführt. Damit waren die Zellen bereit zur Kultivierung.

### 4.3 Kultivierung von HEK-293 Zellen

Die Zellen wurden in einer 175 cm<sup>2</sup> Flasche mit 20 ml Wachstumsmedium bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% im Zellinkubator kultiviert. Jeden zweiten bis dritten Tag wurden die Zellen gesplittet.

Alle verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad bei 37°C mind. 20 min vor Verwendung vorgewärmt.

### 4.4 Zellsplitten und Passagieren

Zuerst wurde das alte Wachstumsmedium aus der Kulturflasche entleert. Auf die Wand der Flasche wurden 10 ml PBS zugegeben, kurz über die Zellen verteilt und wieder abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurden 3 ml Trypsin zugefügt und die Flasche für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Die Trypsination wurde mit vierfacher Menge an Wachstumsmedium gestoppt und die Zellsuspension in einen Falcon übergeführt. Es folgte die Zentrifugation mittels *Heraeus™ Multifuge™* für 4 min bei 412 x g. Anschließend wurde der Überstand abgossen und das Zellpellet in 10 ml frischem Wachstumsmedium resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem Vi-Cell™ Zellzähler ausgezählt, die gewünschte Menge an Zellsuspension in eine neue Kulturflasche übergeführt und mit Wachstumsmedium bis zu einem Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt.

## 5 LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAY MIT HEK-293 ZELLEN

### 5.1 Durchführung des Luciferase Reportergen Assays

Der Assay wurde in 5 Schritten durchgeführt (s. **Abbildung 18**):

1. Splitten und Aussähen der HEK-293 Zellen
2. Transfektion der HEK-293 Zellen
3. Herstellung der Testsubstanz-Lösungen
4. Aussaat der transfizierten HEK-293 Zellen in 96-well Platten
5. Messung und Auswertung des Luciferase Assays.



Abbildung 18. Luciferase Assay in fünf Schritten.

### 5.2 Spezielle Bedingungen bei der Durchführung des Luciferase Reportergen Assays

#### 5.2.1 Splitten und Aussähen der HEK-293 Zellen

Die gesplitteten Zellen wurden in eine Petrischale mittlerer Größe ( $\varnothing$  10 cm) mit 10 ml Wachstumsmedium und  $3 \times 10^6$  Zellen ausgesät, und somit für die Transfektion am nächsten Tag vorbereitet. Parallel dazu wurde eine kleine Petrischale mit 2,5 ml und  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät, die nicht transfiziert wurden und als negative Kontrolle dienten.

#### 5.2.2 Transfektion

Die HEK-293 Zellen wurden mit insgesamt 7,5  $\mu$ g dreier verschiedener **Plasmid**mischungen transfiziert;

- 1 **TM<sub>1</sub>** (PPAR $\gamma$  + PPRE + EGFP im Verhältnis 2:2:1)
- 2 **TM<sub>2</sub>** (RXR $\alpha$  + PPRE + EGFP im Verhältnis 2:2:1)
- 3 **TM<sub>3</sub>** (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP im Verhältnis 2:2:1).

Bestandteile einer **Transfektions**mischung und die Reihenfolge der Pipettierung:

1. H<sub>2</sub>O,
2. Plasmide,
3. HBS und
4. CaCl<sub>2</sub> (tröpfchenweise).

Für die verwendeten Platten, mittlerer Größe, wurden 750 µl der Transfektionsmischung verwendet.

Die Konfluenz der Zellen ist bedeutsam und soll bei der Transfektion der HEK-293 Zellen bei 50–60% liegen. Die transfizierten Zellen wurden für 6 Stunden inkubiert.

### 5.2.3 Herstellung von Testsubstanz- Lösungen

Alle Testsubstanzen sind in DMSO gelöst, und wurden in einer Konzentration von 10 µM getestet.

Als Positivkontrolle diente Pioglitazon in der Konzentration von 5 µM für TM1 (PPAR $\gamma$  + PPRE + GFP), während für TM2 (RXR $\alpha$  + PPRE + GFP) und TM3 (RXR $\alpha$  + RXRE + GFP) Alitretinoin in der Konzentration von 5 µM benutzt wurde.

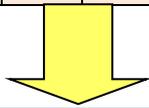
Für jedes Experiment wurde als Negativkontrolle DMSO verwendet.

Zum Herstellen der Verdünnungen wurde stripped Serum Medium verwendet. Alle Verdünnungen, die zum Einsatz kamen, wurden so hergestellt, dass alle Testsubstanzen- sowie Kontrollverdünnungen dieselbe DMSO-Konzentration aufweisen. Außerdem wurden die Lösungen in vierfach höherer Konzentration hergestellt, da sie im letzten Schritt des Experimentes durch die Aussaat der HEK-293 Zellen vierfach verdünnt wurden.

Jeweils 50 µl der vorbereiteten Lösungen wurden in der 96-well Platte pipettiert und auf 37°C vorgewärmt. Jede Testsubstanz wurde in vier der 96 wells einer 96-well Platte getestet (s. **Abbildung 19**).

Schema der Testsubstanzen- Pipettierung:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



	1	2	3	4
A	untransfiziert	untransfiziert	untransfiziert	untransfiziert
B	Pio 5 $\mu\text{M}$	Pio 5 $\mu\text{M}$	Pio 5 $\mu\text{M}$	Pio 5 $\mu\text{M}$
C	Ali 5 $\mu\text{M}$	Ali 5 $\mu\text{M}$	Ali 5 $\mu\text{M}$	Ali 5 $\mu\text{M}$
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
E	Testsubstanz 1 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 1 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 1 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 1 10 $\mu\text{M}$
F	Testsubstanz 2 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 2 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 2 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 2 10 $\mu\text{M}$
G	Testsubstanz 3 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 3 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 3 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 3 10 $\mu\text{M}$
H	Testsubstanz 4 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 4 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 4 10 $\mu\text{M}$	Testsubstanz 4 10 $\mu\text{M}$

Abbildung 19. Schema des Quadruplets einer 96 well Platte; Pio-Pioglitazon, Ali-Alitretinoin.

### 5.2.4 Aussaat der transfizierten HEK-293 Zellen in 96 well Platten

Sechs Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Da sich transfizierte Zellen schwieriger vom Plattenboden ablösen, wurde zusätzlich zu jener, im Kapitel 4.4 beschriebenen Methode, der Boden der Petrischale nach der Behandlung mit Trypsin noch mehrmals

mit Wachstumsmedium gespült um eine höhere Ausbeute an Zellen zu erreichen. Außerdem wurden für transfizierte Zellen 3 ml Trypsin zugegeben und für 5 min im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 1 400 rpm und 4 min wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 10 ml stripped Serum Medium resuspendiert. Zwischen 0,6 und 1 ml dieser Suspension wurde zur Zählung benutzt. Mit den bei der Zählung erhaltenen Werten wurde in jedes well eine Verdünnung von 50 000 Zellen in 150 µl ausgesät. Dieses entspricht der Zellkonzentration von  $0,33 \times 10^6$  Zellen/ml Zellsuspension. Von den untransfizierten Zellen wurden 200 µl der Konzentration  $0,25 \times 10^6$  Zellen/ml Zellsuspension ausgesät.

Die transfizierten HEK-293 Zellen mit den drei verschiedenen Transfektionsmischungen wurden in eine 96-well Platte, wie unten in der **Abbildung 20** zu sehen ist, ausgesät und für 18 Stunden inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
B	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio	Pio
C	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali	Ali
D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
E	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1
F	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2
G	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T3	T3
H	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T4	T4
	PPAR $\gamma$ + PPRE + EGFP				RXR $\alpha$ + PPRE + EGFP				RXR $\alpha$ + RXRE + EGFP			

**Abbildung 20.** Schema einer 96-well Platte mit 3 Transfektionsmischungen, (U-untransfizierte Zellen, Pio-Pioglitazon, Ali-Alitretinoin, D-DMSO, T-Testsubstanz).

### 5.2.5 Messung und Auswertung des Luciferase Reporter gen Assays

Nach 18-stündiger Inkubation wurde das Medium aus der 96-well Platte vorsichtig mit einer 0,5-10 µl Pipettenspitze, die an das Vakuum angeschlossen ist, abgesaugt und die Platte bei -80°C eingefroren.

Die Messung erfolgt mit dem Multiplattenlesegerät *Tecan GENiosPro* unter Verwendung von *XFluor GENiosPro* Version V 4.63 Software. Die Tecan GENiosPro Messdaten sind in **Tabellen 28** und **29** zusammengefasst.

Vor der Messung muss die Maschine gereinigt und vorbereitet werden. Zur Messung der Luciferaseaktivität ist die Zugabe der beiden Reagenzien Luciferin und ATP notwendig.

Um die 96-*well* Platte messen zu können, wird das Luciferase Lyse Puffer benötigt, hergestellt aus;

4,8 ml H<sub>2</sub>O,

1,2 ml 5 x Reporter Lyse-Puffer,

6 µl CoA 270 mM und

6 µl DTT 1 M.

In jedes *well* wurden 50 µl Luciferase Lyse Puffer mit einer elektronischen Pipette (Eppendorf Research® pro) pipettiert. Die Platte wurde für 10 min auf einen Plattenschüttler gestellt und bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 40 µl der Zell Lyse Puffer Suspension aus jedem *well* der transparenten 96-*well* Platte analog in eine schwarze 96-*well* Platte übergeführt. Die schwarze Platte wurde für eine Minute geschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit zu erzielen und um Luftblasen zu entfernen. Im Anschluss konnte die Platte vermessen werden.

#### GFP bezogene Fluoreszenz Messung

---

<i>Measurement mode:</i>	<i>Fluorescence Top</i>
<i>Excitation wavelength:</i>	485 nm
<i>Emission wavelength:</i>	520 nm
<i>Gain:</i>	Optimal
<i>Number of reads:</i>	1
<i>Integration time:</i>	1000 µs
<i>Lag time:</i>	0 µs
<i>Mirror selection:</i>	<i>Dichroic 3 (e.g.FI)</i>
<i>Plate definition file:</i>	GRE96fb.pdf
<i>Part of the plate:</i>	A1- H12
<i>Time between move and flash:</i>	40 ms

---

**Tabelle 28. GFP bezogene Fluoreszenz Messdaten.**

Lumineszenz Messung


---

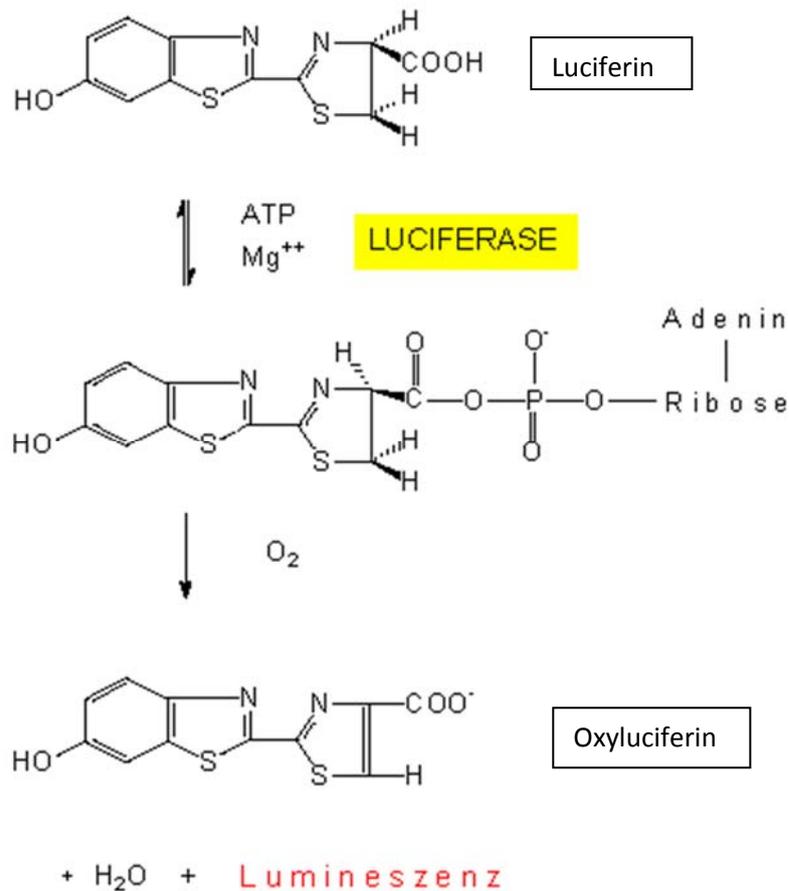
<i>Measurement mode :</i>	<i>Luminescence</i>
<i>Integration time (manual) :</i>	2000 ms
<i>Attenuation :</i>	<i>None</i>
<i>Plate definition file :</i>	GRE96fb
<i>Part of the plate :</i>	A1 - H12
<i>Time between move and integration :</i>	50 ms
<i>Well kinetic number :</i>	1
<i>Well kinetic interval (minimal) :</i>	2020 ms
<i>Injector A volume :</i>	50 µl
<i>Injector A speed :</i>	200 µl/s
<i>Injector B volume :</i>	50 µl
<i>Injector B speed :</i>	200 µl/s
<i>Injection mode :</i>	Standard

---

Tabelle 29. Lumineszenz Messdaten.

**5.3 Datenanalyse:**

Das Multiplattenlesegerät *Tecan GENiosPro* misst die relativen Intensitäten für Lumineszenz (LU) und Fluoreszenz (RFU). Die Lumineszenz entsteht durch die Luciferase- Reaktion (s. **Abbildung 21**) bei der gebildete Luciferase mit im Überschuss zugegebenem ATP und Luciferin reagiert, während das Fluoreszenzsignal von der Expression des EGPF-Plasmids stammt und direkt ausgelesen werden kann.



**Abbildung 21.** Vereinfachte Darstellung der Luciferase Reaktion; aus Luciferin und ATP entstehen mit Hilfe des Enzyms Luciferase Oxyluciferin und Lumineszenz [29].

Die von untransfizierten Zellen erhaltenen Werte stellen den Hintergrund dar, dessen Mittelwert von allen anderen Werten auf der Platte abgezogen wird.

Pro Testsubstanz wurden so für jede Testsubstanz, pro Platte, 4 Ergebnisse für Lumineszenz und Fluoreszenz erhalten. Insgesamt wurde jede Testsubstanz mindestens auf 3 verschiedenen Platten getestet.

Die Aktivität der Testsubstanzen ergibt sich durch die Mittelwerte des Verhältnisses der einzelnen Lumineszenzsignale zu den einzelnen Fluoreszenzsignalen, normalisiert über die erhaltenen Mittelwerte für die Negativkontrolle.

