

Aus dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

**Androgen-abhängige Regulation Adipogenese-assoziiierter Zielgene durch das  
microRNA-Cluster-130/301**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Carina Wenzel

geboren am 16.07.1990 in Suhl

Gutachter:     1. Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre  
                  2. Prof. Dr. med. Dirk Vordermark  
                  3. PD Dr. med. Adrian Pilatz (Gießen)

12.12.2017

16.08.2018

## Referat

Der Late-onset-Hypogonadismus ist ein Krankheitsbild des alternden Mannes, welches u.a. durch die Abnahme der Serum-Testosteronkonzentration und einer damit verbundenen Zunahme des viszeralen Fettgewebes gekennzeichnet ist. Die Mechanismen, die, durch die abnehmende Testosteronkonzentration getriggert, die adipogene Differenzierung steuern, sind längst nicht alle bekannt. MicroRNAs als posttranskriptionelle Genregulatoren sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Auch in der Adipogenese scheinen sie eine entscheidende Rolle zu spielen. In dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der durch einen Androgenmangel vermittelten Zunahme des Fettgewebes und der microRNA-Funktion in der Adipogenese untersucht werden. Das microRNA-Cluster-130/301 wurde bereits als relevanter Serum-Parameter bei Adipositas beschrieben. Durch quantitative Real-Time-PCRs wurde die Expression dieser microRNA während der adipogenen Differenzierung in humanen SGBS-Zellen untersucht. Unter Androgensubstitution zeigte sich eine Zunahme der microRNA-Expression während der Adipogenese. Androgene sind also an der Regulation dieser microRNA in den Fettzellen beteiligt. Auch die Expression der Zielgene der microRNA-130a, die im Vorfeld durch Luziferase-Assays identifiziert werden konnten, wurde mittels quantitativen Real-Time-PCRs und Western-Blot-Analysen während der adipogenen Differenzierung in SGBS-Zellen sowohl ohne Androgene als auch unter Androgensubstitution vermessen. Außerdem konnte mittels Mutagenese-Experimenten gezeigt werden, wie spezifisch microRNAs ihre Zielgene regulieren und dass bereits eine Punktmutation in der mRNA der Zielgene diese Regulation verhindert. Die Androgenrezeptor-Expression während der adipogenen Differenzierung in SGBS-Zellen zeigte sich sowohl in den quantitativen Real-Time-PCRs als auch in den Western-Blot-Analysen konstant. Unter Androgensubstitution stieg die Expression sogar an. Die Expression des Adiponektins stieg im Verlauf der Adipogenese an, zeigte jedoch unter Zugabe von Testosteron oder Dihydrotestosteron keine Veränderungen. Auch TNF- $\alpha$  und PPAR- $\gamma$  stiegen im Verlauf der Differenzierung an. Unter Testosteronzugabe zeigte sich die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  zwar verringert, doch Dihydrotestosteron zeigte keine Effekte. Die mRNA-Expression von PPAR- $\gamma$  zeigte ebenfalls keine Effekte unter Androgenzugabe, doch die Proteinexpression während der adipogenen Differenzierung nahm unter Testosteron- und Dihydrotestosteronzugabe ab. Diese widersprüchlichen Ergebnisse deuten auf einen weiteren Faktor hin, der diese Prozesse beeinflusst. Ein potentieller Kandidat dafür ist das microRNA-Cluster-130/301.

Wenzel, Carina: Androgen-abhängige Regulation Adipogenese-assoziiertes Zielgene durch das microRNA-Cluster-130/301

Halle (Saale), Martin-Luther-Univ., Med. Fak., Diss., 89 Seiten, 2017

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Late-onset-Hypogonadismus	1
1.2 Adipogenese	2
1.2.1 Adipositas	2
1.2.2 Molekularbiologische Grundlagen der Adipogenese	3
1.2.3 Regulation der Adipogenese	5
1.2.4 SGBS-Zellen	7
1.2.5 Funktion der untersuchten Gene in der Adipogenese	7
1.3 Androgene	11
1.3.1 Biologische Funktionen	13
1.3.2 Androgene in der Adipogenese	14
1.4 MicroRNAs	16
1.4.1 Biologische Funktionen	16
1.4.2 MicroRNAs in der Adipogenese	18
1.4.3 Androgen-responsive MicroRNAs	21
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>3. Material</b>	<b>23</b>
3.1 Zelllinien	23
3.2 Vektoren	23
3.3 Primer	23
3.4 Oligonukleotide	25
3.5 Antikörper	25
3.6 Kits	26
3.7 Chemikalien und Reagenzien	27
3.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
3.9 Puffer und Lösungen	30
3.9.1 Zellkultur	30
3.9.2 Proteinisolation	31
3.9.3 Agarosegel-Elektrophorese	32
3.9.4 Klonierung	32
3.9.5 Western-Blot	32

<b>4.</b>	<b>Methodik</b>	<b>32</b>
4.1	Erstellung der Luziferase-Vektoren	32
4.1.1	PCR	33
4.1.2	Agarose-Gelelektrophorese und cDNA-Aufreinigung	33
4.1.3	Ligation	34
4.1.4	Restriktionsverdau	34
4.1.5	Klonierung	35
4.1.6	Plasmidisolation und –messung	35
4.1.7	Sequenzierung	36
4.2	Mutagenese der Luziferase-Vektoren	36
4.3	Zellkultur	37
4.3.1	Kultivierung und Passagierung der Zellen	37
4.3.2	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	38
4.3.3	Einstreuen der SAOS-2-Zellen mit definierter Zellzahl	38
4.3.4	Differenzierung der SGBS-Zellen	39
4.4	Transfektionsversuche	39
4.4.1	Transfektion der Luziferase-Vektoren	40
4.4.2	Transfektion der microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotide	40
4.5	Luziferase-Assay	40
4.6	mRNA- und microRNA-Expressionsanalysen	41
4.6.1	RNA-Isolation und –messung	41
4.6.2	cDNA-Synthese zur mRNA-Expressionsanalyse	42
4.6.3	cDNA-Synthese zur microRNA-Expressionsanalyse	42
4.6.4	Quantitative real-time-PCR	43
4.7	Protein-Expressionsanalyse	44
4.7.1	Protein-Isolation und –messung	45
4.7.2	Western-Blot-Analyse	45
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
5.1	Androgen-abhängige microRNA-Expression	46
5.1.1	microRNA-Cluster-130/301-Expression unter Androgensubstitution	46
5.2	Identifikation Adipogenese-assoziiierter Zielgene des microRNA-Clusters-130/301	48
5.2.1	In silico Identifizierung von Targetgenen des microRNA-Clusters-130/301	48
5.2.2	Verifizierung der putativen Targetgene des microRNA-Clusters-130/301	49
5.3	Androgen-abhängige Expression der putativen Targetgene	55
5.3.1	Quantitative Real-Time-PCRs	55
5.3.2	Western-Blot-Analysen	58

<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
6.1	Androgen-abhängige Expression des microRNA-Clusters-130/301 während der adipogenen Differenzierung	60
6.2	Adipogenese-assoziierte Zielgene der microRNA-130a	63
6.3	Androgen-abhängige Expression der Zielgene während der adipogenen Differenzierung	67
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>72</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
	<b>Thesen</b>	<b>89</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>IX</b>
	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche</b>	<b>IX</b>
	<b>Curriculum vitae</b>	<b>X</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>XII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACC- $\alpha$	Acetyl-CoA-Carboxylase- $\alpha$
AdipoQ	Gensymbol für Adiponektin
AdipoR	Adiponektinrezeptor
ADM	adipogenes Differenzierungsmedium
Ago	Argonaute-Protein
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen-responsives Element
ARHGEF-12	Rho-guanine nucleotide exchange factor-12
ATCC	American Type Culture Collection
BAT	braunes Fettgewebe
bidest.	bidestilliert
BMI	Körpermasseindex
BMP-2	bone morphogenetic protein-2
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bZip	Basic leucine zipper-Transkriptionsfaktor
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CDC-42	cell division cycle-42
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	CCAAT-enhancer binding Protein
C. elegans	Caenorhabditis elegans
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
C <sub>T</sub>	threshold cycle
CtBP-2	C-terminal binding protein-2
DGAT-2	Diacylglycerol-Acetyltransferase-2
DGCR-8	DiGeorge critical region Gen-8
DHEA	Dihydroepiandosteron
DHT	Dihydrotestosteron

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT-3A	DNA-Methyltransferase-3A
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DVL-3	dishevelled segment polarity protein-3
EAU	European Association of Urology
ECL	enhanced Chemielumineszenz
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EPC	endotheliale Progenitorzelle
et al.	et altera
Exp-5	Exportin-5
FNDC-1	fibronectin type III domain containing-1
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
fw	forward
g	Gramm
GATA	GATA-binding Protein
g/l	Gramm pro Liter
GLUT	Glukose-Transporter
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
hADSC	human-adipose-tissue-derived stemcell
HCl	Salzsäure
HDL	Hig-Density-Lipoprotein Cholesterin
HeLa	Zervixkarzinom-Zelllinie
HepG-2	hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie
hMADS	human multipotent adipose-tissue-derived stemcell

hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
HMW	high-molecular-weight
IDF	International Diabetes Federation
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ISA	International Society of Andrology
ISSAM	International Society of Study of the Aging Male
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
kg/m <sup>2</sup>	Kilogramm pro Quadratmeter
Ko-miR	Kontroll-microRNA
KLF	Krüppel-like factor
l	Liter
LB	Luria Broth mikrobielles Wachstumsmedium
LDS	Lithium-Dodecyl-Sulfat
LH	Luteinisierendes Hormon
LMW	low-molecular-weight
LOH	Late-onset-Hypogonadismus
M	Molar
mA	Milliamper
MEF	muriner embryonaler Fibroblast
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mg/l	Milligramm pro Liter
min	Minute
miR	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP-11	Matrix-Metalloprotease-11
MMW	middle-molecular-weight



mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymale Stammzelle
Mt	mutiert
NaCl	Natriumchlorid
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol/l	Nanomol pro Liter
ng/ $\mu$ l	Nanogramm pro Mikroliter
ob	obese
OD	optische Dichte
p	Signifikanz
PBP	PPAR-binding Protein
PBS	phosphat-buffered solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PGC-1 $\alpha$	PPAR- $\gamma$ -Coactivator-1 $\alpha$
pg/ml	Picogramm pro Milliliter
pH	potentium hydrogenii
pmol/l	Picomol pro Liter
Pol-2	RNA-Polymerase-2
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RASD-1	ras related dexamethasone induced-1-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RISC	RNA-induced silencing complex
RUNX	runt related transcription factor
rv	reverse
SAOS-2	Osteosarkom-Zelllinie
sec	Sekunde

