

Small molecule receptors involved in the metabolic syndrome

A thesis submitted to attain the degree of

Doctor of Sciences of ETH Zürich

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Bernd Thomas Wolfstädter

Diplom-Biologe, Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Germany)

born on 23.06.1985

citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Erick M. Carreira, examiner
Prof. Dr. Christian Wolfrum, co-examiner
Dr. Susanne Wolfrum, co-examiner

Summary

This thesis is concerned with small molecule receptors in the development of the metabolic syndrome. This thesis focuses on the most common small molecule receptor classes, the nuclear receptors and the G-protein coupled receptors (GPCRs).

Chapter 1 is concerned with the role of the nuclear receptor Retinoid-related Orphan Receptor γ (ROR γ) in mature brown adipocytes. ROR γ is known to be involved in adipogenesis in white adipose tissue, while its role in brown adipose tissue has not been investigated, yet.

Since ROR γ is known to be involved in the regulation of the circadian rhythm, we investigated its circadian expression in murine brown adipose tissue, both on the mRNA, as well as protein level. ROR γ expression was found to be subject to a circadian rhythm, with its expression being lower during the light phase.

ROR γ expression was found to increase during the differentiation of both primary and immortalized brown adipocytes. The role of ROR γ in differentiated immortalized brown cells was investigated using different viral approaches. To this end, different ROR γ constructs were generated, a construct overexpressing endogenous ROR γ , as well as a constitutively active (VP16) and inactive (dominant negative, Δ H12) ROR γ mutant. For *in vitro* studies, lentiviral vectors of these constructs were generated and used to overexpress ROR γ in infected differentiated immortalized brown adipocytes as well as in pre-adipocytes in order to generate a polyclonal stable cell line overexpressing the constructs. It was found that that ROR γ overexpression increases the expression of RevErb α , while it leads to a decrease in UCP-1 expression. This thesis therefore provides the first evidence of a regulation of UCP-1 by ROR γ in BAT.

In Chapter 2, the ligand binding of G-protein coupled receptor 55 (GPR55), a GPCR involved in obesity, was investigated using synthetic analogs of the endogenous ligand arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol (AGPI). The arachidonic acid chain of AGPI was modified by replacing the terminal double bond with either a *vicinal* tri-chloro or di-fluoro motif. These halogen modifications increase the molecule's flexibility compared to AGPI, while still allowing it to preserve the structure of a Z-double bond in the fatty acid chain. The ability of the analogs to activate GPR55 was measured in β -arrestin recruitment assays and compared to the endogenous ligand AGPI. Dose-dependent activation of GPR55 was found for the di-fluorinated analogs, which exhibited potencies comparable to AGPI. Our results show that di-fluoro motifs can be used to replace Z-double bonds without loss of biological activity.

In Chapter 3, the physiochemical properties of *t*-butyl-isosteres were evaluated in various assays. The *t*-butyl group is a frequently used substituent in drugs. Since the incorporation of a *t*-butyl group often introduces undesired characteristics to the molecule, surrogates for this group are highly sought after. Here, analogs of bosentan and vercirnon were synthesized, in which the *t*-butyl group was replaced by CF₃, SF₅, cyclopropyl-CF₃, and bicycle[1.1.1]pentane groups. The physiochemical properties of those analogs were investigated and compared amongst each other for both drugs. Many pharmacologically important parameters, such as solubility and permeability, were improved by the introduction of the isosteres. At the same time all synthesized compounds remained biologically active, demonstrating that these substituents are suitable replacements for a *t*-butyl group and should be considered in future drug discovery efforts.

In Chapter 4, the endogenous agonist of the δ -opioid receptor, Leu-Enkephalin, was modified using oxetanyl dipeptides as replacements for amide bonds in all possible positions. The resulting analogs showed increased metabolic stability in human serum and two analogs retained an affinity towards the receptor comparable to the parent molecule. This establishes the proof of concept, that oxetanes can be suitable substituents for amide bonds in biological settings, while at the same time endowing the molecule with improved pharmacokinetic parameters.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit so genannten "Small Molecules", ihren zellulären Rezeptoren und ihrer Rolle in der Entwicklung des Metabolischen Syndroms. Der Name „Small Molecules“ bezieht sich auf Moleküle die eine gewisse Molekülmasse nicht überschreiten. Die beiden prominentesten Rezeptoren-Klassen für diese Moleküle sind die Kern-Rezeptoren und die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs).

Kapitel 1 dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Kern-Rezeptors Retinoid-related Orphan Receptor γ (ROR γ) in braunen Adipozyten. Es ist bekannt, dass ROR γ in der Adipogenese im weißen Fett eine Rolle spielt, seine Rolle in braunem Fett, ist hingegen noch unzulänglich bekannt.