Mathematisch lässt sich die Aktivität der Testsubstanzen folgendermaßen beschreiben:

$$A = \frac{L}{F \times D}$$

A – Aktivität der Testsubstanz

L – Lumineszenz Mittelwert der Testsubstanz

F – Fluoreszenz Mittelwert der Testsubstanz

D – Mittelwert der Lumineszenz dividiert durch Fluoreszenz der Negativkontrolle



---

# Resultate

---

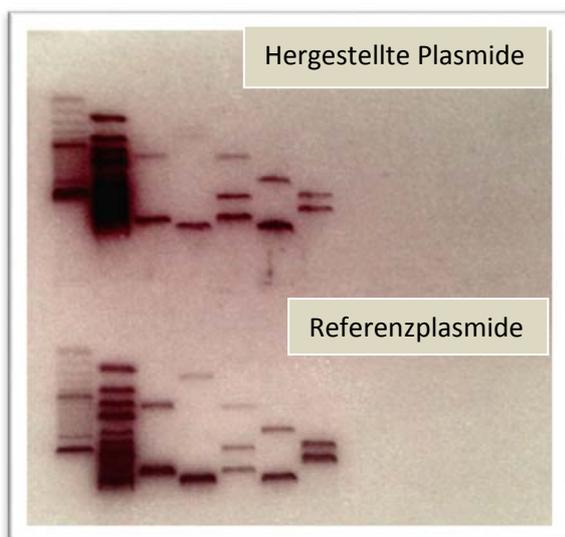
## E. Resultate

### 1 HERGESTELLTE PLASMIDE FÜR DEN LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAY

Die für die Transfektionsmischungen benötigten Plasmide (PPAR $\gamma$ , RXR $\alpha$ , PPARE, RXRE und EGFP) wurden in *E. coli* propagiert und anschließend aufgereinigt (s. Kapitel Methoden 1.4). Mittels Plasmidrestriktion und Gelelektrophorese wurde die Identität der Plasmide bestätigt. In **Abbildung 22** ist zu sehen, dass die Banden der hergestellten Plasmide (oberer Teil der Abbildung) mit den Banden der Referenzplasmide (unterer Teil der Abbildung) übereinstimmen. Außerdem wurden Güte und DNA-Konzentration der Plasmide spektrophotometrisch ermittelt (s. **Tabelle 30**).

Plasmide	Konz. (ng/ $\mu$ l)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/320</sub>
PPAR $\gamma$	460,4	9,211	4,924	1,87	2,22
PPRE	358,2	7,164	3,816	1,88	2,23
RXR $\alpha$	384,0	7,713	4,107	1,88	2,17
RXRE	352,1	7,031	3,738	1,88	2,22
EGFP	423,9	8,472	4,505	1,88	2,19

**Tabelle 30.** PPAR $\gamma$ -, PPRE-, RXR $\alpha$ -, RXRE- und EGFP-Plasmidkonzentrationen und deren Absorptionswerte bei 260, 280 und 320 nm.



(1) (2) (3)(4)(5) (6) (7)

**Abbildung 22.** Elektrophoresegel der hergestellten Plasmide im Vergleich zu Referenzplasmiden:

- (1) 100 bp leader
- (2) 1 kb leader
- (3) EGFP
- (4) PPAR $\gamma$
- (5) PPARE
- (6) RXR $\alpha$
- (7) RXRE

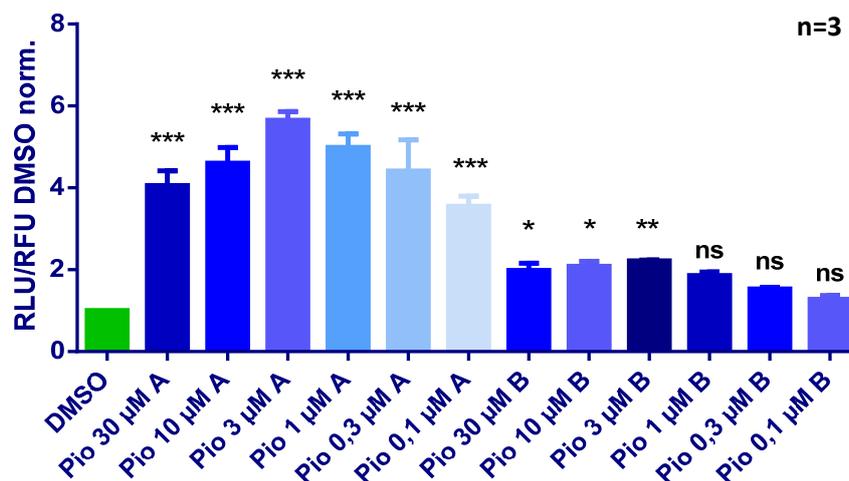
Das Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280}$ , angeführt in **Tabelle 30**, zeigte dass alle Plasmide eine hohe Reinheit aufweisen.

## 2 RESULTATE DER LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAYS MIT HEK-293 ZELLEN

Insgesamt wurden 23 synthetische und semisynthetische Neolignanderivate in HEK-293 Zellen mit einem Luciferase Reporter Gen Assay auf ihre Aktivität gegenüber PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$  getestet. Alle Derivate wurden in einer Konzentration von 10  $\mu$ M untersucht, da sich diese Konzentration in vorherigen Untersuchungen verschiedener Naturstoffextrakte bewährt hat [18]. Verwendete Substanzen waren als in DMSO gelösten sogenannten *stock solutions* verfügbar. Die Konzentrationen dieser *stock solutions* betragen für Pioglitazon 5 mM, für Alitretinoin 30 mM und für die getesteten Neolignanderivate zwischen 25 und 35 mM. Die DMSO-Konzentration variierte zwischen den einzelnen Experimenten, je nach verwendeter Verdünnung mit höchstem Anteil an DMSO und lag zwischen 0,1–0,4%. Im Folgenden angeführte Ergebnisse zeigen den Mittelwert des RFU/RLU-Quotienten, der bereits *Background* reduziert und auf die DMSO-Aktivität normalisiert wurde. Die Luciferase Reporter Gen Assays erfolgten mit drei Transfektionsmischungen TM<sub>1</sub> (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP), TM<sub>2</sub> (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP) und TM<sub>3</sub> (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP).

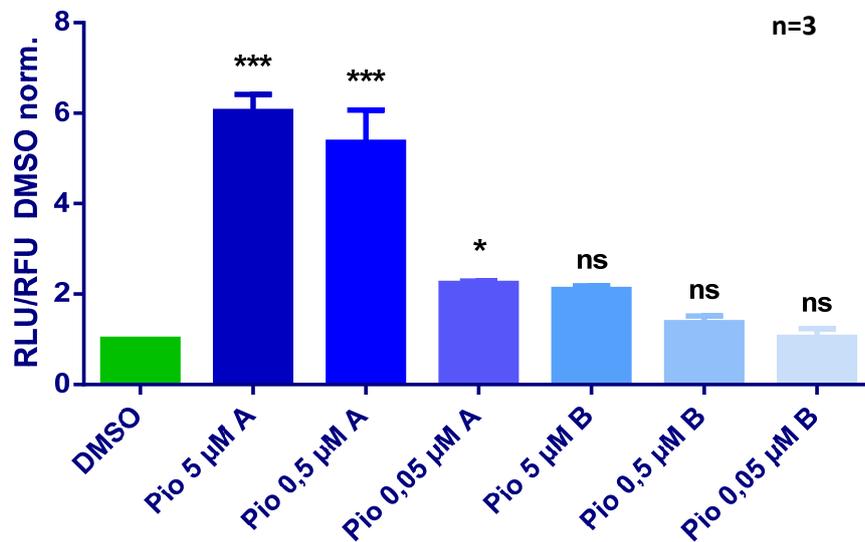
### 2.1 Aktivierung von PPAR $\gamma$ durch Pioglitazon

Der auch klinisch verwendete volle PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon wurde in mehreren Konzentrationen (30  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M) mit zwei Transfektionsmischungen TM<sub>1</sub> und TM<sub>2</sub> getestet (s. **Abbildung 23**).

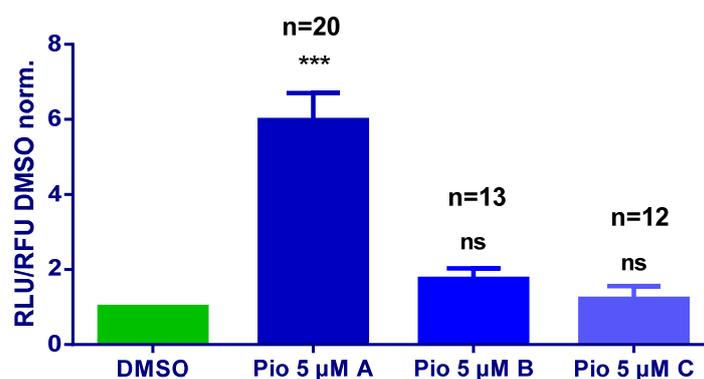


**Abbildung 23.** Aktivität des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon in den Konzentration 0,1–30  $\mu$ M. Pioglitazon, A: TM<sub>1</sub> (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP), B: TM<sub>2</sub> (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \* bei  $p < 0,05$ , \*\* bei  $p < 0,01$  und \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

Die höchste Aktivität zeigten die Konzentrationen von 1 bis 3  $\mu\text{M}$ . Außerdem wurden Konzentrationen von 0,05–5  $\mu\text{M}$  getestet (s. **Abbildung 24**) um die Effekte mit vorhergehenden Experimenten zu vergleichen. Schließlich wurde 5  $\mu\text{M}$  als Konzentration für alle drei Transfektionsmischungen gewählt und getestet (s. **Abbildung 25**). Auch bei den Neolignanexperimenten wurde Pioglitazon als positive Kontrolle in der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  verwendet.



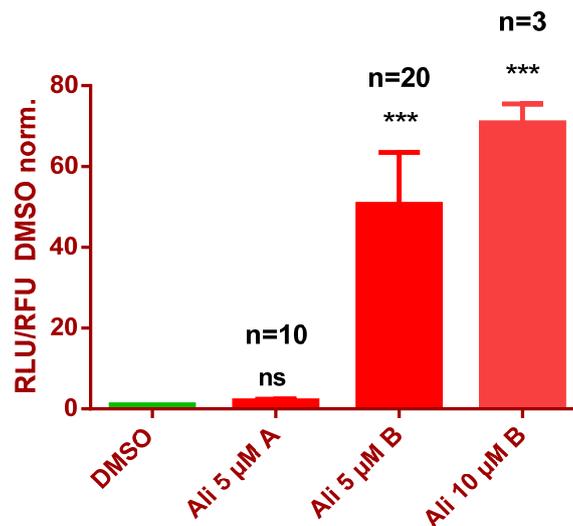
**Abbildung 24.** Aktivität des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon in den Konzentration 0,05 –5  $\mu\text{M}$ . Pio-Pioglitazon, A: TM<sub>1</sub> (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP), B: TM<sub>2</sub> (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \* bei  $p < 0,05$  und \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.



**Abbildung 25.** Aktivität des PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon in der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ . Pio-Pioglitazon, A: TM<sub>1</sub> (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP), B: TM<sub>2</sub> (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP), C: TM<sub>3</sub> (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

## 2.2 Aktivierung von RXR $\alpha$ durch Alitretinoin (mit TM<sub>2</sub>)

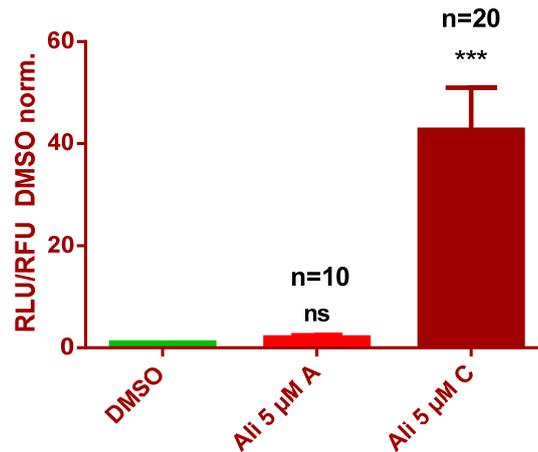
Um die Aktivierung von RXR $\alpha$  zu überprüfen wurde das in der Literatur als voller RXR $\alpha$ -Agonist beschriebene Alitretinoin (9 cis-Retinoisäure) verwendet und in einer Konzentration von 5 und 10  $\mu$ M getestet. Alitretinoin wurde mit Transfektionsmischungen TM<sub>1</sub> und TM<sub>2</sub> getestet. Wie die **Abbildung 26** zeigt, ist die Aktivität von Alitretinoin bei Verwendung von TM<sub>1</sub> deutlich niedriger. Die Plateaukonzentration für die RXR $\alpha$ -Modulation liegt zwischen 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M. Für das Screening der Neolignanderivate wurde eine Konzentration von 5  $\mu$ M benutzt.



**Abbildung 26.** Alitretinoin und deren Effekt auf RXR $\alpha$ - und PPAR $\gamma$ -Rezeptoren. **A:** TM<sub>1</sub> (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP), **B:** TM<sub>2</sub> (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

## 2.3 Aktivierung von RXR $\alpha$ durch Alitretinoin (mit TM<sub>3</sub>)

Wie bereits in der Einleitung erläutert, binden RXR $\alpha$ -Homodimere an RXRE. Alitretinoin wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ M getestet. In **Abbildung 27** ist das Ausmaß der RXRE-vermittelten Transaktivierung bei TM<sub>3</sub> im Vergleich zu TM<sub>1</sub> sowie DMSO dargestellt.



**Abbildung 27.** Alitretinoin und deren RXR $\alpha$ -Aktivität. C: TM<sub>3</sub> (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP) zeigt deutlichen Unterschied gegenüber A: TM<sub>1</sub> (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP) und DMSO. Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

## 2.4 Untersuchung von Neolignanderivaten auf die PPAR $\gamma$ -Aktivität

Die Neolignanderivate wurden nach ihrer Herkunft in zwei Gruppen aufgeteilt; synthetische und semisynthetische Derivate. Die Ergebnisse der Experimente sind nach Gruppe der Derivate und Art der Transfektionsmischung unterteilt. Die Derivate wurden auf ihre PPAR $\gamma$  Aktivität mittels Luciferase Reporter Gen Assays, indem HEK-293 Zellen mit PPAR $\gamma$ , PPARE und EGFP im Verhältnis 2:2:1 transfiziert wurden, untersucht. Pioglitazon in 5  $\mu$ M Konzentration wurde als positive Kontrolle und DMSO als negative Kontrolle verwendet.

### 2.4.1 Synthetische Neolignanderivate und deren PPAR $\gamma$ -Aktivität

Zehn synthetische Neolignanderivate, zur Verfügung gestellt von der TU Wien (Arbeitsgruppe Mihovilovic, Institut für Angewandte Synthesechemie), wurden wie oben beschrieben getestet und die Ergebnisse in **Abbildung 28** zusammengefasst.

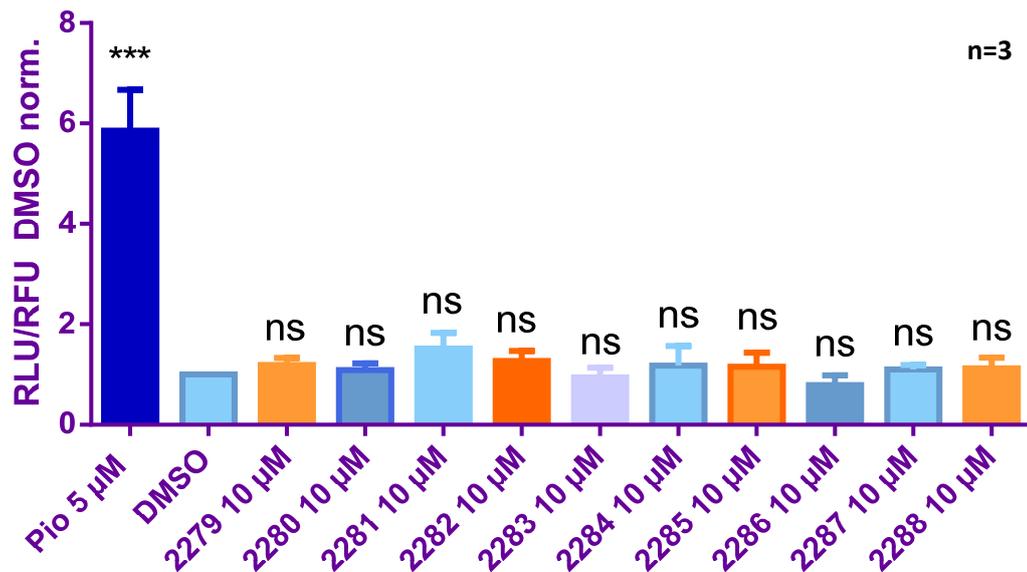


Abbildung 28. Darstellung der PPAR $\gamma$ -Aktivität von 10 synthetischer Neolignanderivaten (Probennummern; 2279–2288) mit TM $_1$  (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

#### 2.4.2 Die PPAR $\gamma$ -Aktivität der semisynthetischen Neolignane

13 semisynthetische Neolignanderivate erhalten von Dr. Wolfgang Schuehly (Karl-Franzens Universität Graz, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften) wurden getestet. Einige von ihnen zeigten höhere Aktivitäten im Vergleich zu den synthetischen Neolignanderivaten wie in **Abbildung 29** ersichtlich ist.