SGBS	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom
SHBG	sex-hormone-binding globulin
SIRT-1	Sirtuin-1
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SPRY-2	sprouty RTX signaling antagonist-2
SREBP-1	sterol regulatory element-binding protein-1
T	Testosteron
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TCF-712	transcription factor-7 like 2
TGF- $\beta$	transforming-growth factor $\beta$
TNF	tumor necrosis factor
TRAP	thyroid hormone receptor-associated protein
TU	transcription unit
TCF	t-cell specific transcription factor
T $\beta$ R-2	TGF- $\beta$ -Rezeptor-Kinase-2
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region
UV-Licht	ultraviolettes Licht
U/ $\mu$ l	Units pro Mikroliter
V	Reporterkonstrukt, Volt
WAT	weißes Fettgewebe
Wt	Wildtyp
$\mu$ g/ml	Mikrogramm/Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
%	Prozent
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

## 1. Einleitung

### 1.1 Late-onset-Hypogonadismus

Die International Society of Andrology (ISA), die International Society of Study of the Aging Male (ISSAM) und die European Association of Urology (EAU) definieren den Late-onset-Hypogonadismus (LOH) als ein klinisches und biochemisches Syndrom, das mit zunehmendem Alter und typischen klinischen Symptomen sowie einem Testosteronmangel verbunden ist und somit mit einer signifikanten Abnahme der Lebensqualität und negativen Auswirkungen auf multiple Organsysteme einhergehen kann (Nieschlag et al., 2005). Von einem Testosteronmangel spricht man ab einer totalen Testosteronkonzentration unter 12,1 nmol/l (3,52 ng/ml) und einer freien Testosteronkonzentration unter 243 pmol/l (70,7 pg/ml) im Serum (Bhasin et al., 2011). Die Abnahme der freien Testosteronkonzentration im Serum steigt mit zunehmendem Alter an, ein Rückgang von 0,4 % bis zu 2,0 % wurde berichtet (Wu et al., 2008). Die Prävalenz des LOH ist mit 2,1 % der Männer zwischen 40 und 79 Jahren, die klinische Symptome zeigen, deutlich niedriger als die Prävalenz abnehmender Testosteronspiegel bei alternden Männern. Dies verdeutlicht, dass nicht nur die Testosteronkonzentrationen entscheidend sind, sondern vielmehr die klinischen Symptome zur Diagnosestellung des Altershypogonadismus herangezogen werden sollten (Wu et al., 2010).

Der männliche Hypogonadismus beschreibt eine Störung der hypothalamisch-hypophysären-gonadalen Achse mit veränderter Hormonsekretion auf einer oder mehreren Ebenen dieses Regelkreislaufes. Es gibt sowohl primäre Formen, die mit einer Störung im Bereich des Hodens einhergehen, sowie sekundäre Formen, bei denen die Hormonsekretion in Hypothalamus oder Hypophyse gestört ist. Beim LOH handelt es sich um eine Mischform mit primärem und sekundärem testikulären Versagen und damit einhergehender Abnahme der Testosteronkonzentration im Serum (Nieschlag et al., 2005). Ursächlich für den abnehmenden Testosteronspiegel im Alter ist eine Abnahme des testikulären Volumens mit reduzierter Leydig-Zellzahl, eine Veränderung der pulsatilen Hormonausschüttung in Hypothalamus und Hypophyse mit einer Erhöhung der LH-Sekretion und einem Verlust des physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus der Testosteronsekretion (Neaves et al., 1984). Weiterhin führt eine altersassoziierte Erhöhung der Bindungskapazität des sex-hormone-binding globulin (SHBG) im Serum zu einer Abnahme der freien Testosteronkonzentration (Kaufman et al., 2005). Die Ursachen dafür sind jedoch weitestgehend unbekannt. Da der Altershypogonadismus erst bei Männern mit bereits vollständig entwickelten sekundären Geschlechtsmerkmalen und abgeschlossener Pubertät auftritt, stellt sich das klinische Bild sehr variabel dar und kann durch

physiologische phänotypische Variationen sowie durch im Alter erworbene chronische Erkrankungen verschleiert werden. Zu den typischen Symptomen zählen Libidoverlust, erektile Dysfunktion, Sarkopenie, Osteopenie und Osteoporose, Erschöpfung, Schlafstörungen, depressive Gedanken, Verlust der Körperbehaarung, Hitzewallungen und verminderte Fertilität (Nieschlag et al., 2005; Hall et al., 2008). Weitere Symptome des Androgenmangels bei alternden Männern sind die Zunahme des viszeralen Fettgewebes (Wang et al., 2008a), sowie die Zunahme der Insulinresistenz verschiedener Gewebe (Keating et al., 2006). Die genannten metabolischen Symptome wiederum begünstigen die Entstehung der zentralen Adipositas, des Diabetes mellitus Typ 2 sowie einer Hypertriglyzeridämie, arterieller Hypertonie und einem niedrigen HDL-Spiegel, welche Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse darstellen und nach der International Diabetes Federation (IDF) unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zusammengefasst werden (Zimmet et al., 2005). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass dieser Symptomkomplex durch die Abnahme der endogenen Androgenkonzentration getriggert werden kann (Muller et al., 2005; Kupelian et al., 2006). Der LOH ist somit maßgeblich an der Erhöhung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität der Männer im Alter beteiligt (Isomaa et al., 2001; Pye et al., 2014). Die Entstehung des metabolischen Syndroms und die damit einhergehenden vaskulären und endokrinen Störungen tragen wiederum durch eine Abnahme der Testosteronkonzentration zur Entstehung des Altershypogonadismus bei (Laaksonen et al., 2004). Mehrere Arbeiten zeigten, dass dieser Teufelskreis durch eine Testosteron-Substitutionstherapie durchbrochen werden kann (Allan et al., 2008), da Androgene die adipogene Differenzierung hemmen und somit zu einer signifikanten Abnahme des viszeralen Fettgewebes sowie der damit einhergehenden kardiovaskulären Risikofaktoren führen (Mårin et al., 1993; Behre et al., 2012). Durch die steigende Adipositas-Prävalenz in industrialisierten Nationen und in Entwicklungsländern stellen die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung des LOH mit der Zunahme des viszeralen Fettgewebes beitragen, einen zentralen Angriffspunkt in der Bekämpfung dieser gesundheitlichen und wirtschaftlichen Probleme dar.

## **1.2 Adipogenese**

### **1.2.1 Adipositas**

Adipositas ist nicht nur eines der Hauptsymptome des Late-onset-Hypogonadismus, sondern auch ein global wachsendes Gesundheitsproblem mit steigenden Morbiditäts- und Mortalitätsraten. Adipositas wird in drei Schweregrade unterteilt und ist definiert als ein Körpermasseindex (BMI) über  $30 \text{ kg/m}^2$ , während man ab  $25 \text{ kg/m}^2$  von Übergewicht (Präadipositas) spricht. Zwei Drittel der Männer (67 %) und die Hälfte der Frauen (53 %) in

Deutschland sind übergewichtig. 23 % der Männer und 24 % der Frauen sind mit einem BMI über 30 kg/m<sup>2</sup> sogar stark übergewichtig ([http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht\\_Adipositas/A\\_Adiposita\\_TAB.html](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht_Adipositas/A_Adiposita_TAB.html), aufgerufen am 02.02.2017). Weltweit ist die Anzahl der Männer mit einem BMI von 25 kg/m<sup>2</sup> oder mehr zwischen 1980 und 2013 von 28,9 % auf 36,4 % gestiegen, bei Frauen sogar von 29,8 % auf 38,0 %. Auch die Prävalenz übergewichtiger Kinder ist seit 1980 vor allem in den industrialisierten Nationen gestiegen. Im Jahr 2013 lag sie für Jungen bei 23,8 %, für gleichaltrige Mädchen bei 22,6 %. Doch auch in den Entwicklungsländern zeigt sich ein Anstieg der Adipositas-Prävalenz bei Kindern für die Jungen von 8,1 % im Jahr 1980 auf 12,9 % im Jahr 2013, für die Mädchen sogar von 8,4 % 1980 auf 13,4 % 2013 (Ng et al., 2014).

Im menschlichen Körper werden zwei Fettgewebs-Typen unterschieden. Während das univakuoläre weiße Fettgewebe (WAT) an zahlreichen Stellen des Körpers auftritt und als Energiespeicher dient, ist das plurivakuoläre braune Fettgewebe (BAT) bestimmten Körperregionen vorbehalten und dient der Thermogenese. Das WAT kann in viszerales Baufett und subkutanes Isolierfett unterschieden werden. Da die Lipolyserate sowie die Sekretion der Adipozytokine im viszeralen Fettgewebe deutlich höher sind als die im subkutanen Fettgewebe, stellt vor allem die Zunahme des viszeralen Fettgewebes einen gesundheitlichen Risikofaktor dar. Folgeerscheinungen wie Diabetes mellitus Typ 2, chronische Inflammation, Krebs und kardiovaskuläre Erkrankungen sind möglich (Wajchenberg et al., 2002).

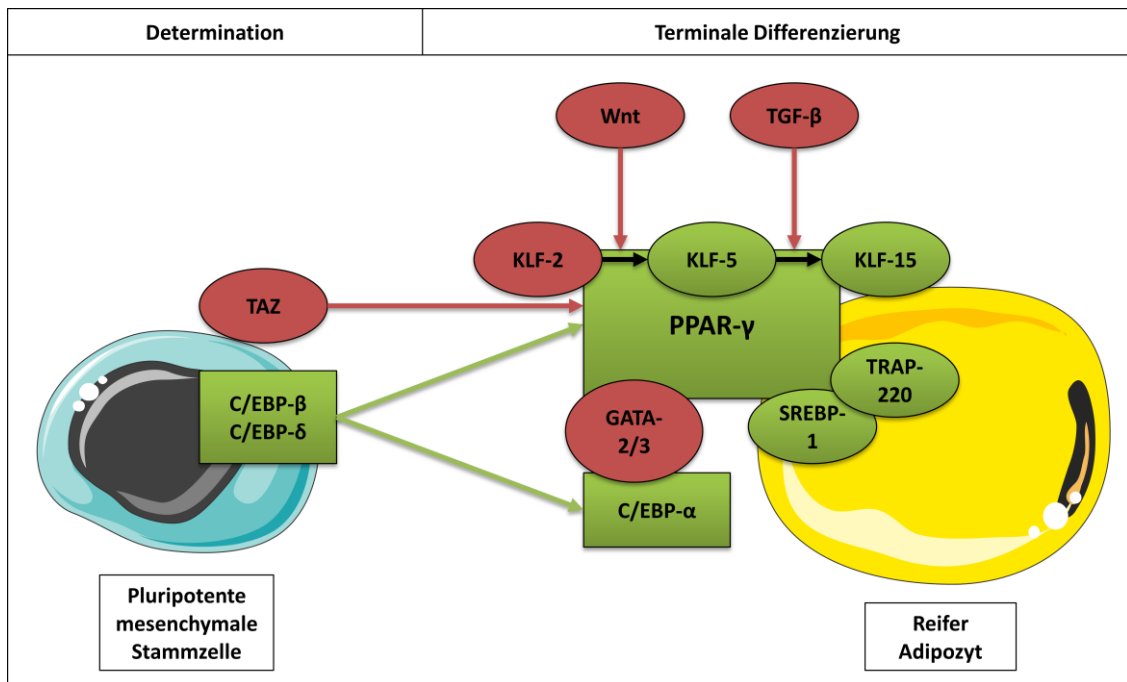
### **1.2.2 Molekularbiologische Grundlagen der Adipogenese**