Es ist allerdings bekannt, dass ROR γ in der Regulation des zirkadianen Rhythmus allgemein eine Rolle spielt. Die zirkadiane Expression von ROR γ im braunen Fett wurde hier sowohl auf der Ebene der mRNA, als auch auf dem Protein-Level untersucht. Wir fanden, dass die Expression von ROR γ einem zirkadianen Rhythmus unterliegt, wobei die Expression während des Tages niedriger ist, als während der Nacht.

Die Expression von ROR γ wird im Laufe der Differenzierung von primären und immortalisierten braunen Adipozyten hochreguliert. Wir versuchten daher die Rolle von ROR γ mit Hilfe verschiedener viraler Vektoren zu untersuchen, dazu dienten uns ein Konstrukt zur Überexpression der endogenen Form von ROR γ , eine konstitutiv aktive (VP16) Mutante von ROR γ , sowie eine konstitutiv inaktive (dominant-negative, Δ H12) ROR γ Mutante. Von diesen Konstrukten wurden lentivirale Vektoren generiert, mit deren Hilfe immortalisierte Prä-Adipozyten infiziert wurden, um polyclonale stabile Zelllinien zu erzeugen. In diesen Zelllinien fanden wir, dass die Überexpression von ROR γ eine gesteigerte Expression von RevErb α , und eine verringerte Expression von UCP-1 zur Folge hatte. In dieser Arbeit, wurde zum ersten mal gezeigt, dass ROR γ eine Rolle in der Regulation der UCP-1-Expression und somit der Thermogenese des braunen Fettgewebes spielt.

In Kapitel 2 wurde die Bindung von Liganden an den G-protein gekoppelten Rezeptor 55 (GPR55) mit Hilfe von synthetischen Analoga des endogenen Liganden Arachidonoyl-sn-glyzerol-3-Phosphoinositol (AGPI) untersucht.

In der Arachidonsäuren-Seitenkette des Liganden wurde die terminale Doppelbindung mit einem vicinalen trichloro oder einen di-fluoro Motiv ausgetauscht. Die Halogen-Modifizierungen erhöhen die Flexibilität des Moleküls im Vergleich zu AGPI, erhalten aber dennoch die Konformation der Z-Doppelbindungsstruktur innerhalb der Fettsäurekette. Die Fähigkeit der Analogs GPR55 zu aktivieren wurde anhand von β -Arrestin Rekrutierungsassays gemessen und mit der des endogenen Liganden AGPI verglichen. Wir fanden eine Konzentrations-abhängige Aktivierung von GPR55 durch die di-fluoro Analoga, deren Potenz mit der von AGPI vergleichbar war. Diese

Ergebnisse zeigen, dass das di-fluoro Motiv eingesetzt werden kann um Z-Doppelbindungen in Molekülen ohne Verlust der biologischen Aktivität zu ersetzen.

In Kapitel 3, wurden die physiko-chemischen Eigenschaften von *t*-butyl-Isosteren mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht. Die *t*-butyl-Gruppe wird häufig als Substituent bei der Entwicklung von medizinisch relevanten Molekülen eingesetzt. Da der Einbau der *t*-butyl-Gruppe oft ungewünschte Effekte auf die Eigenschaften des Moleküls hat, sind Isostere von sehr großem Interesse. In dieser Studie, wurden Analoga von Bosentan und Vercirnon synthetisiert, in denen die *t*-butyl-Gruppe durch CF_3 , SF_5 , cyclopropyl- CF_3 , and bicyclo[1.1.1]pentane Gruppen ersetzt wurden. Die physiko-chemischen Eigenschaften der Analoga für beide Medikamente wurden untersucht und miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass viele pharmakologische Parameter, wie zum Beispiel Löslichkeit und Membranpermeabilität, durch den Einbau der Isostere merklich verbessert wurden. Gleichzeitig behielten alle synthetisierten Analoga ihre biologische Aktivität. Dies zeigt, dass diese Substituenten geeignete Isostere für die *t*-butyl Gruppe darstellen und in Zukunft bei der Entwicklung von Medikamenten berücksichtigt werden sollten.

In Kapitel 4 wurde der endogene Agonist des δ -Opioid Rezeptors, Leu-Enkephalin, mit Hilfe von Oxetanyl-Dipeptiden modifiziert. Diese Oxetane ersetzen Amid-Bindungen in allen möglichen Positionen des Moleküls. Die daraus resultierenden Analoga zeigten allesamt verbesserte metabolische Stabilität in humanen Serum, und zwei der Modifikationen behielten eine Affinität gegenüber dem δ -Opioid Rezeptors bei, die mit dem Ausgangsmolekül vergleichbar war. Dies zeigt beispielhaft, dass Oxetane geeignete Substituenten für Amid-Bindungen sein können, ohne dass durch die Modifikation die biologische Aktivität des Moleküls verloren geht. Gleichzeitig gestatten sie verbesserte pharmakokinetische Parameter.