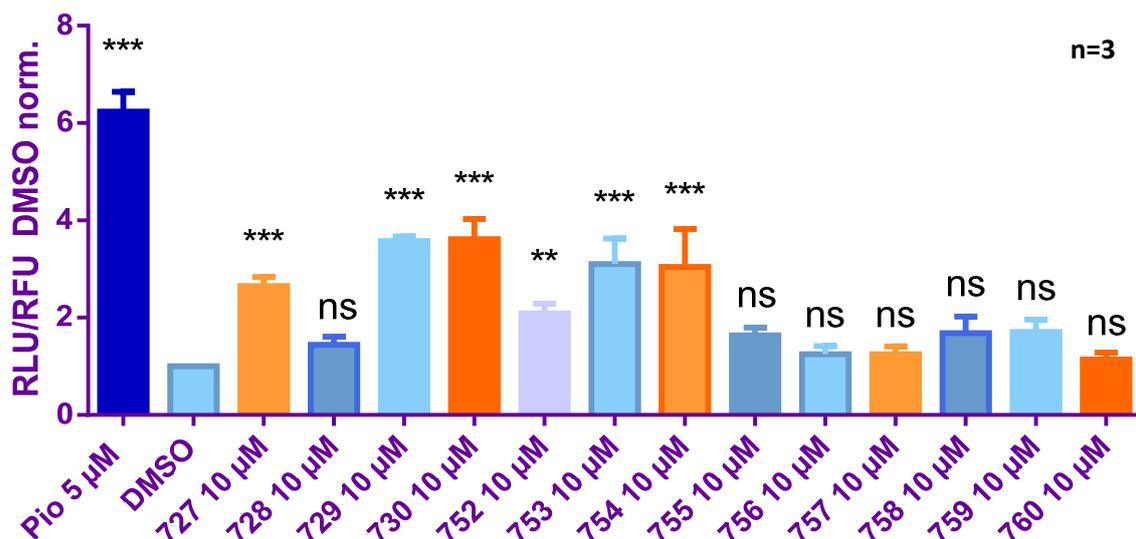


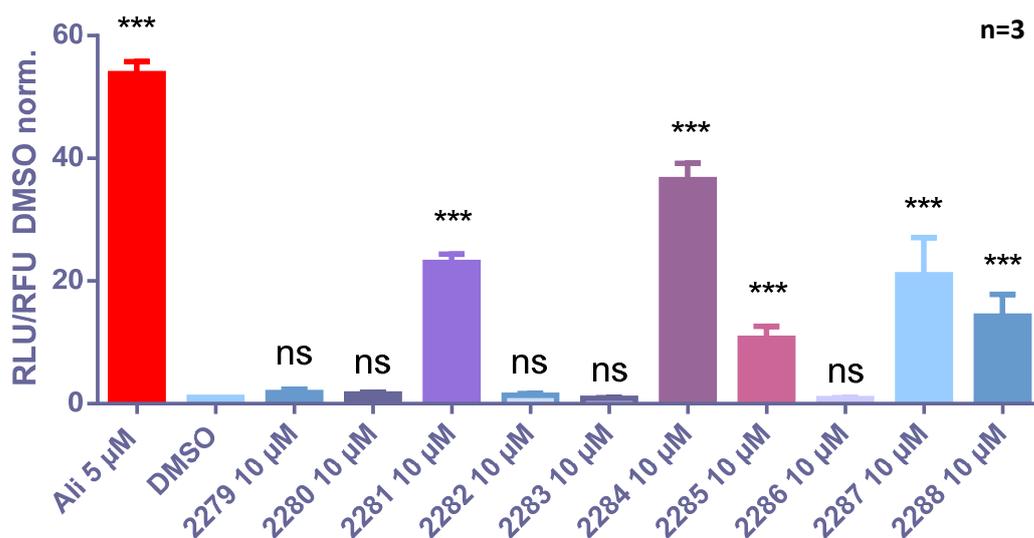
Abbildung 29. Darstellung der PPAR $\gamma$ -Aktivität; 13 partialsynthetischer Neolignanderivate 727–730 und 752–760 mit TM $_1$  (PPAR $\gamma$  + PPARE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\* bei  $p < 0,01$ , \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

## 2.5 Untersuchung von Neolignanderivaten auf RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM<sub>2</sub>)

Von besonderem Interesse war zu testen, ob unter den PPAR $\gamma$ -Agonisten auch einige im Stande sind RXR $\alpha$  zu modulieren. Dazu wurden die Neolignanderivate mit RXR $\alpha$ , PPARE und EGFP transfizierten Zellen (im Verhältnis 2:2:1) getestet. Nach den durchgeführten Luciferase Reporter gen Experimenten zeigten sich einige Derivate als duale Modulatoren, andere Derivate ohne PPAR $\gamma$ -Aktivität zeigten aber eine Aktivität am RXR $\alpha$ . Der Luciferase Assay wurde mit Alitretinoin in der Konzentration von 5  $\mu$ M als positive Kontrolle und DMSO als negative Kontrolle durchgeführt.

### 2.5.1 Synthetische Neolignanderivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität

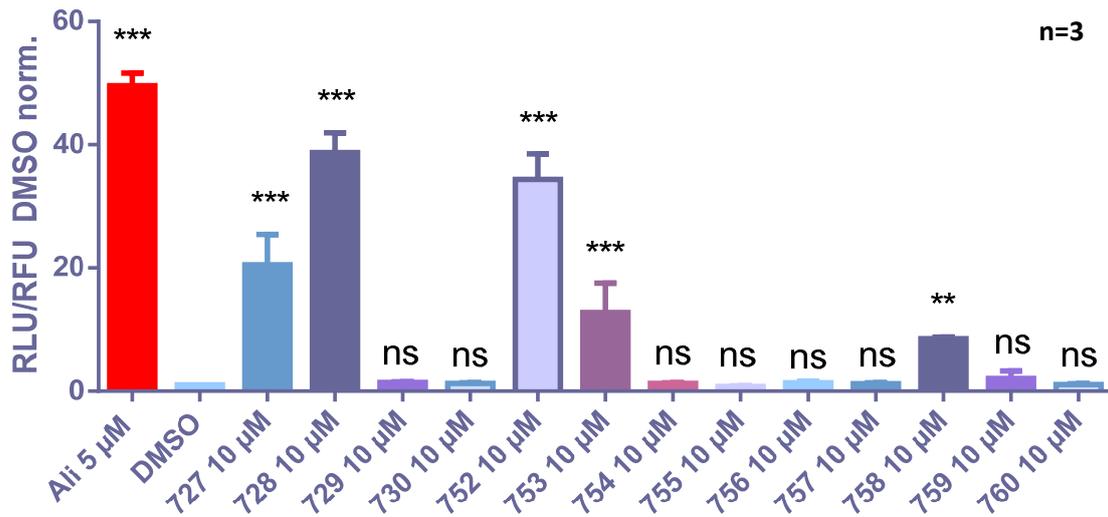
Die Ergebnisse der synthetischen Derivate 2279-2288 sind in **Abbildung 30** zu sehen. Derivate 2281, 2284, 2285, 2287 und 2288 zeigen eine RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität über PPARE.



**Abbildung 30.** Darstellung der RXR $\alpha$ -Aktivität; 10 synthetischer Neolignanderivate; 2279–2288 mit **TM<sub>2</sub>** (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP). Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

### 2.5.2 Die RXR $\alpha$ -Aktivität der semisynthetischen Neolignane

Die partialsynthetische Derivate 727–730 und 752–760 getestet wie im Kapitel 2.5 beschrieben, sind in **Abbildung 31** zu sehen. Die Derivate 727, 728, 752, 753 und 758 zeigen eine RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität über PPARE.



**Abbildung 31.** Darstellung der RXR $\alpha$ -Aktivität; 13 partialsynthetischer Neolignanderivate 727–730 und 752–760 mit **TM<sub>2</sub>** (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\* bei  $p < 0,01$ , \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

## 2.6 Untersuchung von Neolignanderivaten auf RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM<sub>3</sub>)

Die RXR $\alpha$ -Modulatoren zeigten in Experimenten mit TM<sub>2</sub> (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP) eine PPARE-vermittelte Transaktivierungsaktivität vergleichbar mit der RXRE-vermittelten Transaktivierungsaktivität bei der TM<sub>3</sub> (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP). RXR $\alpha$ -Agonisten aktivieren die RXR $\alpha$  und führen zur RXR $\alpha$ -RXR $\alpha$ -Homodimer Bildung. In weiterer Folge binden diese Homodimere an die RXR-Response Elemente was in weiterer Folge zur Transkription von Luciferase führt. Hierfür wurden die HEK-293 Zellen mit RXR $\alpha$ , RXRE und EGFP im Verhältnis 2:2:1 transfiziert. Bei den Luciferase Assays durchgeführt mit TM<sub>3</sub> wurde 5 µM Alitretinoin als positive- und DMSO als negative Kontrolle verwendet.

### 2.6.1 Synthetische Neolignanderivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität

Von den 10 synthetischen Neolignanderivaten zeigten die RXR $\alpha$ -Modulatoren 2281, 2284, 2285, 2287 und 2288 auch eine RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität über RXRE (s. **Abbildung 32**).

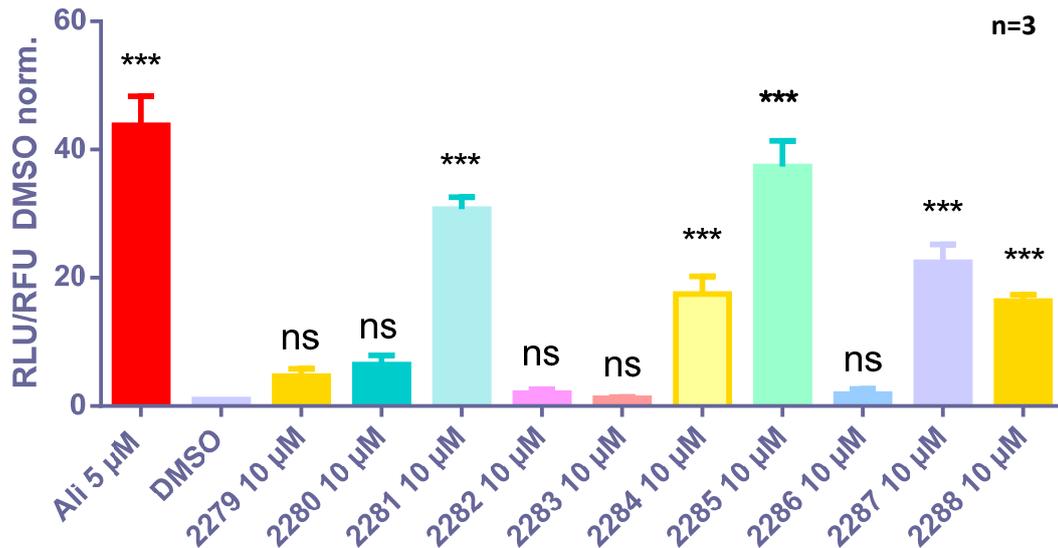


Abbildung 32. Darstellung der RXR $\alpha$ -Aktivität; 10 synthetischer Neolignanderivate 2279-2288 mit TM<sub>3</sub> (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

## 2.6.2 Semisynthetische Neolignane und deren RXR $\alpha$ -Aktivität

In **Abbildung 33** zeigten von den 13 semisynthetischen Derivaten, getestet nach Bedingungen wie im Kapitel 2.6 beschrieben, die Substanzen 727, 728, 752, 753 und 758 eine RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität über RXRE.

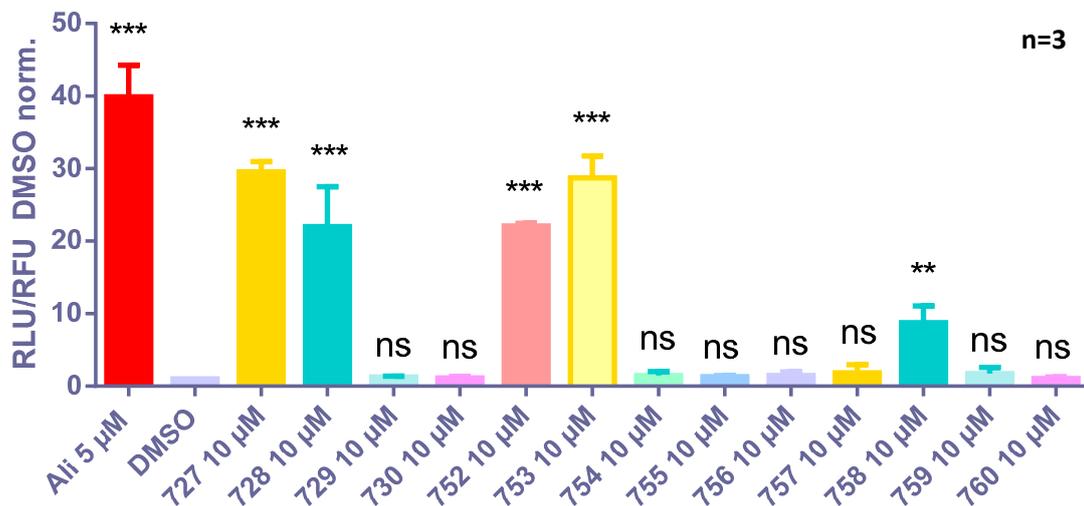


Abbildung 33. Darstellung der RXR $\alpha$ -Aktivität; 13 partialsynthetischer Neolignanderivate 727-730, 752-760 mit TM<sub>3</sub> (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP). Die Signifikanz wurde mit Ordinary one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparisons test) beurteilt; \*\* bei  $p < 0,01$ , \*\*\* bei  $p < 0,001$ , ns-nicht signifikant.

### 3 VERGLEICH VON RXR $\alpha$ -AGONISTEN UND DEREN TRANSAKTIVIERUNGS-AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VOM RESPONSE ELEMENT (PPARE UND RXRE)

In den **Abbildungen 34** und **35** sind die Ergebnisse der Neolignanderivate mit ihren Aktivitäten in den Experimenten mit den Transfektionsmischungen TM<sub>2</sub> und TM<sub>3</sub> angeführt. Semisyntetische Neolignane sind in der **Abbildung 34** und die vollsynthetischen in **Abbildung 35** zusammengefasst. Eine ausgeprägtere PPARE- vermittelte Transaktivierungsaktivität zeigten Honokiol, Substanzen 752 und 2284, während Magnolol, Substanzen 753, 2281, 2285 eine ausgeprägtere RXRE-vermittelte Transaktivierungsaktivität zeigten.