Die Entwicklung der Adipositas auf Ebene des Fettgewebes erfolgt zum einen durch vermehrte Lipideinlagerungen in die reifen Adipozyten (Hypertrophie), aber auch durch eine abnorme Rekrutierung und Differenzierung von Stammzellen mit Erhöhung der Adipozytenzahl (Hyperplasie) (Avram et al., 2007). Adipozyten sind das Produkt der Adipogenese mesenchymaler Stammzellen (MSC), welche in zwei Phasen unterteilt wird. In der ersten Phase, der sogenannten Determination, entsteht aus einer pluripotenten MSC ein Fibroblast-ähnlicher Präadipozyt. Pluripotente MSCs sind zur Differenzierung in Muskel-, Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe befähigt. Der Präadipozyt gleicht morphologisch seiner Vorläuferzelle, hat allerdings die Fähigkeit der Differenzierung in verschiedene Zelltypen verloren. Über Regulationswege der Stammzellen, die bisher nur wenig erforscht sind, wird in dieser Phase der Adipogenese die adipogene Entwicklungslinie festgelegt, sodass Präadipozyten entstehen, die in der anschließenden terminalen Differenzierung ausreifen. Die entstandenen reifen Adipozyten weisen typische Eigenschaften einer Fettzelle auf (Rosen und MacDougald, 2006). Durch die Expression der Proteine, die für den Lipidtransport und -

metabolismus verantwortlich sind, ist der reife Adipozyt in der Lage Energiereserven in Form von Triglyzeriden zu speichern und Fettsäuren bei Nährstoffmangel freizugeben. Außerdem sezerniert das reife Fettgewebe als endokrin aktives Organ eine Vielzahl an Faktoren, die an der Regulation der Insulinsensitivität, des Appetits und Essverhaltens, immunologischer Prozesse und vielen anderen Stoffwechselfunktionen beteiligt sind (Ali et al., 2013). Zu diesen Faktoren zählen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6), Chemokine und Adipozytokine (Leptin, Adiponektin), die mit zunehmender Größe der Fettzellen verstärkt sezerniert werden (Skurk et al., 2007) und somit an der Entstehung des metabolischen Syndroms und dessen kardiovaskulären Folgeerkrankungen beteiligt sind (Lau et al., 2005).

Nach Festlegung der adipogenen Entwicklungslinie setzt in den MSCs eine zeitlich streng regulierte Expressionskaskade verschiedener Transkriptionsfaktoren und Adipozyten-spezifischer Gene ein. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) als der Masterregulator der Adipogenese spielt in der Entwicklung der Fettzellen eine entscheidende Rolle (Tontonoz et al., 1994b). Er gehört neben PPAR- $\alpha$  und PPAR- $\delta$  zur Gruppe der nukleären Rezeptoren, welche durch Ligandenbindung aktiviert werden, an ihre Ziel-DNA binden und somit weitere Transkriptionsfaktoren aktivieren, die Zellwachstum und -differenzierung, sowie die Homöostase regulieren (Mangelsdorf et al., 1995). Während PPAR- $\delta$  in der Adipogenese kaum eine Rolle spielt, wirkt PPAR- $\alpha$  in einem geringen Maß adipogen. PPAR- $\gamma$  hingegen wird ausschließlich von Adipozyten und ihren Vorläuferzellen exprimiert (Chawla et al., 1994). Durch alternatives Splicing der PPAR- $\gamma$ -mRNA und verschiedenen Promotoren gibt es außerdem zwei Protein-Isoformen, PPAR- $\gamma$ -1 und PPAR- $\gamma$ -2 (Zhu et al., 1995). Beide Isoformen können bei Expression ähnlicher, proadipogen-wirkender Genprodukte die Fettzellentwicklung in PPAR- $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Fibroblasten induzieren, jedoch zeigt PPAR- $\gamma$ -2 vermehrt Interaktionen mit Koaktivatoren, sodass eine quantitativ stärkere Adipogenese-Induktion möglich ist (Mueller et al., 2002). Daneben gibt es die CCAAT-enhancer binding protein Familie (C/EBPs), welche zu den basic leucine zipper (bZip)-Transkriptionsfaktoren gehört. C/EBP- $\beta$  und C/EBP- $\delta$  werden zu Beginn der Adipogenese induziert und sind wiederum entscheidend für eine effektive Co-Expression von C/EBP- $\alpha$  und PPAR- $\gamma$ . C/EBP- $\beta$ <sup>-/-</sup>- und C/EBP- $\delta$ <sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen Defekt in der Lipidakkumulation mit verminderten Fettdeposits bei jedoch normaler Expression von PPAR- $\gamma$  und C/EBP- $\alpha$  sowie weiteren adipogenen Markern. Dies zeigt, dass in vivo auch andere Wege der PPAR- $\gamma$ - und C/EBP- $\alpha$ -Aktivierung existieren, jedoch ist die Adipogenese in Abwesenheit von C/EBP- $\beta$  und C/EBP- $\delta$  weniger suffizient (Tanaka et al., 1997). C/EBP- $\alpha$ -Knockout-Mäuse weisen zwar reife Fettzellen auf, jedoch sind die Lipidakkumulation sowie die gesamte Energiehomöostase gestört, sodass sie nicht lebensfähig sind (Wang et al., 1995). Für die

Entwicklung des Phänotyps eines reifen Adipozyten ist somit ein Genprofil nötig, welches nur durch die synergistisch wirksamen Transkriptionsfaktoren PPAR- $\gamma$  und C/EBP- $\alpha$  exprimiert werden kann (Rosen et al., 2002).



**Abbildung 1:** Adipogene Differenzierung einer pluripotenten mesenchymalen Stammzelle zum reifen Adipozyten. Während der Determination wird die Entwicklung in die adipogene Linie festgelegt. Durch die Expression von C/EBP- $\beta$  und C/EBP- $\delta$  wird die Co-Expression von PPAR- $\gamma$  und C/EBP- $\alpha$  eingeleitet. PPAR- $\gamma$  ist der Masterregulator der Adipogenese. Deshalb wird die Expression von PPAR- $\gamma$  neben einer Kaskade von Transkriptionsfaktoren (KLF-2, KLF-5, KLF-15, GATA-2/3) auch durch weitere transkriptionelle Kofaktoren (TAZ, TRAP-220, SREBP-1) und extrazelluläre Signalwege (Wnt, TGF- $\beta$ ) gesteuert und somit die Adipogenese reguliert. PPAR- $\gamma$  induziert in der terminalen Differenzierung gemeinsam mit C/EBP- $\alpha$  die Expression Adipozyten-spezifischer Gene, wodurch ein reifer Adipozyt entsteht, der die typischen Eigenschaften einer Fettzelle aufweist (modifiziert nach Rosen und MacDougald, 2006).

### 1.2.3 Regulation der Adipogenese

Bisher ist die Regulation der Adipogenese nur unvollständig erforscht. Außerdem ist die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Faktoren äußerst komplex und in vitro-Erkenntnisse unterscheiden sich zum Teil deutlich von der in vivo-Situation, deshalb sollen hier nur einige wichtige Regulationsmechanismen genannt werden. Die meisten pro- oder antiadipogenen Faktoren wirken über eine Veränderung der PPAR- $\gamma$ - oder der C/EBP- $\alpha$ -Expression, welche für die Adipogenese essentiell sind. Neben den beiden Regulator-Familien der PPARs und C/EBPs gibt es eine dritte Gruppe, welche die Adipogenese entscheidend reguliert. Die Krüppel-like factors (KLFs) gehören zur Familie der C2H2 zinc-finger proteins, welche die Apoptose, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen regulieren (Brey et al., 2009). Auch sie wirken in Form einer Kaskade, bei der KLF-2 zunächst den PPAR- $\gamma$ -Promotor hemmt (Banerjee et al., 2002). Zu Beginn der Differenzierung wird KLF-2 über eine Bindung von C/EBP- $\beta$  und C/EBP- $\delta$

an den KLF-5-Promotor durch KLF-5 ersetzt, welches die PPAR- $\gamma$ -Expression gemeinsam mit den C/EBPs aktiviert (Oishi et al., 2005). Anschließend erfolgt die Expression von KLF-15, welche die PPAR- $\gamma$ -Expression konstant hält und somit für die Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes mitverantwortlich ist (Mori et al., 2005). Weitere proadipogene Transkriptionsfaktoren sind die sterol regulatory element-binding proteins (SREBP-1), bei welchen es sich um basic helix loop helix-Transkriptionsfaktoren handelt, die neben einer PPAR- $\gamma$ -Induktion die Lipidbiosynthese und die Lipidhomöostase in den Adipozyten regulieren (Kim und Spiegelman, 1996). Antiadipogen wirksam sind GATA-2 und GATA-3, Mitglieder der GATA-binding and forkhead-Familie, die vor allem über Protein-Protein-Interaktionen die Adipogenese hemmen. GATA-2 kann neben einer PPAR- $\gamma$ -Hemmung auch an C/EBPs binden und somit deren PPAR- $\gamma$ -Aktivierung verhindern (Tong et al., 2005). Transkriptionelle Kofaktoren, die über eine Interaktion mit PPAR- $\gamma$  wirken, scheinen vor allem in der frühen Phase der adipogenen Differenzierung eine entscheidende Rolle zu spielen. Der Kofaktor TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) hemmt die PPAR- $\gamma$ -Aktivität und fördert die RUNX-2-Aktivität nicht nur in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs), sondern auch in Zellkulturversuchen mit MSCs, sodass die Stammzellen nicht adipogen, sondern osteogen differenzieren (Hong et al., 2005). TRAP-220, auch PPAR-binding protein (PBP) genannt, ist eine Untereinheit des thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) und wirkt über diesen Komplex als ein PPAR- $\gamma$ -2-selektiver Koaktivator der Adipogenese (Ge et al., 2002). Eine weitere Regulationsmöglichkeit der adipogenen Differenzierung besteht über extrazelluläre Signalwege. Ein wichtiger Signalweg ist unter anderem der Wnt-Signalweg. Das Wnt-10b-Protein, ein Glykoprotein mit parakrinen und autokrinen Wirkmechanismen, kann über die Bindung an frizzled-Rezeptoren  $\beta$ -Catenin-abhängig oder  $\beta$ -Catenin-unabhängig die Expression von PPAR- $\gamma$  oder C/EBP- $\alpha$  in vitro blockieren und somit die Adipogenese hemmen (Ross et al., 2000). Auch in vivo ist Wnt-10b ein wichtiger Regulator der Adipogenese, denn eine Mutation im dazugehörigen Gen führt schon in jungen Jahren zu Übergewicht und Adipositas (Christodoulides et al., 2006). Der transforming-growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Signalweg, der über die Bindung an Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren SMADs aktiviert, hemmt die Adipogenese in vitro. SMAD-3 hemmt die Aktivität der C/EBPs und verhindert somit die Expression von PPAR- $\gamma$  (Choy et al., 2003). Weitere zelluläre Signalwege als Regulatoren der adipogenen Differenzierung sind bisher nur wenig erforscht. Wahrscheinlich haben die meisten zellulären Signalwege jedoch auch pro- oder/und antiadipogene Effekte.