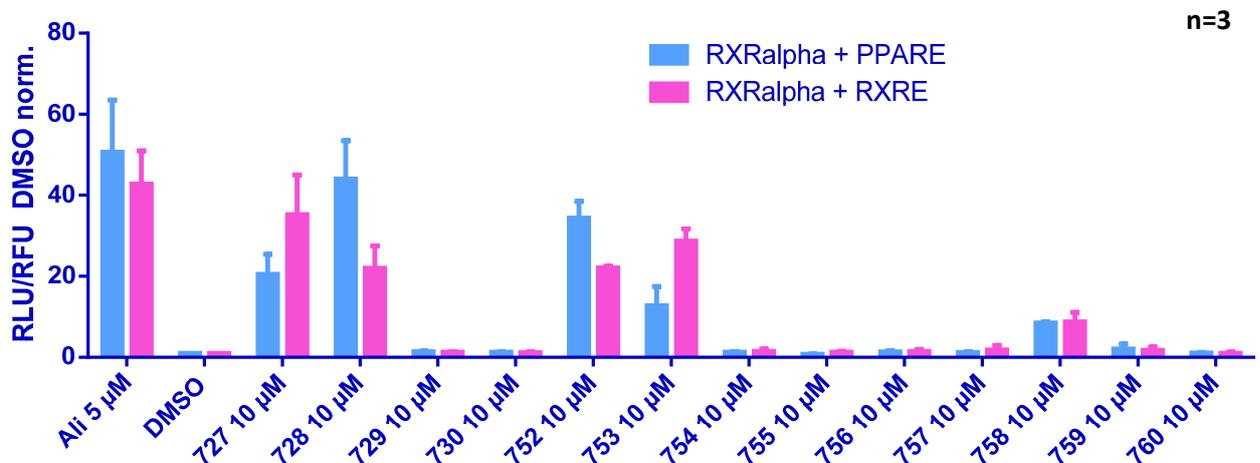


Abbildung 34. PPARE- und RXRE- vermittelte Transaktivierungsaktivitäten der Neolignanderivate 727–730 und 752–760.

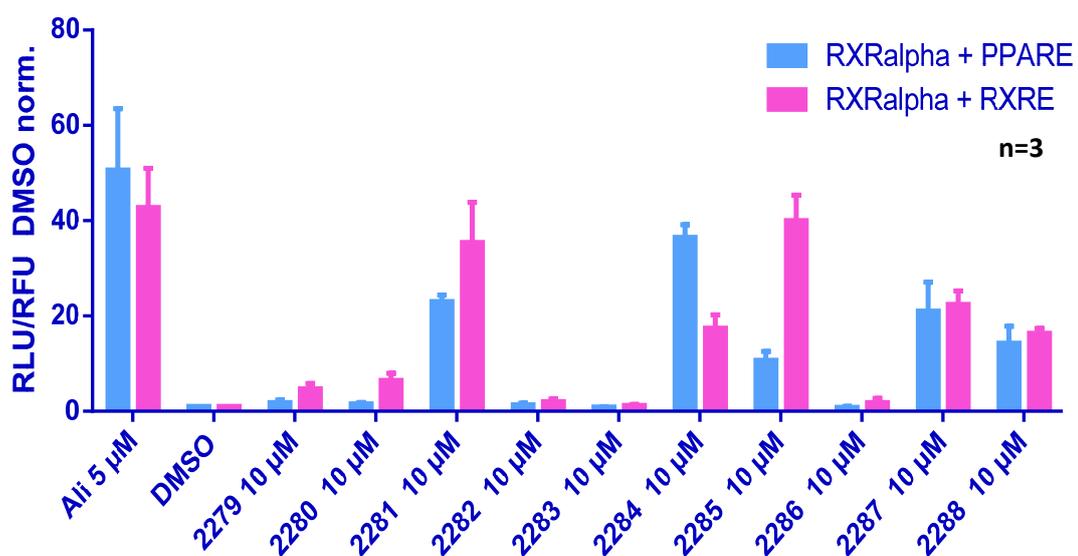
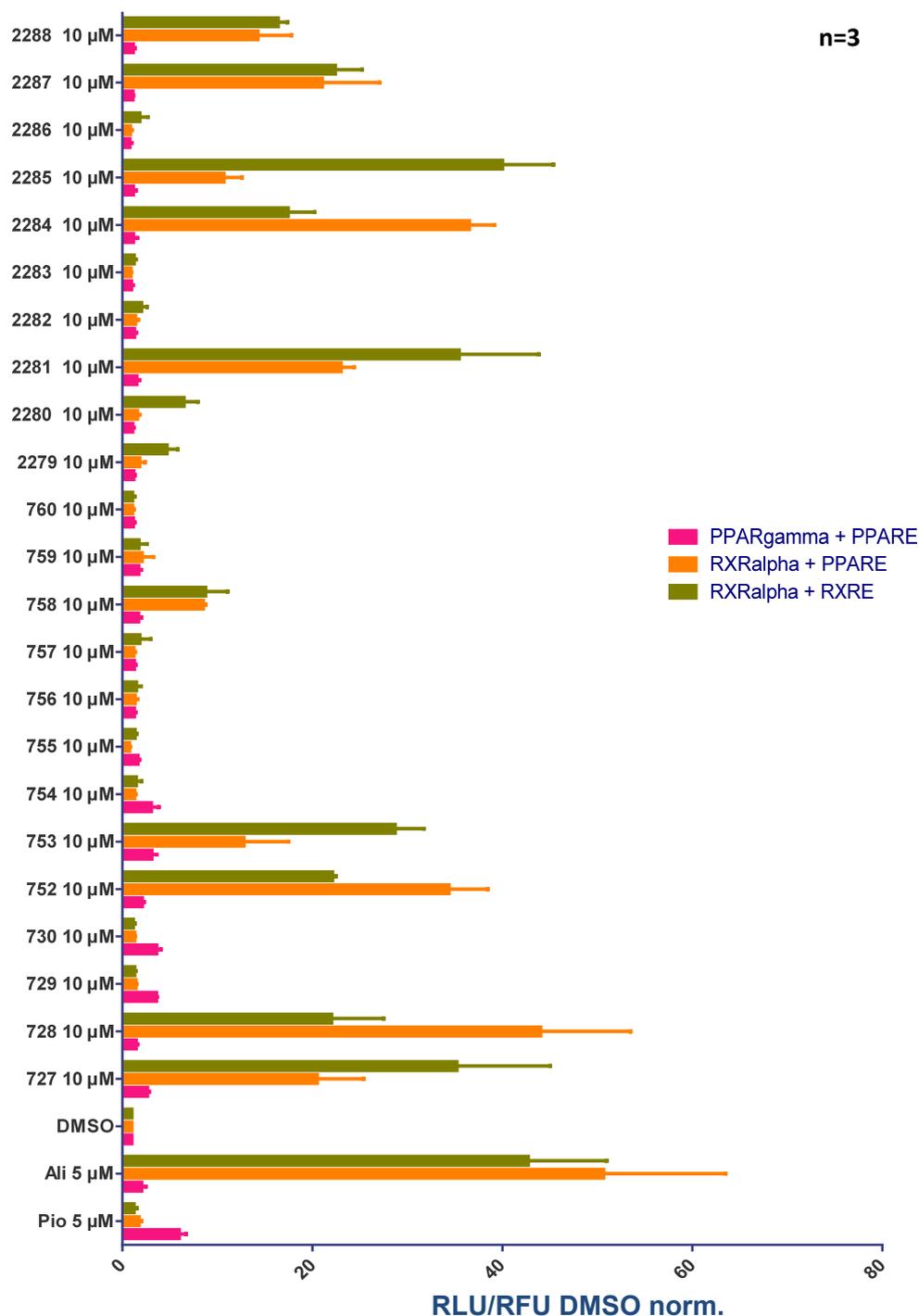


Abbildung 35. PPARE- und RXRE-vermittelte Transaktivierungsaktivitäten der Neolignanderivate 2279–2288.

#### 4 ÜBERBLICK ALLER GETESTETEN NEOLIGNANDERIVATE

In der **Abbildung 36** sind alle Ergebnisse der Neolignanderivate, die mit den drei Transfektionsmischungen getestet wurden, zusammengefasst. Über die einzelnen Modulatoren ist mehr im Kapitel Diskussion angeführt (die systemischen Bezeichnungen und chemischen Strukturen der getesteten Neolignane befinden sich im Anhang Kapitel 1 und 2).



**Abbildung 36.** Überblick aller 23 Neolignanderivate und ihre PPAR $\gamma$ - und RXR $\alpha$ -Aktivitäten. Dargestellt sind deren mittlere RLU/RFU-Werte, die Background reduziert und auf DMSO Aktivität normalisiert wurden. Die Ergebnisse stammen von Daten dreier unabhängig durchgeführter Experimente.

---

# Diskussion

---

## F. DISKUSSION

### 1 LUCIFERASE REPORTERGEN ASSAY

Die HEK-293 Zelllinie kam durch die Vorteile, die sie für den Luciferase Reporter Gen Assay bietet, zum Einsatz. HEK-293 Zellen sind einfach zu kultivieren und handzuhaben. Gegenüber Transfektionen zeigten sie keinen großen Stress und nehmen die Plasmide gut auf. Die auf Calciumphosphat basierende Transfektion zeigte im Vergleich zu *Fugene® HD*-basierender Transfektion höhere Effizienz [18]. Alle Verdünnungen enthielten DMSO in der Konzentration 0,1-0,4%, die keinen Effekt auf die Luciferase Aktivität gezeigt hatte [18].

## 2 UNTERSUCHUNGEN VON NEOLIGNANDERIVATEN AUF DEREN POTENTIAL ZUR PPAR $\gamma$ -MODULATION

Die *fold activation* (RLU-/RFU-Werte normalisiert auf RLU-/RFU-Werte von DMSO) von Pioglitazon beträgt 5,98 *fold* (von 20 unabhängigen Experimenten). Stellt man die *fold activation* von Pioglitazon gleich 100%, beträgt die DMSO Aktivität 16,72% der durchschnittlichen *fold activation* von Pioglitazon. Vergleicht man die Aktivitäten der Derivate (normalisiert auf DMSO) mit der Aktivität von Pioglitazon, ergibt sich folgende Gruppierung:

Aktivität in %  $\leq 16,72\%$  → Derivat zeigt keine Modulation,

Aktivität in % zwischen 25 – 30% → Derivat zeigt geringe Modulation,

Aktivität in % zwischen 30 – 50% → Derivat zeigt moderate Modulation,

Aktivität in %  $> 50\%$  → Derivat zeigt starke Modulation.

Die getesteten Neolignane umfassen 10 synthetische und 13 partialsynthetische Derivate. Die synthetischen Derivate von der TU Wien zeigten ausschließlich keine bzw. nur geringe PPAR $\gamma$ -Modulation. Die höchste Aktivität der synthetischen Derivaten zeigte die Substanz 2281 mit einer *fold activation* von 1,57, was nur 26% der durchschnittlichen Aktivität von Pioglitazon entspricht. Im Gegensatz dazu zeigten bei den partialsynthetischen mehrere Derivate eine PPAR $\gamma$ -Modulation; Magnolol, Honokiol, Dieugenol, Tetrahydrodieugenol, sowie die Proben mit den Nummern; 752, 753, 754, 755, 758 und 759. In der **Tabelle 31** sind die PPAR $\gamma$ -Aktivitäten der zehn partialsynthetischen Derivate prozentuell angegeben.

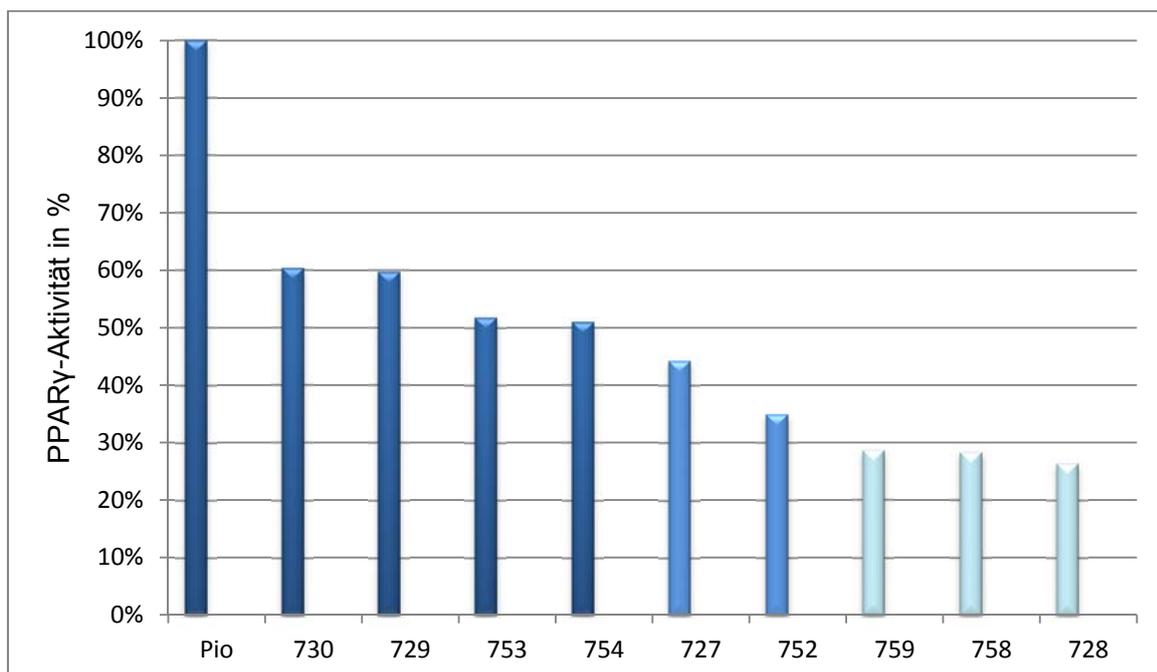
Derivate	Aktivität in % bezogen auf PioA
Magnolol	44,3
Honokiol	26,4
Dieugenol	59,7
Tetrahydrodieugenol	60,4
752	35,0
753	51,8
754	51,0
755	27,4
758	28,3
759	28,6

**Tabelle 31.** Partialsynthetische Derivate und deren Aktivität in % bezogen auf PioA-Pioglitazon Aktivität als 100%.

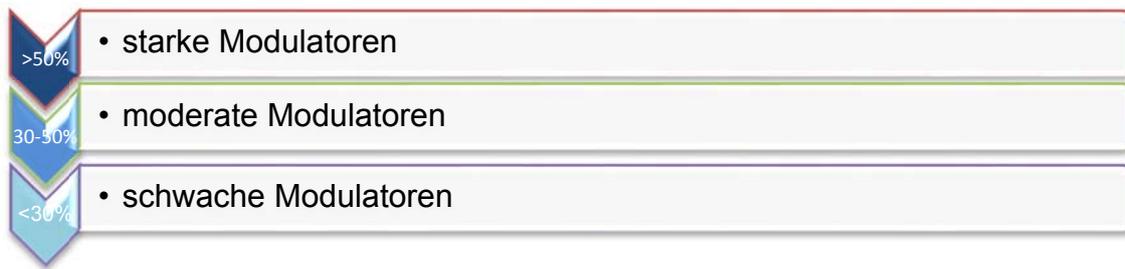
Durch die Strukturanalyse der partialsynthetischen und synthetischen Derivate kommt man zur Schlussfolgerung, dass die partialsynthetischen Derivate die Grundstruktur von  $2 \times C_6-C_3$  Einheiten beibehalten haben, während bei den synthetischen die Propyl- bzw. Propylengruppen an einem der beiden Benzenringe fehlt. Dieses könnte erklären wieso die synthetischen Derivate keine oder nur geringe PPAR $\gamma$ -Rezeptor Modulation zeigten.

Die Substanz 760 als partialsynthetisches Derivat zeigte ebenso geringe PPAR $\gamma$  Modulation wie die synthetischen Derivate. Die Gemeinsamkeit aller dieser Substanzen ist das Fehlen der  $C_3$ -Seitenkette(n). Während bei der Substanz 760 beide Propylgruppen mit zwei Hydroxyethyl-Gruppen substituiert wurden, sind die vollsynthetischen Derivate strukturell diversifizierter.

Die höchste Aktivität gegenüber PPAR $\gamma$  zeigten Tetrahydrodieugenol (730) und Dieugenol (729), außer ihnen gehören noch die Substanzen 753 und 754 zu den starken Modulatoren. Magnolol (727) und Substanz 752 zeigten sich als moderate Modulatoren während Honokiol (728), und die Substanzen 758 sowie 759 zu den Derivaten mit geringer Modulationsfähigkeit von PPAR $\gamma$  gehören (s. **Abbildung 37**).



**Abbildung 37.** PPAR $\gamma$ -Aktivität der partialsynthetischen Neolignane nach Intensität. Pio-Pioglitazon (zur Beschreibung der Säulenfarben s. **Abbildung 38**)



**Abbildung 38. Kennzeichnung der Modulatoren. Dunkelblau-starke-, blau-moderate-, hellblau-schwache Modulatoren.**

Die Affinität von Magnolol, Dieugenol und Tetrahydrodieugenol zur PPAR $\gamma$ -Liganden bindender Domäne (LBD) wurde zu einem früheren Zeitpunkt vor dieser Arbeit schon durch Lanthascreening-Experimente gezeigt. Dieugenol und Tetrahydrodieugenol zeigten in diesen Experimenten, sogar eine höhere Affinität zur LBD als Pioglitazon. Weiter wurde im Rahmen dieser Studie erkannt, dass Dieugenol und Tetrahydrodieugenol selektiv an PPAR $\gamma$  binden, also keine Bindung an die LBD von PPAR $\alpha$  oder PPAR $\beta/\delta$  zu beobachten war. Magnolol, hingegen aktiviert außer PPAR $\gamma$  noch PPAR $\beta/\delta$ , jedoch in höheren Konzentrationen. Die höhere Aktivität von Dieugenol und Tetrahydrodieugenol im Vergleich zu Magnolol lässt sich durch mehr Interaktion mit der LBD erklären, wie in Molekular Docking-Studien festgestellt wurde [18].

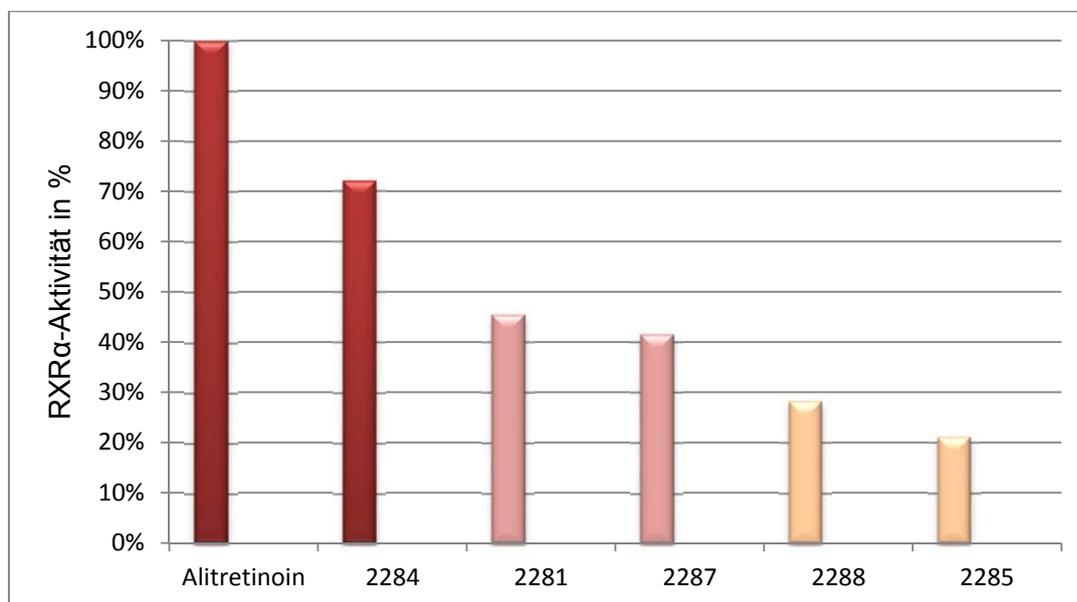
### 3 UNTERSUCHUNGEN VON NEOLIGNANDERIVATEN AUF DEREN POTENTIAL ZUR RXR $\alpha$ -MODULATION (BEI TM<sub>2</sub>)

Die synthetischen Derivate zeigten keine bzw. nur geringe PPAR $\gamma$ -Modulation. Allerdings zeigten fünf von den zehn Derivaten (2281, 2284, 2285, 2287 und 2288) RXR $\alpha$ -Modulation. In **Tabelle 32** ist deren Aktivität in % dargestellt, bezogen auf die Aktivität von Alitretinoin als 100%.

Derivate	Aktivität in % bezogen auf AliA
2281	45,4
2284	72,1
2285	21,1
2287	41,5
2288	28,2

**Tabelle 32.** Synthetische Derivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität in % bezogen auf die Aktivität von Alitretinoin (AliA-Alitretinoin Aktivität).

In **Abbildung 39** sind die Derivate nach Aktivität gereiht. Substanz 2284 gehört zu den starken RXR $\alpha$ -Modulatoren, die Substanzen 2281 und 2287 zu den moderaten Modulatoren, während Substanzen 2285 und 2288 zu den Derivaten mit geringerer Modulation zählen.



**Abbildung 39.** RXR $\alpha$ -Aktivität der Substanzen 2281, 2284, 2285, 2287 und 2288 in %, bezogen auf die Aktivität von Alitretinoin als 100% (zur Beschreibung der Säulenfarben s. **Abbildung 42**).

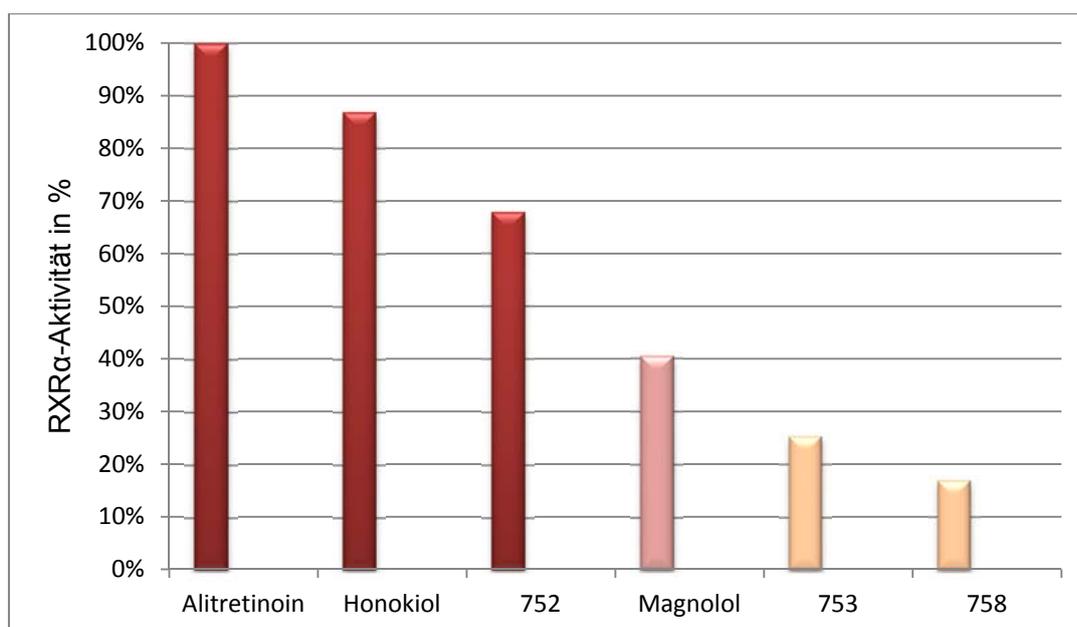
Unter den partialsynthetischen Neolignanen zeigten 10 von 13 eine PPAR $\gamma$ -Modulation, aber nur fünf von ihnen eine RXR $\alpha$ -Modulation. Vier von diesen Substanzen sind duale Agonisten; Magnolol, Honokiol, Substanz 752 sowie 753. Substanz 758 zeigte nur eine geringe RXR $\alpha$ -

Aktivität. Die prozentuellen Aktivitäten, der aktiven RXR $\alpha$ -Modulatoren, sind in **Tabelle 33** zusammengefasst.

Derivate	Aktivität in % bezogen auf AliA
Magnolol	40,50
Honokiol	86,91
752	67,84
753	25,25
758	16,84

**Tabelle 33.** Semisynthetische Derivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität in % bezogen auf die Aktivität von Alitretinoin als 100% (AliA-Alitretinoin Aktivität).

Honokiol zeigte eine sehr starke RXR $\alpha$ -Modulation, dessen Intensität vergleichbar mit der positiven Kontrolle Alitretinoin ist. Auch Substanz 752 zeigte starke Modulation, Magnolol mit 40,5% eine moderate Modulation, während die Substanzen 753 und 758 zu Modulatoren mit geringer Modulation zählen (dargestellt in **Abbildung 40**).



**Abbildung 40.** RXR $\alpha$ -Aktivität der Substanzen Magnolol, Honokiol, 752, 753 und 758 in %, bezogen auf die Aktivität von Alitretinoin als 100% (zur Beschreibung der Säulenfarben s. **Abbildung 42**).

Von allen im Rahmen dieser Arbeit, getesteten synthetischen und partialsynthetischen Derivaten zeigte Honokiol die stärkste RXR $\alpha$ -Modulation von 86,91%. Die ausgeprägte RXR $\alpha$  Aktivität von Honokiol im Vergleich zu Magnolol wurde bereits beschrieben [54]. Alle Derivate mit RXR $\alpha$ -Aktivität, getestet mit TM<sub>2</sub>, sind in **Abbildung 41** zusammengefasst.

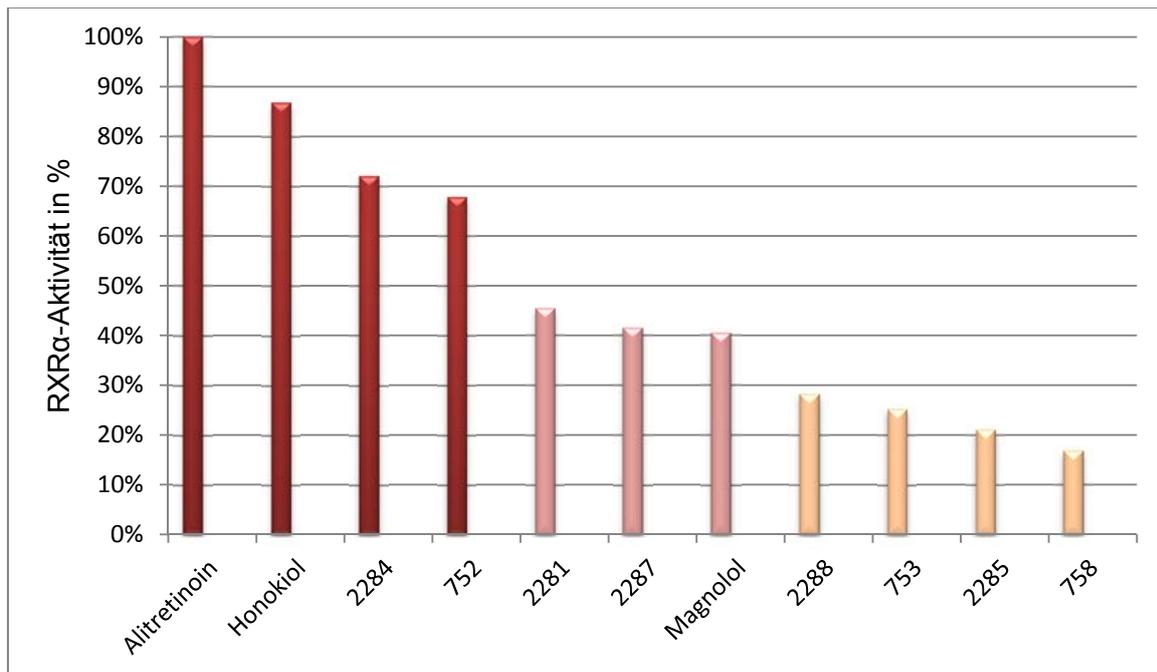


Abbildung 41. RXR $\alpha$ -Aktivität von 10 synthetischen und partialsynthetischen Derivate, dargestellt in %, bezogen auf die Aktivität von Alitretinoin als 100% (zur Beschreibung der Säulenfarben s. Abbildung 42).

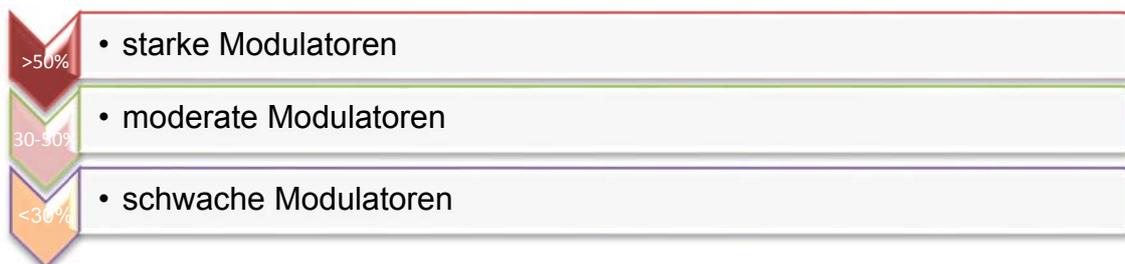


Abbildung 42. Kennzeichnung der Modulatoren. Rot-starke-, rosa-moderate-, hell rosa-schwache Modulatoren.

### 3.1 RXR $\alpha$ - Homodimere bei Transfektionsmischung 2

Bei der Transfektionsmischung 2 liegt ein Spezialfall vor. Die HEK-293 Zellen wurden hier mit RXR $\alpha$ - und PPARE-Plasmiden transfiziert. Wie schon in der Einleitung ausführlich beschrieben, setzen PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Heterodimere die PPARE-Transkription in Gang. Der Level an endogenen PPAR $\gamma$  sollte zu niedrig sein, um hohe *fold activation* zu zeigen wie Ergebnisse der Experimente mit dieser Transfektionsmischung zeigen (s. Kapitel 3 und 4 der Resultate). Vergleicht man die *fold activations* der genannten Modulatoren bei den dreien Transfektionsmischungen kommt man zur Schlussfolgerung, dass sie bei TM<sub>2</sub> und TM<sub>3</sub> annähernd gleich sind, im Gegensatz zu TM<sub>1</sub> bei der die *fold activations* um ca. das 10-40fache geringer sind. Neben den PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ -Heterodimeren sind es auch die RXR $\alpha$ -Homodimere die an der PPARE-vermittelten Transaktivierung beteiligt sind. Im welchen Ausmaß jeder von diesen Rezeptorkomplexen beteiligt ist, bleibt noch festzustellen.