#### **1.2.4 SGBS-Zellen**

Die meisten Studien zu den molekularbiologischen Untersuchungen der Adipogenese werden an murinen Zellkulturmodellen durchgeführt. SGBS-Zellen dagegen sind humane Fett-Vorläuferzellen, die aus dem subkutanen Fettgewebe von einem männlichen Neugeborenen mit dem Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom gewonnen wurden. Dieses X-chromosomal-rezessiv vererbte Syndrom geht mit peri- und postnatalem Großwuchs, Organomegalie, Herzfehlern, Makrozephalie, Gesichtsdysmorphien und einem erhöhten Krebsrisiko einher (Simpson et al., 1975; Behmel et al., 1984; Golabi et al., 1984). Bisher wurde eine Mutation im Glypican-3-Gen als eine Ursache des überschießenden Wachstums aller Organe und Gewebe beschrieben, die jedoch nicht bei allen Erkrankten nachweisbar ist (Lindsay et al., 1997). Diese nicht immortalisierte Zelllinie weist eine hohe Kapazität zur adipogenen Differenzierung auf, erst nach etwa 70 Generationen verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferation und sterben ab. Trotz dieser Eigenschaft sind sie morphologisch, biochemisch und funktionell identisch zu den in-vitro differenzierten Adipozyten gesunder Probanden. Die SGBS-Präadipozyten zeigen sich ähnlich der Kontroll-Adipozyten gesunder Probanden zunächst Fibroblasten-ähnlich und nach Differenzierung rundlich, mit zytoplasmatisch gelegenen Lipiddroplets und an den Rand gedrängten Zellkernen. Auch die Genexpression während der Differenzierung entspricht der der in-vitro differenzierten humanen Präadipozyten gesunder Individuen und ist für die Funktion der reifen Adipozyten essentiell. All diese Eigenschaften verdeutlichen die Ähnlichkeit dieser Zellen zu humanen Präadipozyten und rechtfertigen sie als Modellsystem zur Untersuchung der humanen Adipogenese (Wabitsch et al., 2001).

#### **1.2.5 Funktion der untersuchten Gene in der Adipogenese**

Eines der gesundheitlich relevantesten Symptome des Late-onset-Hypogonadismus ist die Zunahme des viszeralen Fettgewebes aufgrund der abnehmenden Testosteron-Serumspiegel im Alter. Wie im Abschnitt 1.1 beschrieben, hat eine Testosteron-Substitutionstherapie positive Effekte auf die Abnahme der Fettgewebssmasse. Androgene vermitteln ihre Wirkung dabei vor allem über eine Bindung an den intrazellulär gelegenen Androgenrezeptor (AR). Das AR-Gen liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms und kodiert für ein Protein, bestehend aus einer N-terminalen Domäne, einer DNA-Bindungsdomäne und einer Androgen-Bindungsdomäne. Durch alternatives Splicing entstehen multiple Transkript-Varianten, die für verschiedene Protein-Isoformen kodieren (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/367>, aufgerufen am 03.02.2017). Das Protein gehört in die Familie der nukleären Rezeptoren, welche nach Bindung ihres zytosolischen Liganden eine Konformationsänderung durchlaufen, dimerisieren und in den Zellkern transportiert werden. Im Zellkern bindet der dimerisierte

Androgen-Rezeptorkomplex spezifische Sequenzen der DNA und induziert die RNA-Synthese Androgen-responsiver Gene (Nieschlag E, Behre HM: Testosterone, Action, Deficiency, Substitution, 4. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, 2012; pp. 24-25). Das Gen besitzt zwei Trinukleotid-Repeat Segmente, welche in der N-terminalen Domäne des Proteins für polymorphe Polyglutamine und Polyglycine kodieren (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/367>, aufgerufen am 03.02.2017). Das CAG-Triplet ist dabei relevant für die Entstehung verschiedener metabolischer Erkrankungen. Je höher die Zahl der CAG-Triplets ist, desto größer sind BMI, Hüftumfang und Leptinsekretion des betroffenen Patienten. Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen einer höheren CAG-Triplet-Anzahl und der Entstehung von Adipositas und arterieller Hypertonie (Stanworth et al., 2008). Der molekulare Mechanismus dabei beruht vor allem auf einer verminderten Rezeptor-Aktivität des AR (Beilin et al., 2000). Neben diesen Studien, die einen mutierten Androgenrezeptor als eine Ursache der Adipositas-Entstehung bei Männern sehen, gibt es weitere Arbeiten, die die Funktion des AR in vitro untersucht haben. In murinen 3T3-L1-Adipozyten stellt die im Verlauf der adipogenen Differenzierung ansteigende AR-Expression entscheidende Weichen für die Androgen-vermittelte Hemmung der Expression von PPAR- $\gamma$  und C/EBP- $\alpha$  und weiterer Adipozyten-spezifischer Gene. Ein AR-Expressionsanstieg auf Ebene der murinen Präadipozyten zeigt eine erhöhte Expression osteogener Transkriptionsfaktoren (Hartig et al., 2013), während ein Expressionsanstieg auf Ebene der murinen pluripotenten Stammzellen eher zu einer myogenen Differenzierung führt (Singh et al., 2003). Ein Verlust des Androgenrezeptors führt in murinen Stromazellen des Knochenmarks zu einer Hemmung der Osteogenese zugunsten der Adipogenese (Huang et al., 2013). Somit spielt die zeitlich regulierte und gewebespezifische Expression des AR eine entscheidende Rolle in der durch Androgene induzierten Entwicklung der Körperkompositionen.

AdipoQ liegt auf Chromosom drei und kodiert für das 30 kDa große Protein Adiponektin, ein Adipozytokin mit antiinflammatorischen, antidiabetogenen und antiatherogenen Eigenschaften. Adiponektin wird fast ausschließlich vom Fettgewebe sezerniert und kann im Plasma durch Proteolyse als high-molecular-weight-Multimer (HMW), als middle-molecular-weight-Hexamer (MMW) oder als low-molecular-weight-Trimer (LMW) vorliegen (Pajvani et al., 2003). Die HMW-Form stellt die metabolisch aktivste Form dar (Lara-Castro et al., 2006). Bisher sind zwei transmembranäre Rezeptoren für Adiponektin bekannt: AdipoR-1, welcher vor allem von der Skelettmuskulatur exprimiert wird, und AdipoR-2, der vor allem in der Leber zu finden ist (Lee et al., 2008). Die Adiponektin-Expression während der Adipogenese setzt erst im Stadium des reifen Adipozyten ein und steigt im Verlauf stark an (Körner et al., 2005). Mit

zunehmender Fettgewebssmasse zeigt sich eine Abnahme der Expression (Kern et al., 2003). Abnehmende Adiponektin-Plasmaspiegel sind an der Entstehung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 (Spranger et al., 2003), der koronaren Herzerkrankung (Laughlin et al., 2007) sowie der arteriellen Hypertonie (Iwashima et al., 2004) beteiligt. Im Gegensatz dazu zeigen erhöhte Adiponektin-Plasmaspiegel positive metabolische Effekte mit einer Abnahme des BMI, der Fettgewebssmasse insgesamt und einer geringeren Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 2 sowie weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen (Weyer et al., 2001). In-vivo Studien belegen, dass Adiponektin-Knockout-Mäuse zu erhöhter Insulinresistenz, damit einhergehender Glukose-Intoleranz und Hyperglykämie sowie arterieller Hypertonie neigen (Maeda et al., 2002). Die Überexpression von Adiponektin führt zwar über eine gesteigerte Expression von C/EBP- $\alpha$  und PPAR- $\gamma$  sowohl in-vitro als auch in vivo zu einer Zunahme der Fettgewebssmasse (Fu et al., 2005), jedoch zeigt sich auch eine verbesserte Insulinsensitivität sowie eine Abnahme der Serum-Triglyzeride (Kim et al., 2007). Die Überexpression dieses Adipozytokins wird deshalb als prognostisch günstiger Faktor gehandelt, der die metabolische Flexibilität des Fettgewebes erhöht (Asterholm und Scherer, 2010).

Das bekannteste Adipozytokin Leptin ist das Produkt des *ob*-Gens, welches auf Chromosom sieben lokalisiert ist und erstmals in adipösen *ob/ob*-Mäusen entdeckt wurde. Das 16 kDa große Proteohormon wird vor allem vom Fettgewebe sezerniert und reguliert im zentralen Nervensystem die Nahrungsaufnahme und die Energiehomöostase (Zhang et al., 1994). Die Leptin-Expression setzt ähnlich der Adiponektin-Expression erst im Stadium der reifen Adipozyten ein (Körner et al., 2005) und steigt dann proportional mit zunehmender Fettgewebssmasse an, während schlanke Individuen eher niedrige Serumleptin-Spiegel aufweisen (Mendoza-Núñez et al., 2002). Leptin entfaltet seine Effekte über die Bindung an den Ob-Rezeptor, der vor allem im Hypothalamus, aber auch an verschiedenen peripheren Geweben wie Fettgewebe, Skelettmuskulatur und einigen Immunzellen nachgewiesen werden konnte. Neben einer Hemmung der Nahrungsaufnahme bei zunehmender Fettgewebssmasse, reguliert Leptin die Energiehomöostase und ist durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine an der Entstehung des entzündlichen Milieus im Fettgewebe beteiligt (Friedman, 2014). In murinen Adipozyten führt Leptin über eine Apoptose-Induktion sowie über eine Abnahme der Expression verschiedener C/EBPs und Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu einer Hemmung der adipogenen Differenzierung (Della-Fera et al., 2001). Ein angeborener Leptinmangel ist sowohl bei Mäusen, als auch beim Menschen mit schwerer Adipositas, Glukose-Intoleranz und Insulinresistenz assoziiert (Farooqi et al., 1999). Durch eine Leptin-Substitutionstherapie ist eine signifikante Gewichtsabnahme möglich und die genannten

Symptome können revertiert werden (Licino et al., 2004). Aufgrund einer Leptinresistenz ist eine Adipositas-Behandlung übergewichtiger Menschen ohne Leptinmangel mit exogenem Leptin jedoch nicht erfolgreich (Sáinz et al., 2015). Somit zeigt Leptin zwar hemmende Effekte auf eine Zunahme der Fettgewebsmasse, jedoch sind weitere, bisher kaum erforschte Faktoren an diesem Kreislauf beteiligt, die diese positiven Effekte abschwächen.