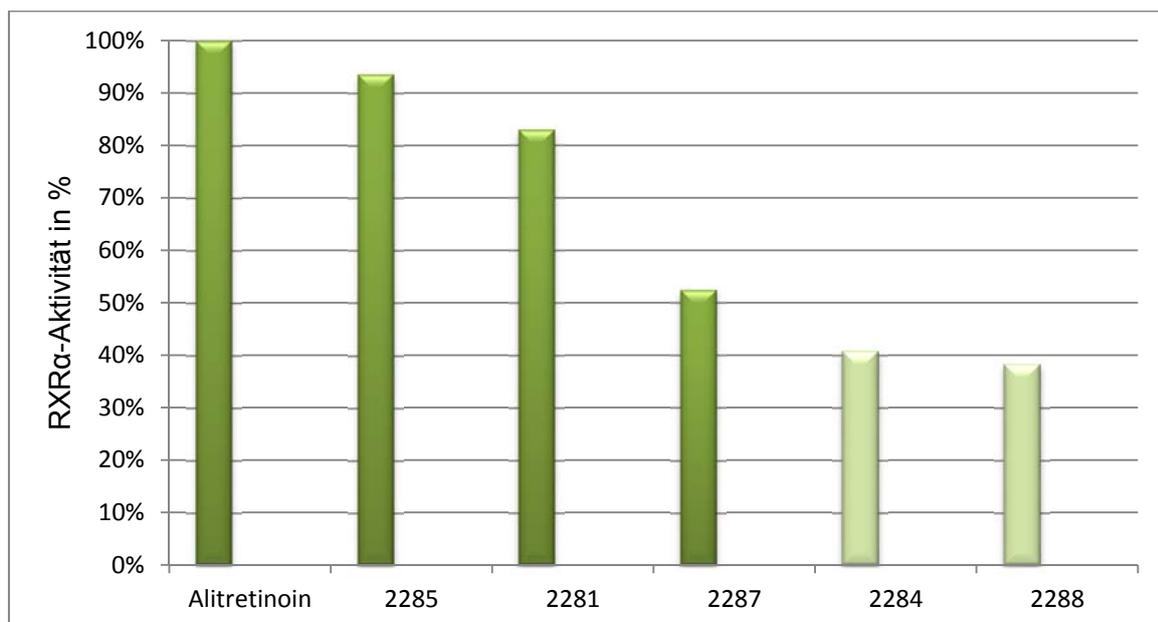
#### 4 UNTERSUCHUNG DER NEOLIGNANDERIVATE AUF DEREN POTENTIAL ZUR RXR $\alpha$ -MODULATION (BEI TM<sub>3</sub>)

RXR $\alpha$ - Modulatoren binden und aktivieren RXR $\alpha$ -Proteine die exogen durch RXR $\alpha$ -Plasmide zugeführt wurden. Diese dimerisieren zu RXR $\alpha$ -RXR $\alpha$ -Homodimeren und binden zuletzt an RXRE. Die Derivate zeigten unterschiedliche Aktivität in Bezug auf die PPARE- und RXRE-abhängige Transaktivierung. In der **Tabelle 34** ist die RXR $\alpha$ -Aktivität der synthetischen Neolignane bei TM<sub>3</sub> angeführt.

Derivate	Aktivität in % bezogen auf AliA
2281	82,97
2284	40,83
2285	93,64
2287	52,46
2288	38,37

**Tabelle 34.** Synthetische Derivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität bei (bei TM<sub>3</sub>) in % bezogen auf AliA- Alitretinoin Aktivität als 100%.

Die Substanz 2285 mit der Aktivität von 93,64% erreicht fast den Wert der positiven Kontrolle Alitretinoin. Zu den starken Modulatoren zählen auch 2281 mit 82,97% und 2287 mit 52,46% der Aktivität der Positivkontrolle. Die Substanzen 2284 und 2288 gehören zu den moderaten Modulatoren (s. **Abbildung 43**).



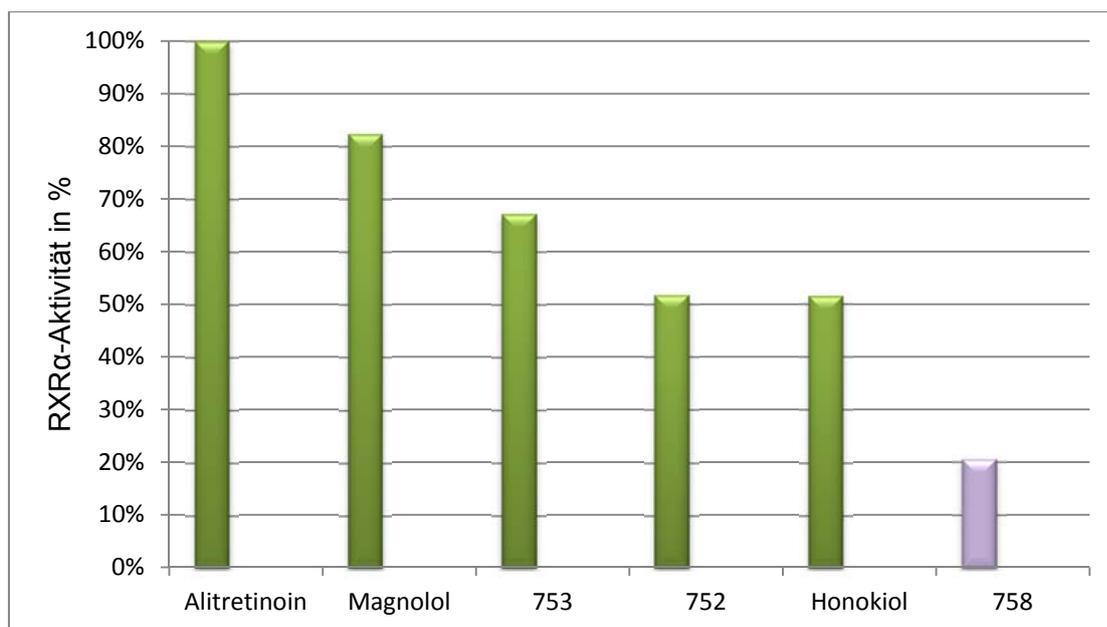
**Abbildung 43.** RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM<sub>3</sub>) der Substanzen 2281, 2284, 2285, 2287 und 2288 in %, bezogen auf Alitretinoin Aktivität als 100% (zur Beschreibung der Säulenfarben s. **Abbildung 46**).

Die RXR $\alpha$ -Aktivität der semisynthetischen Neolignane bei TM<sub>3</sub> ist in **Tabelle 35** angeführt.

Derivate	Aktivität in % bezogen auf AliA
Magnolol	82,41
Honokiol	51,52
752	51,75
753	67,20
758	20,52

**Tabelle 35.** Partialsynthetische Derivate und deren RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM<sub>3</sub>) in % bezogen auf AliA-Alitretinoin Aktivität als 100%.

Bei den partialsynthetischen Neolignanen zeigten sogar vier von den fünf RXR $\alpha$ -Modulatoren eine starke RXR $\alpha$ -Modulation. Zu ihnen gehören Magnolol mit der höchsten Aktivität von 82,4%, weiters Substanz 753 mit 67,2%, Honokiol und Substanz 752 mit ca. gleicher Aktivität von 51,5%. Die Substanz 758 als schwacher RXR $\alpha$ -Modulator zeigte auch hier eine geringe Modulation von 20,5% (s. **Abbildung 44**).



**Abbildung 44.** RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM<sub>3</sub>) der Substanzen Magnolol, Honokiol, 752, 753 und 758 in %, bezogen auf Alitretinoin Aktivität als 100% (zur Beschreibung der Säulenfarben s. **Abbildung 46**).

Von allen getesteten synthetischen und partialsynthetischen Derivaten zeigte die Substanz 2285 die stärkste RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität über RXRE. Alle getestete Derivate die eine RXR $\alpha$ -Aktivität bei der TM<sub>3</sub> zeigten sind im **Abbildung 45** zusammengefasst.

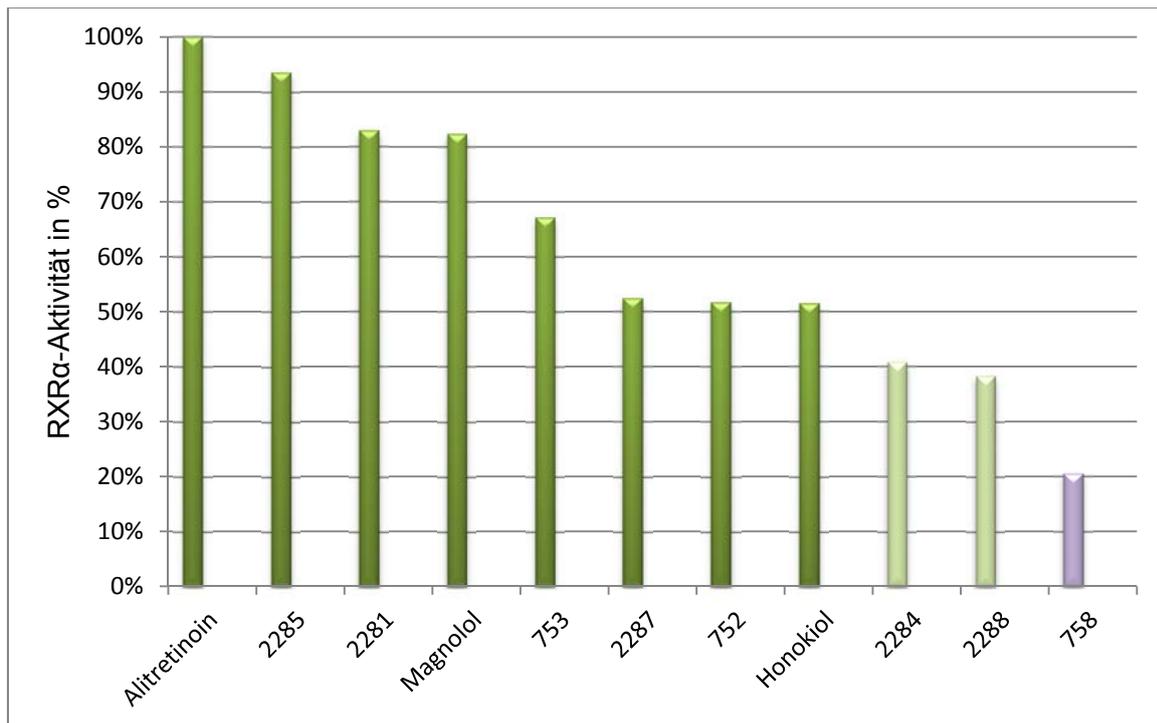


Abbildung 45. RXR $\alpha$ -Aktivität (bei TM<sub>3</sub>) von 10 synthetischen und partialsynthetischen Derivate, dargestellt in %, bezogen auf Alitretinoin Aktivität als 100% (zur Beschreibung der Säulenfarben s. Abbildung 46).

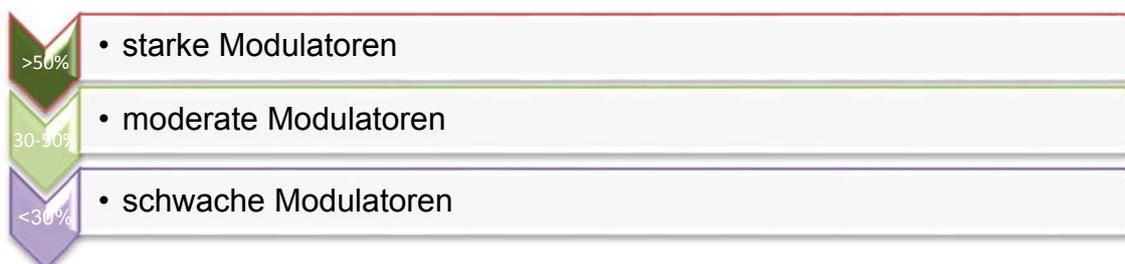
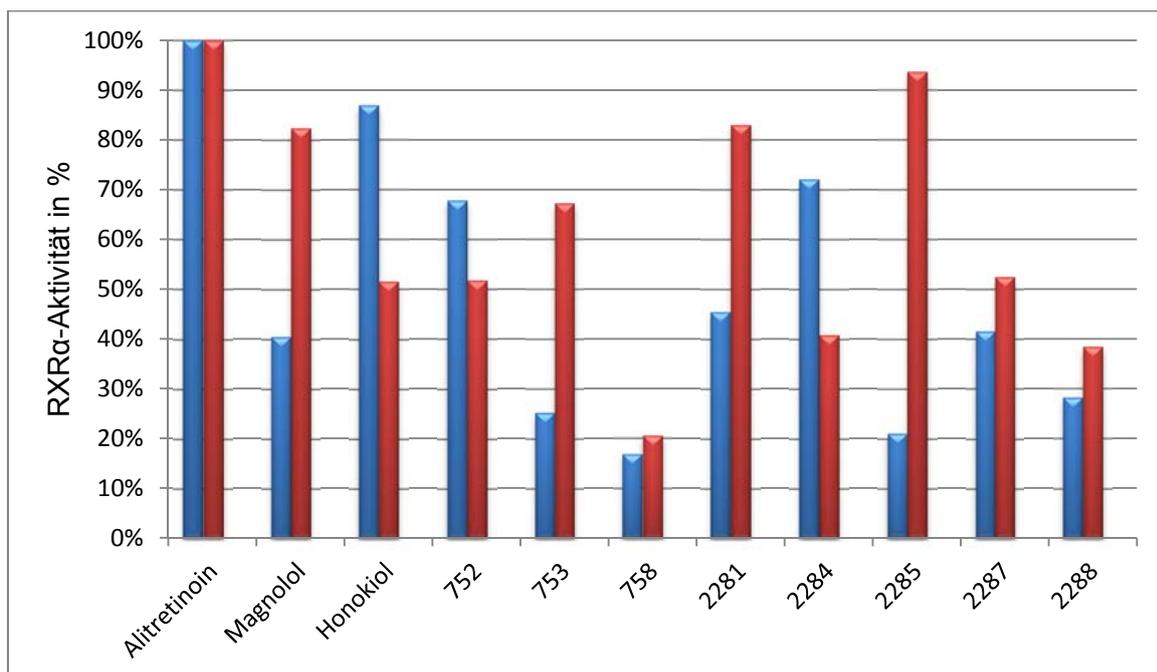


Abbildung 46. Kennzeichnung der Modulatoren. Dunkelgrün-starke-, hellgrün-moderate-, lila-schwache Modulatoren.

## 5 RXR $\alpha$ -AKTIVITÄT DER NEOLIGNANE IN ABHÄNGIGKEIT VON PPARE- UND RXRE-VERMITTELTEN TRANSAKTIVIERUNG

Im Kapitel 3 der Resultate sind die Aktivitäten der Neolignane in Abhängigkeit von PPARE- und RXRE-vermittelten Transaktivierung angeführt worden und durch ihre *fold activations* dargestellt. Hier, in **Abbildung 47** sind deren Aktivitäten in % dargestellt. Werte der Alitretinoin Aktivitäten, für jede der beiden Transfektionen (TM<sub>2</sub> und TM<sub>3</sub>) wurden gleich 100% gesetzt.



**Abbildung 47.** PPARE- und RXRE-vermittelte Transaktivierungsaktivitäten der Neolignane. **Blaue Säulen-Aktivität** der Derivate in % bei Transfektion mit TM<sub>2</sub> (RXR $\alpha$  + PPARE + EGFP). **Rote Säulen-Aktivität** der Derivate in %, bei der Transfektion mit TM<sub>3</sub> (RXR $\alpha$  + RXRE + EGFP).