Das Gen für PPAR- $\gamma$ , der Masterregulator der Adipogenese, liegt auf Chromosom drei und kodiert für einen nukleären Rezeptor, der die Expression verschiedener Gene steuert. Während der Adipogenese dient er nicht nur der Induktion der adipogenen Differenzierung, sondern auch der Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes (Tamori et al., 2002). Deshalb wird PPAR- $\gamma$  bereits frühzeitig in der Adipogenese induziert (Tontonoz et al., 1994a) und in den Präadipozyten, sowie den reifen Adipozyten konstant auf hohem Niveau exprimiert (Chawla und Lazar, 1994). Wie entscheidend die Rolle von PPAR- $\gamma$  für die adipogene Differenzierung ist, zeigt die Arbeit von Rosen und Kollegen. Sie fanden heraus, dass C/EBP- $\alpha$  die Adipogenese in murinen PPAR- $\gamma^{-/-}$ -Fibroblasten zwar induzieren kann, jedoch weder eine Lipidakkumulation noch eine Expression Adipozyten-spezifischer Gene möglich ist. Erst nach lentiviral-induzierter PPAR- $\gamma$ -Expression ist eine suffiziente adipogene Differenzierung möglich (Rosen et al., 2002). PPAR- $\gamma$  ist also nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* für die Adipogenese essentiell (Rosen et al., 1999). Als zentraler Faktor in der Fettzellentwicklung ist es auch meist die PPAR- $\gamma$ -Expression, die durch verschiedenste antiadipogene oder proadipogene Faktoren reguliert wird (Banerjee et al., 2002; Ge et al., 2002; Hong et al., 2005; Oishi et al., 2005; Tong et al., 2005).

Das Gen des tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) liegt auf Chromosom sechs und kodiert für ein multifunktionales, proinflammatorisches Zytokin, welches zur tumor necrosis factor-Superfamilie (TNF) gehört. Es ist in eine Vielzahl an biologischer Prozesse beispielsweise Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose und Lipidmetabolismus involviert und wird vor allem von Makrophagen, aber in geringen Mengen auch vom Fettgewebe sezerniert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>, aufgerufen am 06.02.2017). Das Zytokin wird als 26 kDa große, membrangebundene Vorstufe synthetisiert und durch eine Matrix-Metalloprotease in seine lösliche, 17 kDa große Form umgewandelt (Black et al., 1997). Beide sind metabolisch aktiv und entfalten ihre Effekte durch die Bindung an den TNF-Rezeptor 1 und 2, welche vom Fettgewebe exprimiert werden (Hotamisligil et al., 1997). Der TNF-Rezeptor 1 wird vor allem mit der Apoptose und einer erhöhten Lipolyse in Verbindung gebracht, während der TNF-Rezeptor 2 eher an der Entwicklung der Insulinresistenz beteiligt ist (Hube et al., 1999). Die TNF- $\alpha$ -Expression zeigt sich im Fettgewebe eher niedrig (Montague et al., 1998),

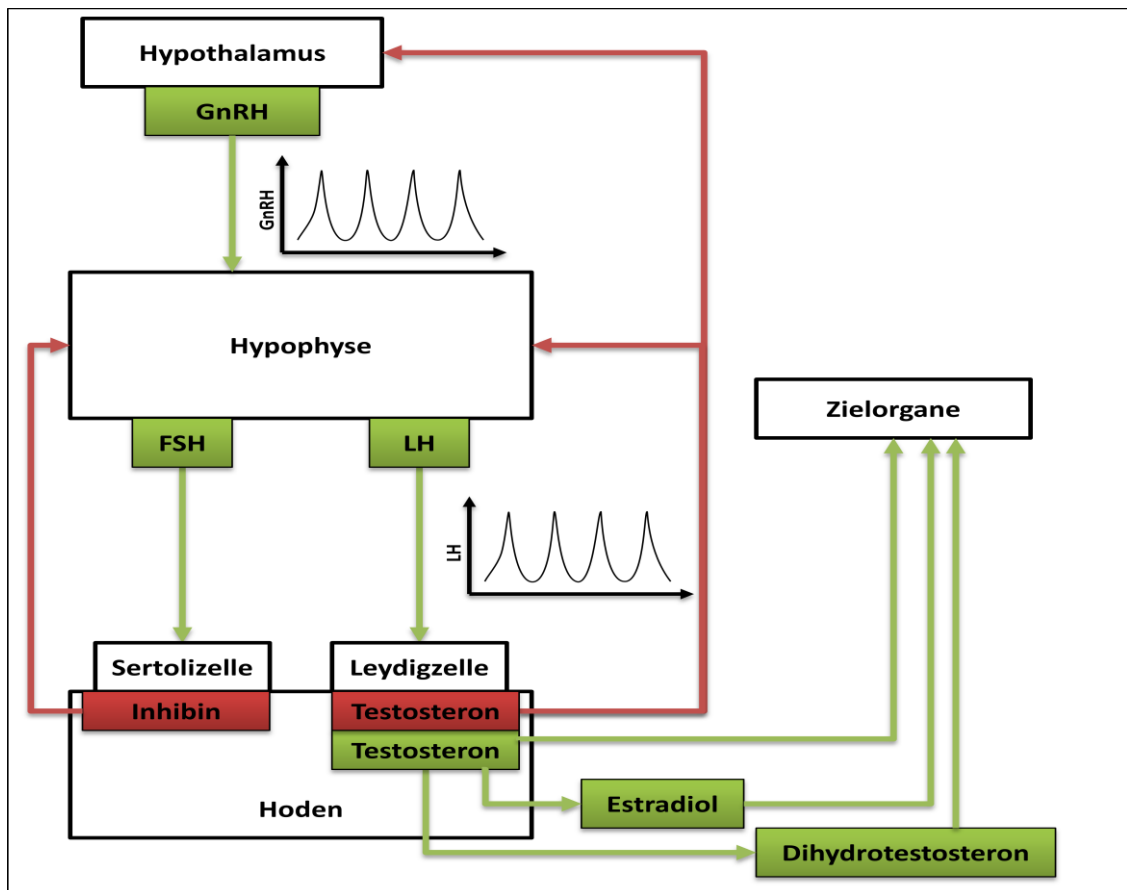
jedoch weisen übergewichtige Tiere eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression auf (Hotamisligil et al., 1999). Die Sekretion bei adipösen Menschen hingegen zeigt sich nur gering erhöht (Mohamed-Ali, 1997), eine Gewichtsabnahme geht jedoch mit einer Reduktion der TNF- $\alpha$ -Serumkonzentration einher (Kern et al., 1995). Am Fettgewebe bewirkt TNF- $\alpha$  in-vitro eine Hemmung der Differenzierung, eine Apoptose der reifen Adipozyten sowie eine Dedifferenzierung der Präadipozyten (Petruschke und Hauner, 1993; Prins et al., 1997). Außerdem hemmt es die Expression Adipozyten-spezifischer Gene sowie die Expression von PPAR- $\gamma$  und verschiedener C/EBPs (Stephens und Pekala, 1991; Feingold und Grunfeld, 1992; Zhang et al., 1996). Über diese und weitere Wege kann TNF- $\alpha$  die Adipogenese sowie die Lipogenese in murinen 3T3-L1-Vorläuferzellen hemmen (Qadir et al., 2011; Liu et al., 2011). Somit weist TNF- $\alpha$  zwar antiadipogene Eigenschaften auf, jedoch führt es über eine Zunahme der Insulinresistenz sowie einer verminderten Glukose-Aufnahme durch eine GLUT-4-Hemmung und durch eine erhöhte Lipolyserate zu eher negativen metabolischen Effekten (Hauner et al., 1995).

Das Gen Rho guanine nucleotide exchange factor 12 (ARHGEF-12) liegt auf dem Chromosom elf und kodiert für eine Rho-GTPase, welche G-Protein-gekoppelte Signalwege reguliert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23365>, aufgerufen am 06.02.2017). Auch das Gen ras related dexamethasone induced 1 (RASD-1) auf dem Chromosom 17 kodiert für eine GTPase aus der Ras-Superfamilie, welche durch Dexamethason induziert werden kann und G-Protein-gekoppelte Signalwege reguliert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51655>, aufgerufen am 06.02.2017). Beide Proteine sind an den verschiedensten, fundamentalen Zellprozessen wie Zellwachstum und -differenzierung beteiligt. Ihr Einfluss während der Adipogenese ist bisher nicht untersucht.