In **Abbildung 47** zeigen blaue Säulen RXR $\alpha$ -modulierende Aktivitäten einzelner Neolignanderivate über PPARE. Zu Derivaten die eine stärkere PPARE-vermittelte Transaktivierungsaktivität zeigen, gehören Honokiol mit höchster Aktivität und die Substanzen 752 und 2284. Rote Säulen zeigen RXR $\alpha$ -modulierende Aktivitäten über RXRE. Im Vergleich zu den blauen Säulen ist es eindeutig dass die Mehrheit der hier angeführten Neolignanderivate eine RXRE-vermittelte Transaktivierung bevorzugt; Derivat 2285 als Leiter, sowie Magnolol, Derivate 753, 2281, 2287 und 2288. Der Derivat 758 zeigte geringe aber nahezu gleiche Transaktivierungsaktivität zu beiden Response Elementen.

Interessanterweise wurde in der Studie „Molekular Determinants of Magnolol Targeting Both RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ “ [107], Magnolol als dualer Agonist beschrieben, der keine RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität über RXRE bewirkt. Dieser Befund steht nicht in Einklang mit den

Ergebnissen dieser Arbeit, da Magnolol ein Ligand von RXR $\alpha$  ist, folgt die Bildung von RXR $\alpha$ -RXR $\alpha$ -Dimeren. Wie im Kapitel 3.2 der Einleitung beschrieben, bindet das RXR $\alpha$ -Homodimer an RXRE. Durchgeführte Experimente (s. Kapitel 2.6.2 der Resultate) zeigten eine RXR $\alpha$ -modulierende Aktivität über RXRE. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ist eindeutig zu sehen, dass Magnolol sogar eine stärkere RXRE-vermittelte Transaktivierungsaktivität zeigt.

## 6 AKTIVE NEOLIGNANE UND DEREN BEDEUTUNG

Von insgesamt 23 Derivaten wurden 14 als aktive Neolignanderivate identifiziert. Vier zeigten nur PPAR $\gamma$ -Modulation und zehn RXR $\alpha$ -Modulation wobei von diesen zehn, sechs duale Agonisten sind. Welchen von diesen Modulatoren der Vorzug bezüglich weiteren Charakterisierungsstudien zu geben ist, bleibt noch festzustellen. Interessant wäre auf jeden Fall zu klären welche pharmakologischen Eigenschaften diese Derivate in *in vitro* Experimenten zeigen. Weiter ist es zweifellos von Interesse in Folgestudien Selektivität bzw. Affinität zu anderen nukleären Rezeptoren zu klären.

In der wissenschaftlichen Literatur gibt es deutliche Hinweise darauf, dass Modulatoren von PPAR $\gamma$  und RXR $\alpha$ , vor allem als duale Agonisten, Hoffnungsträger neuer Wirkstoffe sind, die in näherer Zukunft ihre klinische Anwendung finden könnten. Bereits jetzt gibt es mehrere klinische Studien, die erfolgversprechende Ergebnisse bei Kombinationstherapien mit PPAR $\gamma$ - und RXR $\alpha$ -Agonisten gezeigt haben [5, 85, 94.98].

Ein Überblick aller 14 aktiven Neolignane je nach Art und Intensität ihrer Modulation ist in der **Tabelle 36** angeführt.

Neolignane	PPAR $\gamma$ -Modulation			RXR $\alpha$ -Modulation			PPARE-vermittelte Transaktivierung	RXRE-vermittelte Transaktivierung
	+++	++	+	+++	++	+		
Magnolol		X			X			X
Honokiol			X	X			X	
Dieugenol	X						X	
THDE	X						X	
752		X		X			X	
753	X					X		X
754		X					X	
758			X			X		X
759			X				X	
2281			X		X			X
2284				X			X	
2285						X		X
2287					X			X
2288						X		X

**Tabelle 36.** Überblick aller aktiven Neolignane als PPAR $\gamma$ -, RXR $\alpha$ - oder duale Agonisten. +++-starke-, ++-moderate-, +-schwache Modulation. THDE- Tetrahydrodieugenol. Ein X steht für zutreffende Eigenschaft.

---

# Referenzen

---

## G.Referenzen

1. **Ahn**, K. et al. (2006.), Honokiol potentiates apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through modulation of nuclear factor-kappaB activation pathway, *Mol Cancer Res*, **4**: 621-633
2. **Anghel**, S. et al. (2007), Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma, *Cell Res*, **17**: 468-511
3. **Bai**, X. et al.(2003.), Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo, *J Biol Chem*, **278**: 35501-35507
4. **Baños**, G. et al. (2008.), Medicinal agents in the metabolic syndrome, *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, **6**: 237-252
5. **Bonofiglio**, D. et al. (2009.), Combined low doses of PPARgamma and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells, *Am J Pathol*, **175**: 1270-1280
6. **Bourguet**, W., Germain, P. & Gronemeyer, H. (2000), Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications, *Trends Pharmacol Sci*. **21**: 381-388
7. **Chai**, D. et al.(2008.), RXR agonists inhibit high-glucose-induced oxidative stress by repressing PKC activity in human endothelial cells, *Free Radic Biol Med*, **44**: 1334-1347
8. **Chan**, L.S. & Wells, R.A. (2009), Cross- Talk between PPARs and the Partners of RXR: A Molecular Perspective, *PPAR Research*, **2009**: 925309
9. **Chandra**, V. et al. (2008.), Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA, *Nature*, **456**: 350-356
10. **Chang**, F. et al. (2007). Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Ann Pharmacother*. **41**: 973-983
11. **Chen**, Y. et al. (2009.), Antioxidative and hepatoprotective effects of magnolol on acetaminophen-induced liver damage in rats, *Arch Pharm Res*, **32**: 221-228
12. **Cho**, N. et al. (2008), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress, *Curr Top Med Chem*, **8**: 1483-1507

13. **Choi**, S. et al.(2009.), Magnolol enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells, *Life Sci*, **84**: 908-914
14. **Chuang**, D. et al. (2013.), Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells, *J Neuroinflammation*, **10**: 15
15. **Clark**, R. et al. (2000), The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses, *J Immunol*, **164**: 1364-1371
16. **Desvergne**, B. et al. (2006), Transcriptional regulation of metabolism, *Physiol Rev*, **86**: 465-514
17. **Fakhrudin**, N. et al. (2010.), Computer-aided discovery, validation, and mechanistic characterization of novel neolignan activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *Mol Pharmacol*, **77**: 561-566
18. **Fakhrudin**, N. (2011), Dissertation, Univ. Wien, Seiten: 55-91
19. **Formann**, B. et al. (1992), Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to DNA response elements as monomers, homodimers, or heterodimers, *Mol Endocrinol*, **6**: 429-442
20. **Forman**, B. et al. (1995), Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors, *Cell*, **81**: 541-550
21. **Gericke**, J. et al. (2013), Regulation of retinoid-mediated signaling involved in skin homeostasis by RAR and RXR agonists/antagonists in mouse skin, *PLoS One*, **8**: e62643
22. **Glass**, C. et al. (1997), Nuclear receptor coactivators, *Curr.Opin.Cell Biol.*, **9**: 222-232
23. **Gurnell**, M. et al. (2007), 'Striking the Right Balance' in Targeting PPARgamma in the Metabolic Syndrome: Novel Insights from Human Genetic Studies, *PPAR Res*, **2007**: 83593
24. **Hamann**, L. et al. (2000.), An efficient, stereospecific synthesis of the dimer-selective retinoid X receptor modulator (2E,4E,6Z)-7-[5,6,7,8- tetrahydro-5,5, 8,8-tetramethyl-2-(n-propyloxy)naphthalen-3-yl]-3-methyl octa-2,4, 6-trienoic acid, *J Org Chem*, **65**: 3233-3235

25. **Han**, S. et al. (2007.), Magnolol and honokiol: inhibitors against mouse passive cutaneous anaphylaxis reaction and scratching behaviors, *Biol Pharm Bull*, **30**: 2201-2203
26. **Heinlein**, C. et al. (1999.), Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *J Biol Chem*, **274**: 16147-16152
27. **Heinzl**, T. et al. (1997.), A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression, *Nature*, **387**: 43-48
28. **Heller**, E. et al. (2012), Molecular signatures of basal cell carcinoma susceptibility and pathogenesis: a genomic approach, *Int J Oncol*, **42**: 583-596
29. URL <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d44/44f.html>. Abrufdatum Juli 2013.
30. URL <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=610>. (März 2012). Abrufdatum Juni 2013
31. URL <http://www.nanodrop.com/ND1/NucleicAcid-Booklet.html>. Abrufdatum Juni 2013
32. URL [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/index.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/index.html). Abrufdatum Juni 2013
33. URL [http://nrresource.org/drawings/dna\\_binding\\_domain.html](http://nrresource.org/drawings/dna_binding_domain.html). Abrufdatum Juli 2013.
34. URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1by4>. Abrufdatum Juni 2013
35. URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1KYS>. Abrufdatum Juni 2013
36. URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2p1t>. Abrufdatum Juni 2013
37. URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3DZU>. Abrufdatum Juni 2013
38. URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3R5N>. Abrufdatum Juni 2013.
39. URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2QMV>. Abrufdatum Juni 2013
40. URL <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3R5M>. Abrufdatum Juni 2013
41. URL <http://www.uniprot.org/uniprot/P42212>. Abrufdatum Juni 2013

42. **Hu**, H. et al. (2005.), Honokiol inhibits arterial thrombosis through endothelial cell protection and stimulation of prostacyclin, *Acta Pharmacol Sin*, **26**: 1063-1068
43. **Ide**, T. et al. (2003), Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling, *Mol Endocrinol*, **17**: 1255-1267
44. **Ijpenberg**, A. et al. (1997.), Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element, *J Biol Chem*, **272**: 20108-20117
45. **Itoh**, T. et al. (2008.), Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids, *Nat Struct Mol Biol*, **15**:924
46. **Jiang**, C., Ting, A.T. & Seed, B. (1998), PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature*, **391**: 82-86
47. **Kabsch**, W. et al. (1983), Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers*, **22**: 2577-2637
48. **Kapelle**, M. et al. (2002), Isolation and characterization of the human orphan nuclear receptor Germ Cell Nuclear Factor (hGCNF), Seiten: 9-15
49. **Kim**, B.H. & Cho, J.Y. (2008.), Anti-inflammatory effect of honokiol is mediated by PI3K/Akt pathway suppression, *Acta Pharmacol Sin*, **29**: 113-122
50. **Kliwer**, S. et al. (1992), Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors, *Nature*, **358**: 771
51. **Kliwer**, S. et al. (1994), Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 7355-7359
52. **Knippers** R. (2006), Molekulare Genetik, Georg Thieme, Seite: 388-392
53. **Konopleva**, M. et al. (2004.), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias, *Mol Cancer Ther*, **3**: 1249-1262
54. **Kotani**, H. et al. (2010.), Identifikation of a Naturally Occurring Rexinoid, Honokiol, That Activates the Retinoid X Receptor, *J.Nat.Prod*, **73**: 1332

55. **Krentz**, A.J. & Bailey, C.J. (2005), Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus, *Drugs*, **65**: 385-411
56. **Larsen**, T. et al. (2003), PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy?, *Int J Obes Relat Metab Disord*, **27**:147-61
57. **Leblanc**, B.P. & Stunnenberg, H.G. (1995), 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement, *Genes Dev*, **9**: 1811-1816
58. **Lee**, J. et al. (2005.), Anti-inflammatory effects of magnolol and honokiol are mediated through inhibition of the downstream pathway of MEKK-1 in NF-kappaB activation signaling, *Planta Med*, **71**: 338-343
59. **Lefstin**, J. et al. (1998.), Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators, *Nature*, **392**: 885-888
60. **Leibowitz**, M. et al. (2006.), Biological characterization of a heterodimer-selective retinoid X receptor modulator: potential benefits for the treatment of type 2 diabetes, *Endocrinology*, **147**: 1044
61. **Leonardini**, A. et al. (2009), Cross-Talk between PPAR $\gamma$  and Insulin Signaling and Modulation of Insulin Sensitivity, *PPAR Research*, **2009**: 818945
62. **Lewin** B. (2004), *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall, Seite:1-939
63. **Liby**, K.T., Yore, M.M & Sporn, M.B. (2007.), Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer, *Nat Rev Cancer*, **7**: 357-369
64. **Liu**, J. et al. (2003), Activation and Binding of PPARgamma by Synthetic Cannabinoid Ajulemic Acid, *Mol. Pharmacol*, **63**: 988
65. **Liu**, J. et al. (2013), Curcumin Protects Neuron against Cerebral Ischemia-Induced Inflammation through Improving PPAR-Gamma Function, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2013**:470975
66. **Mader**, S. et al. (1993.), Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors, *J Biol Chem*, **268**: 591-600

67. **Mangelsdorf**, D.J. & Evans, R.M. (1995), The RXR heterodimers and orphan receptors, *Cell*, **83**: 841-850
68. **Mark**, M., Ghyselinck, N.B. & Chambon, P. (2006.), Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **46**: 451
69. **Maruyama**, Y. et al. (1998.), Identification of magnolol and honokiol as anxiolytic agents in extracts of saiboku-to, an oriental herbal medicine, *J Nat Prod*, **61**: 135-138
70. **Mazumdar**, A. et al. (2012.), The combination of tamoxifen and the rexinoid LG100268 prevents ER-positive and ER-negative mammary tumors in p53-null mammary gland mice, *Cancer Prev Res (Phila)*, **5**: 1195-1202
71. **Mohler**, M. et al. (2009.), Recent and emerging anti-diabetes targets, *Med Res Rev*, **29**: 125-195
72. **Moise**, A. et al. (2011), Pharmacology of Retinoid Receptors. *Tocris Reviews No. 36*, Seiten: 2-6
73. **Moss**, G. et al. (2000), Nomenclature of Lignans and Neolignans (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem*, **72**: 1493-1523
74. **Munroe**, M.E., Arbiser, J.L. & Bishop, G.A. (2007.), Honokiol, a natural plant product, inhibits inflammatory signals and alleviates inflammatory arthritis, *J Immunol*, **179**: 753-763
75. **Nagy**, L. et al. (1997), Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase, *Cell*, **89**: 373-380
76. **Ogata**, M. et al. (2000), Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **48**: 1467-1469
77. **Ogryzko**, V. et al. (1996), The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell*, **87**: 953-959
78. **Perlmann**, T. et al. (1993), Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs, *Genes Dev*, **7**: 1411-1422
79. **Perusicova**, J. et al. (2004), Rosiglitazon in treatment of Type II diabetes mellitus--experience of diabetologists in the Czech Republic. Part I: compensation of diabetes, sugar metabolism, *Vnitr Lek*, **50**: 818-824