### **1.3 Androgene**

Androgene sind Sexualhormone, die zu den Steroidhormonen gehören und sich vom Cholesterin ableiten. Neben dem Hauptvertreter Testosteron (T) zählen auch dessen Metabolit Dihydrotestosteron (DHT), sowie Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion zu den wichtigsten, im Körper zirkulierenden Androgenen. Während Testosteron zum überwiegenden Teil von den Leydigzellen im Hoden produziert wird, erfolgt lediglich 20 % der DHT-Sekretion durch den Hoden. Der größte Teil des DHT wird durch die 5 $\alpha$ -Reduktase in den peripheren Geweben aus Testosteron gebildet. Das biologisch hochaktive Dihydrotestosteron bindet dort stärker an die Zielrezeptoren als Testosteron selbst (Hammond et al., 1977). Alle weiteren zirkulierenden Androgene werden teilweise im Hoden, größtenteils jedoch in der Zona reticularis der Nebennierenrinde gebildet und im peripheren Gewebe zu Testosteron

umgewandelt (Horton et al., 1966). Die Testosteronsekretion folgt einer zirkadianen Rhythmik und zeigt die höchsten Konzentrationen am frühen Morgen, die niedrigsten am späten Nachmittag (Resko et al., 1966). Dieser Tag-Nacht-Rhythmus entsteht vor allem durch die pulsatile Freisetzung des Gonadotropin-releasing Hormons (GnRH) im Hypothalamus und des Luteinisierenden Hormons (LH) in der Hypophyse (Veldhuis et al., 1987; Knobil, 1990). Diese Feedbackschleife unterliegt einer mehrfach negativen Rückkopplung, durch welche die Testosteronsekretion reguliert und an die einzelnen Lebensphasen angepasst werden kann (siehe Abbildung 2). Der Transport im Blut erfolgt überwiegend proteingebunden. Lediglich 2 % des Testosterons liegen in freier Form vor, während 44 % des Hormons im Plasma an Albumin gebunden sind und die übrigen 54 % an sex-hormone-binding globulin (SHBG) gebunden vorliegen (Nieschlag E, Behre HM: Testosterone, Action, Deficiency, Substitution, 4. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, 2012; pp. 21). Die Serum-Testosteronkonzentration gesunder, erwachsener Männer liegt zwischen 12 und 40 nmol/l (Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S: Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 2009, S. 111), die Konzentration für Dihydrotestosteron im Serum gesunder, erwachsener Männer liegt zwischen 0,8 und 2,5 nmol/l (Kaufman et al., 2005).



**Abbildung 2:** Steuerung der Testosteronsekretion über die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse. Im Hypothalamus erfolgt eine pulsatile Freisetzung des Gonadotropin-releasing Hormons (GnRH), welches in der Hypophyse die ebenfalls pulsatile Freisetzung des Luteinisierenden Hormons (LH), aber auch eine Freisetzung des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) bewirkt. FSH stimuliert die Sertoli-Zellen in den Hodenkanälchen, welche die Spermatogenese anregen und Inhibin sezernieren. Inhibin wiederum hat einen hemmenden Effekt auf die FSH-Produktion in der Hypophyse. LH stimuliert die Leydigzellen im Interstitium des Hodens zur Testosteronproduktion, welches dann direkt an seinen Zielorganen wirken kann oder seine Wirkung über eine periphere Umwandlung in das biologisch hochaktive Dihydrotestosteron oder seinen Metaboliten Estradiol entfaltet. Testosteron selbst bewirkt außerdem über eine negative Rückkopplung die Hemmung der GnRH-Sekretion im Hypothalamus, sowie der LH-Sekretion in der Hypophyse (modifiziert nach Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S: *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 2009, S. 38-41).

### 1.3.1 Biologische Funktionen

Aufgrund ihrer Molekülstruktur weisen Androgene lipophile Eigenschaften auf. Sie können durch die Zellmembran diffundieren und ihre Wirkung durch die Bindung von T oder DHT an den zytoplasmatisch gelegenen Androgenrezeptor (AR) entfalten. Daneben besitzen Androgene auch nicht genomische Effekte, in dem sie weitere Signalwege z.B. über G-Proteingekoppelte Rezeptoren, Ionenkanäle oder Enzym-gebundenen Rezeptoren aktivieren, die nicht auf DNA-Ebene wirken (Watson, 1999). Diese schnellen Effekte der Androgene spielen vor allem für die intrazelluläre Calcium-Mobilisation eine Rolle (Benten et al., 1999). Die wichtigste Funktion der Androgene ist zunächst die Festlegung des männlichen Geschlechts, die Entwicklung der primären Geschlechtsorgane sowie die Entwicklung und Erhaltung des männlichen Phänotyps. Testosteron spielt außerdem eine zentrale Rolle bei der reproduktiven

und sexuellen Funktion des Mannes, indem es die Spermatogenese aufrecht erhält und die Keimzellapoptose verhindert (Singh et al., 1995). Daneben besitzen Androgene zahlreiche metabolische Effekte. Sie führen zu einer Zunahme der Muskelmasse mit reziprok dazu abnehmender Fettgewebsmasse, sie erhöhen die Knochendichte sowie die Insulinsensitivität peripherer Gewebe. Außerdem haben sie Einfluss auf Verhalten und Kognition (Nieschlag E, Behre HM: Testosterone, Action, Deficiency, Substitution, 4. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, 2012, pp. 114-115). Vor allem die positiven metabolischen Effekte sind klinisch relevant, da Androgene über die Abnahme des viszeralen Fettgewebes die Prävalenz des metabolischen Syndroms und damit einhergehenden Folgeerkrankungen senken (Mårin et al., 1993).

### **1.3.2 Androgene in der Adipogenese**

Neben der Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane sowie der sexuellen und reproduktiven Funktion haben Androgene auch entscheidende metabolische Effekte. Vor allem die inverse Korrelation zwischen totaler Testosteronkonzentration und der Fettgewebsmasse des Körpers ist klinisch relevant (Blouin et al., 2005). Testosteron zeigt dabei einen Einfluss auf das subkutane, primär aber auf das viszerale Fettgewebe (Tsai et al., 2000). Die pathophysiologischen Mechanismen, die diese Zusammenhänge erklären, sind längst nicht alle bekannt und deshalb Gegenstand dieser Arbeit. Eine Studie an pluripotenten Maus-Stammzellen zeigte, dass Androgene die Entwicklung der mesenchymalen Stammzellen hin zur myogenen Differenzierung festlegen und somit die adipogene Differenzierung dieser Stammzellen verhindern (Singh et al., 2003). Auch in humanen multipotenten Stammzellen wird bereits die Determination zu adipogenen Stammzellen und somit die Entwicklung der Präadipozyten durch Androgene gehemmt (Chazenbalk et al., 2013). Neben den Effekten auf die Stammzell determinierung zeigen Androgene auch Effekte auf die nachfolgenden Entwicklungsstufen der Fettzellen. In murinen 3T3-L1-Präadipozyten konnte die adipogene Differenzierung durch Testosteron gehemmt werden (Singh et al., 2006). Diese Hemmung beruht auf einer verminderten Lipidakkumulation sowie einer verminderten Expression Adipogenese-assoziiierter Gene. Vor allem die Expression der Masterregulatoren PPAR- $\gamma$  und C/EBP- $\alpha$ , aber auch die Expression von C/EBP- $\beta$  und C/EBP- $\delta$  wird durch Testosteron vermindert (Hartig et al., 2013). Dihydrotestosteron hemmt sowohl die Differenzierung und Proliferation der humanen mesenchymalen Stammzellen als auch die der humanen Präadipozyten. Ähnlich der murinen Präadipozyten beruht auch diese Hemmung auf der verminderten Lipidakkumulation sowie der verminderten Expression von PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$  und Leptin (Gupta et al., 2008). Da PPAR- $\gamma$  und C/EBP- $\alpha$  auch für die Aufrechterhaltung des



differenzierten Zustandes verantwortlich sind, konnten für Androgene auch Effekte auf die reifen Fettgewebszellen nachgewiesen werden (Sato et al., 2013). Reife Adipozyten sind durch die Expression bestimmter Proteine in der Lage Energiereserven in Form von Triglyzeriden zu speichern und Fettsäuren bei Nährstoffmangel freizugeben (Lipolyse). Verschiedene Studien zeigen unter Testosteron-Behandlung nicht nur in den Adipozyten der Ratten eine erhöhte Lipolyserate (Xu et al., 1991), sondern auch in den humanen Adipozyten aus Zellkulturmodellen (Blouin et al., 2008). Auch unter Zugabe von Dihydrotestosteron zu humanen Adipozyten konnte eine Zunahme der Lipolyse beobachtet werden. Weiterhin bewirkt DHT über eine Hemmung der Diacylglycerol-Acyltransferase (DGAT-2) sowie der Acetyl-CoA-Carboxylase- $\alpha$  (ACC- $\alpha$ ) eine verminderte Aufnahme der Fettsäuren und somit eine verminderte Lipidsynthese in den Zellen. Die mit DHT behandelten Fettgewebeskulturen zeigen insgesamt eine geringere Differenzierung mit verminderter Zellgröße und kleineren Lipidansammlungen (Gupta et al., 2008). Eine weitere Eigenschaft des reifen Fettgewebes stellt die Aktivität als endokrines Organ dar. Die Fettzellen sind in der Lage Zytokine (TNF- $\alpha$ ), Chemokine und Adipozytokine (Leptin, Adiponektin) zu sezernieren, die an der Regulation verschiedener Stoffwechselfunktionen beteiligt sind (Ali et al., 2013). Androgene können auch über eine Veränderung der Expression dieser Faktoren zur Regulation der Adipogenese beitragen. Die Expression des Adipozyten-spezifischen Proteins Leptin, welches mit zunehmender Fettgewebsmasse verstärkt sezerniert wird (Caro et al., 1996), wird sowohl von Testosteron als auch von Dihydrotestosteron gehemmt. Die Ursachen für die inverse Beziehung zwischen Androgenen und Leptin sind unklar. Da Leptin die Nahrungsaufnahme hemmt, scheint der Androgeneffekt vor allem für den erhöhten Energiebedarf des Mannes eine Rolle zu spielen (Wabitsch et al., 1997). Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$ , welches ebenfalls mit zunehmender Fettgewebsmasse verstärkt sezerniert wird, ist an der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 sowie weiterer kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt (Ridker et al., 2000). Durch eine Testosteron-Substitutionstherapie bei hypogonadalen Männern konnte eine signifikante Abnahme der TNF- $\alpha$ -Serumkonzentration nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt einen positiven Effekt der Androgene auf die zunehmende Inflammation im Fettgewebe und damit einhergehender Folgeerkrankungen (Malkin et al., 2004). Adiponektin, ein weiteres Adipozyten-spezifisches Protein mit antidiabetogenen und antiatherogenen Effekten, zeigt widersprüchliche Ergebnisse in seiner Expression unter Androgensubstitution. Die Serumkonzentration von Adiponektin liegt bei Männern deutlich niedriger als die bei Frauen, jedoch konnte in den durchgeführten in-vitro-Versuchen keine Veränderung der Adiponektin-Expression unter Zugabe von Androgenen gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen weiteren Faktor im Serum hin, der durch Androgene reguliert wird und die

geschlechtsspezifischen Unterschiede der Adiponektin-Expression erklären könnte (Nishizawa et al., 2002; Horenburg et al., 2008).

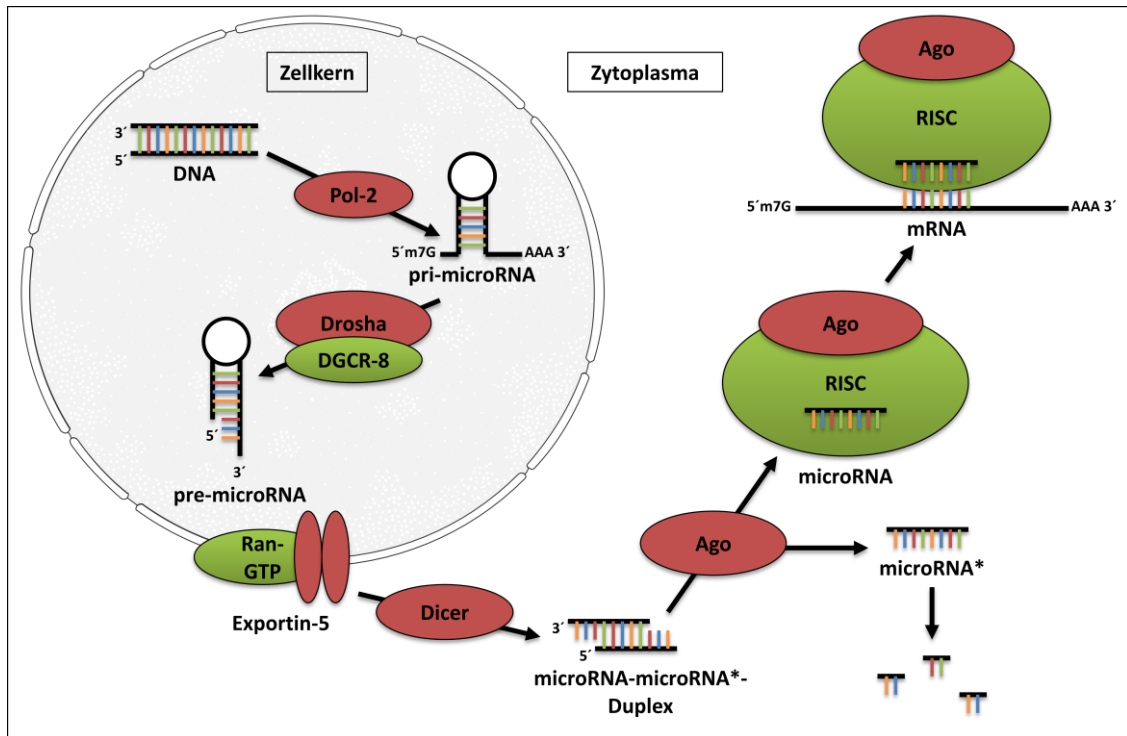
## **1.4 MicroRNAs**

### **1.4.1 Biologische Funktionen**

MicroRNAs (miRs) sind kurze, einzelsträngige, nicht-kodierende RNA-Moleküle endogenen Ursprungs, welche zeitlich reguliert und gewebsspezifisch exprimiert werden (Lagos-Quintana et al., 2002). Lee und Kollegen entdeckten 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* das Gen *lin-4*, welches nicht für ein Protein kodiert, sondern schmale RNA-Moleküle exprimiert, die an der Entwicklung der Larven beteiligt sind (Lee et al., 1993). Wightman und Mitarbeiter konnten zeigen, dass diese *lin-4*-RNAs komplementär im 3'UTR der *lin-14*-mRNA binden (Wightman et al., 1991) und somit vor allem die *lin-14*-Proteinexpression hemmen. Diese spezifische translationale Repression verhindert den Übergang vom ersten zum zweiten Larvenstadium und damit entscheidende Entwicklungsprozesse des *C. elegans* (Wightman et al., 1993). Bis heute wurden 2588 humane microRNAs (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>, aufgerufen am 28.03.2017) beschrieben, die als konservierte Regulatoren der Genexpression das Proteinprofil der Zellen beeinflussen und im Zusammenspiel mit anderen Faktoren die verschiedensten biologischen Funktionen steuern.

Die Gene der humanen microRNAs liegen im Genom verteilt und können auf allen Chromosomen vorkommen, außer auf dem Y-Chromosom. Einige miRs liegen in Clustern vor (Lau et al., 2001) und werden als polycistronische Primärtranskripte transkribiert (Lee et al., 2002). Diese Cluster entstehen durch Genduplikationen, sodass die einzelnen microRNAs oftmals dieselben Gene oder zumindest denselben Signalweg beeinflussen. Rodriguez und Kollegen zeigten, dass die meisten miR-Gene in definierten Transkriptionseinheiten (transcription units, TUs) innerhalb der Introns Protein-kodierender oder nicht Protein-kodierender Regionen oder sogar in TUs nicht Protein-kodierender Exons lokalisiert sind. Außerdem gibt es durch alternative Splicing-Varianten auch „mixed“ microRNAs, deren Gene innerhalb von Introns oder Exons liegen (Rodriguez et al., 2004). Anstelle eines eigenen Promotors werden die meisten microRNAs durch die Promotoren ihrer Zielgene transkribiert (Baskerville und Bartel, 2005), welche eine Bindestelle für die RNA-Polymerase 2 (Pol-2) enthalten. Die Pol-2 ist für die Transkription des Großteils der miR-Gene verantwortlich (Lee et al., 2004). Wie alle Pol-2-Transkripte trägt das Primärtranskript einer microRNA (pri-microRNA) eine 7-Methylguanosin-Kappe und einen Poly-A-Schwanz (Cai et al., 2004). Die doppelsträngige pri-microRNA besteht aus etwa 33 Basenpaaren und enthält eine Haarnadel-Struktur. Diese

„stem-loop“-Struktur stellt die Vorläufer-microRNA (pre-microRNA) dar und wird von der nukleären Endoribonuklease 3 (Drosha) aus der pri-microRNA herausgeschnitten (Lee et al., 2003). Zusammen mit dem Kofaktor DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR-8), der für die Erkennung der doppelsträngigen RNA verantwortlich ist, bildet Drosha den Mikroprozessor-Komplex (Gregory et al., 2004). Es entsteht eine 60 bis 70 Nukleotide lange pre-microRNA mit einem 3'-Überhang (Basyuk et al., 2003). Die übrigen Fragmente werden im Kern degradiert. Über den Ran-dependent nuclear transport receptor Exportin-5 (Exp-5) wird die pre-microRNA ins Zytoplasma transportiert (Bohnsack et al., 2004). Dort befindet sich die zytoplasmatische Endoribonuklease 3 (Dicer), die aus mehreren Domänen besteht. Die PAZ-Domäne bindet die pre-microRNA (Park et al., 2011), während eine Helikase der N-terminalen Domäne die einzelsträngige „stem-loop“-Struktur erkennt und somit die Schnittstelle markiert (Tsumumi et al., 2011). Das RNase-3a/b-Tandem der C-terminalen Domäne entfernt die „stem-loop“-Struktur, sodass ein instabiler, 22 Nukleotide langer microRNA-microRNA\*-Duplex entsteht (Lau et al., 2012). Der entstandene Duplex wird von Argonaute-Proteinen als Teil des RNA-induced silencing complex (RISC) erkannt und in zwei Einzelstränge gespalten. Nur der Strang mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende kann von einem Helikase-ähnlichen Enzym entwunden und dem RISC zugeführt werden. Der dazu komplementäre Strang wird degradiert (Khvorova et al., 2003). Die Nukleotide zwei bis acht am 5'-Ende einer miR werden als „seed“-Sequenz bezeichnet. Sie sind konserviert, können komplementär im 3'UTR der Ziel-mRNA binden und über zwei Wege die Proteinexpression beeinflussen (Lewis et al., 2003). Sind die microRNA und die Ziel-mRNA perfekt komplementär, wird die mRNA zerschnitten, ansonsten erfolgt eine translationale Reprimierung durch eine gestörte Bildung des ribosomalen Komplexes im Zytoplasma (Hutvagner et al., 2002; Valencia-Sanchez et al., 2006). Man geht davon aus, dass microRNAs so an der Regulation von über 60 % der humanen mRNAs beteiligt sind (Siomi und Siomi, 2010). Durch ihre posttranskriptionelle Regulation der Genexpression nehmen sie somit eine entscheidende Rolle in verschiedenen biologischen Funktionen, aber auch in der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten ein.



**Abbildung 3:** Biogenese einer microRNA. Im Zellkern erfolgt zunächst die Transkription durch die RNA-Polymerase-2 (Pol-2). Es entsteht ein Primärtranskript (pri-microRNA) mit einer 7-Methylguanidin-Kappe und einem Poly-A-Schwanz. Die doppelsträngige pri-microRNA besteht aus etwa 33 Basenpaaren und enthält eine Haarnadel-Struktur. Diese Haarnadel-Struktur stellt die Vorläufer-microRNA (pre-microRNA) dar und wird von der nukleären Endoribonuklease 3 (Drosha) zusammen mit dem Kofaktor DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR-8) aus der pri-microRNA herausgeschnitten. Die pre-microRNA wird über den Ran-abhängigen nukleären Transportrezeptor Exportin-5 (Exp-5) ins Zytoplasma transportiert und dort von der Endoribonuklease 3 (Dicer) zu einem 22 Nucleotide langen, instabilen microRNA-microRNA\*-Duplex prozessiert. Der Duplex wird von Argonaute-Proteinen (Ago) erkannt, entwunden und gespalten. Nach Aufnahme der reifen microRNA in den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) beeinflusst diese die Proteinexpression verschiedener Gene über eine komplementäre Bindung an der 3' UTR der mRNA. Der instabile microRNA\*-Strang wird abgebaut (modifiziert nach Yates et al., 2013).

#### 1.4.2 MicroRNAs in der Adipogenese

MicroRNAs weisen bei einer Vielzahl an biologischen Funktionen entscheidende regulatorische Effekte auf. Sie sind an der Steuerung der Zellproliferation und -differenzierung sowie der Apoptose, des Fettmetabolismus und der Regulation verschiedener metabolischer Regelkreise beteiligt (Singh et al., 2008). Besonders die Beteiligung der microRNAs in der Steuerung der Adipogenese ist für die Entstehung vieler chronischer Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, Krebs und kardiovaskulärer Krankheitsbilder relevant (Lu et al., 2005; D'Alessandra et al., 2010). MicroRNAs können in den verschiedenen Entwicklungsstufen der Fettzellen ansetzen und die zahlreichen Signalwege oder Transkriptionsfaktoren beeinflussen, die die adipogene Differenzierung steuern. PPAR- $\gamma$  ist sowohl ein Zielgen der microRNA-27a, welche nach Überexpression in murinen 3T3-L1-Zellen die adipogene Differenzierung hemmt, als auch ein Zielgen der miR-27b, welche die Differenzierung in humanen mesenchymalen Stammzellen hemmt (Karbiener et al., 2009; Kim et al., 2010). Eine weitere Adipogenese-hemmende microRNA stellt die miR-31 dar. Über eine Hemmung der C/EBP- $\alpha$ -Expression führt sie in

murinen mesenchymalen Stammzellen zu einer Abnahme der adipogenen Differenzierung (Sun et al., 2009). Ähnliche Effekte wurden für die miR-326 beschrieben (Tang et al., 2009). Die miR-448 gilt als ein potentieller Inhibitor der Adipogenese in 3T3-L1-Adipozyten, da sie die Expression des KLF-5 hemmt (Kinoshita et al., 2010). Qin und Kollegen fanden heraus, dass insgesamt 18 miRNAs die Adipogenese über eine Hemmung des Wnt-Signalweges fördern und 29 miRNAs über eine Aktivierung des Signalweges die Fettzellentwicklung inhibieren. Jedoch konnten bisher nur TCF-712 als Zielgen der miR-210 und TCF als Zielgen der miR-8 identifiziert werden. Durch eine Überexpression der miR-210 in 3T3-L1-Zellen wird die Adipogenese stimuliert (Qin et al., 2010). Die miR-21 hingegen bewirkt eine Hemmung des TGF- $\beta$ -Signalweges. Durch eine verminderte Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptor-Kinase-2 (T $\beta$ R-2) kommt es zu einer Zunahme der adipogenen Differenzierung in hADSC (Kim et al., 2009).