80. **Pileri, A.** et al. (2013.), Role of bexarotene in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma: the clinical and immunological sides, *Immunotherapy*, **5**: 427-433
81. **Rastinejad, F.** et al. (1995), Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats, *Nature*, **375**: 203-211
82. **Rau, O.** et al. (2007), Screening pflanzlicher Extrakte auf Aktivierung des humanen Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors und seiner Subtypen, Seiten: 6-9
83. **Raucy, J.** et al. (2013), Cell-based systems to assess nuclear receptor activation and their use in drug development. *Drug Metab Rev*, **45**: 101-109
84. **Rizos, C.** et al.(2009), How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice? *Expert Opin Drug Saf*, **8**: 15-32
85. **Sánchez-Martínez, R.** et al. (2006), The retinoid X receptor ligand restores defective signalling by the vitamin D receptor, *EMBO Rep*, **7**: 1030-1034
86. **SanGiovanni, J.** et al. (2013.), DNA sequence variants in PPARGC1A, a gene encoding a coactivator of the  $\omega$ -3 LCPUFA sensing PPAR-RXR transcription complex, are associated with NV AMD and AMD-associated loci in genes of complement and VEGF signaling pathways, *PLoS One*, **8**: e53155
87. **Sarraf, P.** et al. (1998), Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma, *Nat Med*, **4**: 1046-1052
88. **Schuster, I.** et al. (2012), Nukleare Rezeptoren, Seite 6-7
89. **Semple, R.K., Chatterjee, VK & O'Rahilly, S.** (2006), PPAR gamma and human metabolic disease, *J Clin Invest*, **116**: 581-589
90. **Shan, P.** et al. (2008.), RXR agonists inhibit oxidative stress-induced apoptosis in H9c2 rat ventricular cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **375**: 628-633
91. **Shi, H.** et al. (2013), PPAR  $\gamma$  Regulates Genes Involved in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats, *PPAR Res*, **2013**: 310948
92. **Shilkaitis, A.** et al. (2013.), Bexarotene induces cellular senescence in MMTV-Neu mouse model of mammary carcinogenesis, *Cancer Prev Res (Phila)*, **6**: 299-308
93. **Shimomura, O.** et al. (2005), The discovery of aequorin and green fluorescent protein, *J Microsc*, **217**: 1-15

94. **Skelhorne-Gross**, G. et al. (2012.), Stromal adipocyte PPAR $\gamma$  protects against breast tumorigenesis, *Carcinogenesis*, **2012**: 12
95. **Sohn**, E. et al. (2007.), Effects of magnolol (5,5'-diallyl-2,2'-dihydroxybiphenyl) on diabetic nephropathy in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, *Life Sci*, **80**: 468-475
96. **Spencer**, T. et al. (1997), Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase, *Nature*, **389**: 194-198
97. **Suhara**, W. et al. (2009), Cow's milk increases the activities of human nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta and retinoid X receptor alpha involved in the regulation of energy homeostasis, obesity, and inflammation, *J Dairy Sci*, **92**: 4180-4187
98. **Tontonoz**, P. et al. (1997.), Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 237-241
99. **Tsai**, S. et al. (1999.), Antiarrhythmic effect of magnolol and honokiol during acute phase of coronary occlusion in anesthetized rats: influence of L-NAME and aspirin, *Pharmacology*, **59**: 227-233
100. **Umesono**, K. & Evans, R.M. (1989), Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors, *Cell*, **57**: 1139-1146
101. **Umesono**, K. et al. (1991), Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D<sub>3</sub> receptors, *Cell*, **65**: 1255-1266
102. **Wakelee**, H. et al. (2012.), The effect of bexarotene on atorvastatin pharmacokinetics: results from a phase I trial of bexarotene plus chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Cancer Chemother Pharmacol*, **69**: 563-571
103. **Wolf**, G. et al. (2006.), Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor?, *Nutr Rev*, **64**: 532-538
104. **Yessoufou**, A. & Wahli, W. (2010), Multifaced roles of PPARs at the cellular and whole organism levels, *Swiss Med Wkly*, **140**: w13071
105. **Zamir**, I., Zhang, J. & Lazar, M.A (1997), Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors, *Genes Dev*, **11**: 835-846

106. **Zechel**, C. et al. (1994), The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats, *EMBO J*, **13**: 1425-1433
107. **Zhang**, H. et al. (2011), Molecular Determinants of Magnolol Targeting Both RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , *PLoS ONE*, **6**: e28253
108. **Zhao**, Q. et al. (2000), Structural Basis of RXR- DNA Interactions, *J.Mol.Biol*, **296**: 509-514
109. **Zhao**, Y. (2008), Dissertation, Universität zu Köln, (Abstract)
110. **Zhu**, Y. et al. (2000), Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR, *J Biol Chem*, **275**: 13510-13516

---

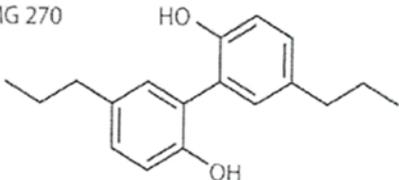
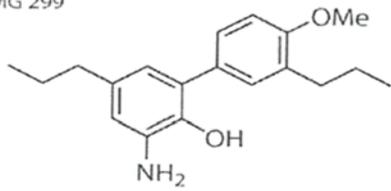
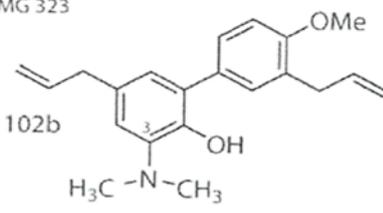
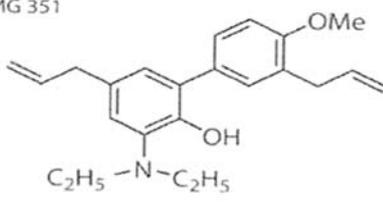
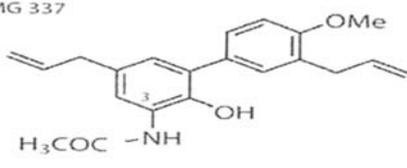
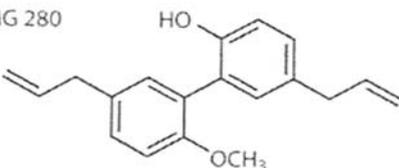
# Anhang

---

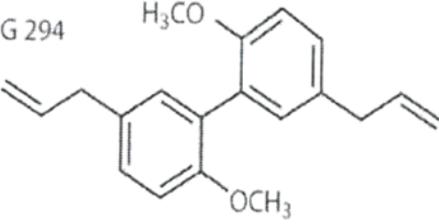
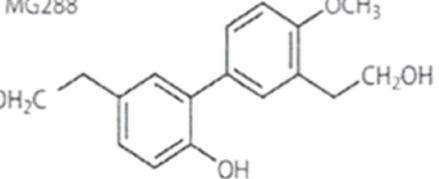
## H. ANHANG

## 1 SEMISYNTHETISCHE NEOLIGNANDERIVATE

DNTI	Chemische Strukturen und Molekulargewicht	IUPAC-Nomenklatur (Trivial-Bezeichnungen)
727	<p>MG 266</p>	5,5'-Di-(2-propenyl)-biphenyl-2,2'-diol (Magnolol)
728	<p>MG 266</p>	5,3'-Di-(2-propenyl)-biphenyl-2,4'-diol (Honokiol)
729		3,3'-Dimethoxy-5,5'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2,2'-diol (Dieugenol)
730		3,3'-Dimethoxy-5,5'-dipropyl-biphenyl-2,2'-diol (Tetrahydrodieugenol)
752	<p>MG 280</p>	4'-Methoxy-5,3'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2-ol

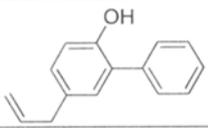
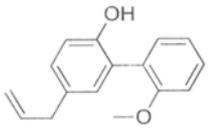
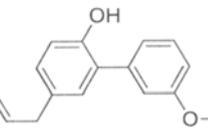
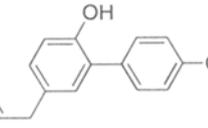
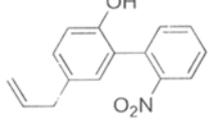
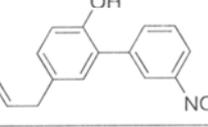
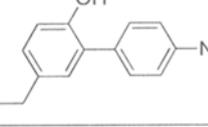
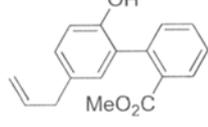
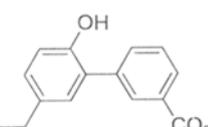
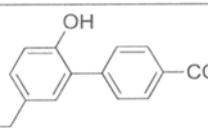
- 753 MG 270  5,5'-Dipropyl-biphenyl-2,2'-diol
- 754 MG 299  3-Amino-2'-methoxy-5,3'-dipropyl-biphenyl-2'-ol
- 755 MG 323  3-N,N-Dimethylamino-2'-methoxy-5,3'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2'-ol
- 756 MG 351  3-N,N-Diethylamino-2'-methoxy-5,3'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2'-ol
- 757 MG 337  3-N-Acetylamino-2'-methoxy-5,3'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2'-ol
- 758 MG 280  2-Methoxy-5,5'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2'-ol

---

759	<p>MG 294</p> 	2,2'-Dimethoxy-5,5'-di-(2-propenyl)-biphenyl
760	<p>MG288</p> 	4'-Methoxy-5,3'-bis-(2-hydroxyethyl)-biphenyl-2-ol

---

## 2 SYNTHETISCHE NEOLIGNANDERIVATE

DNTI	Chemische Struktur und Molekulargewicht	IUPAC- Nomenklatur
2279	 210.27 g.mol <sup>-1</sup>	5-allyl-[1,1'-biphenyl]-2-ol
2280	 240.89 g.mol <sup>-1</sup>	5-allyl-2'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-2-ol
2281	 240.89 g.mol <sup>-1</sup>	5-allyl-3'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-2-ol
2282	 240.89 g.mol <sup>-1</sup>	5-allyl-4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-2-ol
2283	 255.27 g.mol <sup>-1</sup>	5-allyl-2'-nitro-[1,1'-biphenyl]-2-ol
2284	 255.27 g.mol <sup>-1</sup>	5-allyl-3'-nitro-[1,1'-biphenyl]-2-ol
2285	 255.27 g.mol <sup>-1</sup>	5-allyl-4'-nitro-[1,1'-biphenyl]-2-ol
2286	 268.31 g.mol <sup>-1</sup>	methyl 5'-allyl-2'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylate
2287	 268.31 g.mol <sup>-1</sup>	methyl 5'-allyl-2'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylate
2288	 268.31 g.mol <sup>-1</sup>	methyl 5'-allyl-2'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylate

### 3 ABKÜRZUNGEN

#### A

A	Absorption
AA	Alitretinoin Aktivität
AB	Antibiotikum
ABCA1	ATP- binding cassette transporter A1
AF-1/2	Aktivierungsfunktion 1/2
Ali	Alitretinoin
AOX	Acyl-CoA Oxidase
ApoA1	Apolipoprotein A1
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat

#### B

bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise

#### C

ca.	ungefähr
CAR	Konstitutive androstane Rezeptoren
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A

#### D

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DBD	DNA Bindungsdomäne
DHA	Docosahexaensäure
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Adler Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	direct repeat
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol

#### E

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EtOH	Ethanol

#### F

FBS	Fetales Rinderserum
FXR	Farnesoid X Rezeptor

**G**

GCNF	<i>germ cell nuclear factor</i>
GI- Trakt	Gastrointestinal Trakt

**H**

HBS	HEPES- Puffersalz
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNF-4	Hepatozyten Kernfaktor-4
hRXR $\alpha$	humaner Retinoid X Rezeptor

**I**

IL-8	Interleukin 8
IUPAC	Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie

**K**

KbE	Koloniebildende Einheiten
kD	Kilodalton
Konz.	Konzentration

**L**

LBD	Ligand Bindungsdomäne
LBM	Lysogeny broth medium
LU	Lumineszenz
LXR	Leber X Rezeptor

**M**

min	Minute
mind.	mindestens
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Milliliter
$\mu$ M	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	Boten- Ribonukleinsäure
$\mu$ s	Mikrosekunde
ms	Millisekunde

**N**

N- CoA	nukleäre Coaktivatoren
ng	Nanogramm
NGFI-B	<i>Nerve Growth factor IB</i>
nm	Nanometer
NR	Nukleäre Rezeptoren
NSAID	Nichtsteroidale Entzündungshemmer

**O**

OD optische Dichte

**P**

p Wahrscheinlichkeit  
 PBP PPAR Binding Protein  
 PBS Phosphatgepufferte Salzlösung  
 PCG PPAR $\gamma$  Coaktivator  
 Pio Pioglitazon  
*PIPES* Piperazin-N,N-bis(2-hydroxyl-propansulfonsäure)  
 PPAR Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor  
 PPARE Peroxisom-Proliferator-*Response Element*  
 PXR Pregnan X Rezeptor

**R**

RAR *all-trans* Retinoidsäure Rezeptor  
 RAW264.7 Zellen Murine Makrophagen Leukämie Zell-Linie  
 RE Response Element  
 RFU Fluoreszenz  
 rpm Umdrehung pro Minute  
 RXR Retinoid X Rezeptor  
 RXRE Retinoidsäure X Response Element

**S**

s Sekunde  
 SF-1 *Steroidogenic factor 1*  
 SOC Super optimal catabolite repression  
 SRC1 Steroid Rezeptor Coaktivator 1

**T**

TBE Tris-Borat-EDTA Puffer  
 TBE Puffer TRIS-Borat-EDTA-Puffer  
 THDE Tetrahydrodieugenol  
 TM Transfektionsmischung  
 TR Thyroid Hormonrezeptor  
 TR2 Thyroid Rezeptor 2  
 TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
 TU Technische Universität  
 TZD Thiazolidindione

**V**

V Volt  
 VDR Vitamin D Rezeptor  
 Vol. Volumen

**Z**

z. B. zum Beispiel

**W**

WHO Weltgesundheitsorganisation

## 4 CURRICULUM VITAE

### Amina Cocic

---

#### Ausbildung

---

Okt. 2012–März 2013 März 2008–zurzeit	Medizinische Universität Wien, Österreich; Fakultät für Lebenswissenschaften; Studien- richtung: Pharmazie, Wien, Österreich
Okt. 2007–Jan. 2008	Pharmazeutische Fakultät in Sarajevo, Uni- versität Sarajevo, Bosnien und Herzegowi- na;
Sep. 2003–Jun. 2007	„Erstes Bosniakisches Gymnasium“ in Sara- jevo, Studienrichtung fokussiert auf Natur- wissenschaften; Chemie, Physik und Biolo- gie;
Sep. 1998–Jun. 2003	Volksschule „Siebte Volksschule“, G. Rahic, Brcko, Bosnien und Herzegowina;
Sep. 1995–Jun. 1998	Volksschule „Geistschule“, Hamm, Deutsch- land.

---

#### Publikation

---

Jan. 2013	Atanas G. Atanasov, Ph.D; Martina Blunder; Nanang Fakhrudin; Xin Liu; Stefan Noha; Clemens Malainer; Matthias Kramer; Amina Cocic*; Olaf Kunert; Andreas Schinkovitz; Elke Heiss; Daniela Schuster; Verena Dirsch; Rudolf Bauer (2013). <i>Polyacetylenes from Notopterygium incisum-New Selective Partial Agonists of peroxisome Proliferator- Activated Receptor-gamma. PLoS One</i> , ak- zeptiertes Manuskript im Druck.
-----------	--

---

## 5 DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. Verena M. Dirsch, die mir die Arbeit im Department für Pharmakognosie und damit die Ausführung dieser Diplomarbeit ermöglicht hat.

Weiters möchte ich meinen Dank an Hrn. Dr. Atanas Atanasov sowie DI Clemens Malainer richten. Beide haben mich sowohl während des praktischen, als auch während des schriftlichen Teils der Diplomarbeit mit vielen Ideen und Ratschlägen unterstützt. Besonderer Dank auch für deren großzügige Zeitinvestition während der Korrekturphase dieser Diplomarbeit.

Zudem möchte ich meinen Eltern Maida und Nijaz Cocic, sowie meinen Geschwistern Amna und Amin Cocic für deren Unterstützung während des gesamten Studiums danken.

Meinem Freund Ibrahim Covic danke ich vor allem für seine Hilfe bei meinem Vorankommen im Studium und dafür mich immer wieder motiviert zu haben nicht aufzugeben.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Freunden und bei meiner Familie bedanken, dafür, dass sie mich während meiner Studienzeit begleitet haben.