Bisher wurden 31 microRNAs oder microRNA-Familien identifiziert, die in der Adipogenese verschiedener humaner Zellsysteme eine Rolle spielen (siehe Tabelle 1). Eine ähnlich große Zahl ergibt sich für die microRNAs, die in murinen Zellsystemen evaluiert werden konnten.

**Tabelle 1:** Adipogenese-assoziierte microRNAs in humanen Adipozyten-Zellsystemen. hMSC = humane mesenchymale Stammzellen; hADSC = human adipose-derived stemcells; hMADS = human multipotent adipose-tissue-derived stemcells; SGBS = Simpson-Golabi-Behmel Syndrom-Zellen; + = stimulierende Effekte in der Adipogenese; - = hemmende Effekte in der Adipogenese

microRNA	Effekte in der Adipogenese	Zellsystem	Zielgen	Referenz
mir-17-5p	+	hADSC	BMP-2	Li et al., 2013a
miR-21	+	hADSC	T $\beta$ R-2	Kim et al., 2009
miR-21	-	hMSC	SPRY-2	Mei et al., 2013
miR-26	+	hADSC	Adam-17	Karbiener et al., 2014b
miR-27b	-	hMSC	PPAR- $\gamma$	Karbiener et al., 2009
miR-29b	+	hADSC	---	Zhang et al., 2016
miR-30a/d	+	hADSC	RUNX-2	Zaragosi et al., 2011
miR-30c	+	hADSC	PAI-1, ALK-2	Karbiener et al., 2014a
miR-96	+	hMSC	---	Laine et al., 2012
miR-106a	+	hADSC	BMP-2	Li et al., 2013a
miR-125b-5p	+	SGBS	MMP-11	Rockstroh et al., 2016
miR-124	+	hMSC	---	Laine et al., 2012
miR-130	-	hMSC	PPAR- $\gamma$	Lee et al., 2011

miR-137	-	hADSC	CDC-42	Shin et al., 2014
miR-138	-	hADSC	EID-1	Yang et al., 2011
miR-143	+	hMSC	ERK-5	Esau et al., 2004
miR-148a	+	hMSC	Wnt-1	Shi et al., 2015
miR-155	-	hMSC	---	Skårn et al., 2012
miR-194	-	hMSC	COUP-TF-2	Jeong et al., 2014
miR-204-5p	+	hADSC	DVL-3	He et al., 2015
miR-221/222	+	hMSC	---	Skårn et al., 2012
miR-320	+	hMSC	RUNX-2	Hamam et al., 2014
miR-335	-	hMSC	RUNX-2	Tomé et al., 2011
miR-342-3p	+	hMSC	CtBP-2	Wang et al., 2015
miR-363	-	hADSC	E2F-3	Chen et al., 2014
miR-369-5p	-	hMSC	DNMT3A	Bork et al., 2011
miR-371	+	hMSC	DNMT3A	Bork et al., 2011
miR-375	-	SGBS	ADIPOR-2	Kraus et al., 2015
miR-486-5p	-	hADSC	Sirt-1	Kim et al., 2012
miR-642a-3p	+	hADSC	---	Zaragosi et al., 2011
miR-1275	-	hADSC	ELK-1	Pang et al., 2016
miR-1908	-	hMADS	---	Yang et al., 2015

Die in-vitro Ergebnisse unterscheiden sich jedoch zum Teil stark von den Ergebnissen in-vivo. Dies kann zum einen an den verschiedenen Geweben liegen, die in den einzelnen Arbeiten untersucht wurden, zum anderen aber auch an der Fülle der Regulatoren, die in-vivo miteinander agieren. In-vivo zeigt sich eine Downregulation der miR-143 sowie der miR-659 im Fettgewebe übergewichtiger Patienten, während die miR-103 und die miR-150 verstärkt exprimiert werden (Martinelli et al., 2010; Ortega et al., 2010). Adipositas geht außerdem mit einem veränderten Expressionsprofil im Plasma zirkulierender humaner microRNAs einher. Während die Konzentrationen der miR-140-5p und der miR-142-3p bei stark übergewichtigen Patienten ansteigen, fallen die Konzentrationen der miR-532-5p, miR-125b, miR-130b, miR-221, miR-15a, miR-520c-3p sowie der miR-423-5p ab (Ortega et al., 2013). Veränderungen der Expression der miR-197, miR-23a, miR-509-5p, miR-130a, miR-195, miR-27a und der miR-320a im Plasma gehen außerdem mit einem erhöhtem Risiko der Entstehung des metabolischen Syndroms einher (Karolina et al., 2012). microRNAs stellen somit in Zukunft nicht nur mögliche

Biomarker, sondern auch potentielle therapeutische Targets in der Behandlung systemischer Erkrankungen dar.

### **1.4.3 Androgen-responsive MicroRNAs**

Die meisten Studien, die die Interaktion zwischen Androgenen und microRNAs untersuchen, arbeiten mit Prostatakarzinom-Zelllinien. In diesen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass es microRNAs gibt, die ihr Expressionsmuster unter dem Einfluss von Androgenen verändern. Die miR-125b weist innerhalb verschiedener Prostatakarzinom-Zellsysteme eine Androgen-abhängige Regulation auf und übt somit Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen aus (Shi et al., 2007). Außerdem zeigten sich die miR-21, miR-155, miR-135a und b, miR-144, miR-448 und die miR-654 in Prostatakarzinom-Zellen als Androgen-regulierte microRNAs (Wang et al., 2008b). Doch nicht nur in Prostatakarzinom-Zelllinien wurden Androgen-responsive microRNAs nachgewiesen, sondern auch in murinen Zellsystemen. Panneerdoss und Kollegen konnten insgesamt 28 microRNAs identifizieren, die in Maus-Sertolizellen Androgen-abhängig exprimiert werden (Panneerdoss et al., 2012). Studien, die Androgen-responsive microRNAs in Fettzellsystemen untersuchen, existieren bisher kaum. Lediglich eine Arbeit beschreibt die Androgen-abhängige Regulation der miR-375 in humanen SGBS-Prädipozyten (Kraus et al., 2015). Weitere Untersuchungen sind nötig, um microRNAs zu identifizieren, die Androgen-abhängig die Adipogenese regulieren und somit als mögliche therapeutische Targets in der Behandlung der metabolischen Folgen des LOH dienen.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Der Late-onset-Hypogonadismus ist ein Krankheitsbild des alternden Mannes, welches, getriggert durch eine abnehmende Testosteronkonzentration im Serum, u.a. mit einer Zunahme des viszeralen Fettgewebes und damit verbundenen Folgeerkrankungen einhergeht. Die molekularen Mechanismen der gesteigerten Adipogenese unter Testosteronmangel sind längst nicht alle bekannt. MicroRNAs, als posttranskriptionelle Genregulatoren, sind an der Regulation einer Vielzahl an physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt und scheinen auch in der Regulation der adipogenen Differenzierung eine entscheidende Rolle zu spielen. Bisher sind jedoch nur wenige Adipogenese-assoziierte microRNAs bekannt, deren Expression durch Androgene gesteuert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit soll (1) mittels quantitativen Real-Time-PCRs die Expression des microRNA-Clusters-130/301 während der Adipogenese in SGBS-Prädipozyten unter Zugabe von Testosteron oder Dihydrotestosteron vermessen werden, um eine Androgen-abhängige Regulation dieser microRNA nachzuweisen.

Weiterhin erfolgt (2) die Suche möglicher Zielgene der miR-130a als prominentestes Mitglied des microRNA-Clusters. Die putativen Zielgene Androgenrezeptor, AdipoQ, Leptin, PPAR- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , RASD-1 und ARHGEF-12, die im Zusammenhang mit der Adipogenese stehen, sollen mittels Luziferase-Assays in-vitro verifiziert werden.

Anschließend wird (3) die mRNA- sowie die Protein-Expression der verifizierten Zielgene mittels quantitativer Real-Time-PCRs bzw. mittels Western-Blot-Analysen nach Adipogenese-Induktion in SGBS-Zellen vermessen, um die Expression der Gene im Verlauf der adipogenen Differenzierung zu detektieren. Außerdem soll eine mögliche Expressionsänderung der Targetgene unter Androgensubstitution während der Fettzellentwicklung untersucht werden.

Mit diesen Untersuchungen soll das microRNA-Cluster-130/301 als ein regulierender Faktor in der Adipogenese identifiziert werden und der Einfluss der Androgene auf dessen Expression sowie auf die Expression der verifizierten Zielgene untersucht werden, um einen möglichen Zusammenhang dieser Faktoren in der Entstehung der metabolischen Symptome des Late-onset-Hypogonadismus aufzuzeigen. Eine Androgen-Substitutionstherapie stellt bisher die einzige kausale Behandlungsmethode der zunehmenden Adipositas und damit verbundener metabolischer Folgeerkrankungen im Rahmen dieser Erkrankung des alternden Mannes dar. In Zukunft könnte das microRNA-Cluster-130/301 neben oder zusammen mit den Androgenen ein therapeutisches Target in der Behandlung dieser Symptome sein.



### 3. Material

#### 3.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden in der Zellkultur des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg nach Standardprotokollen kultiviert. Die Zelllinie SAOS-2 wurde von ATCC bezogen, die Zelllinie SGBS wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. M. Wabitsch aus Ulm bereitgestellt und nach dessen Standardprotokollen kultiviert.

Tabelle 2: Zelllinien

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Referenzen	ATCC-Nummer
SAOS-2	Osteosarkom	Fogh et al., 1977	HTB-85
SGBS	viszerales Fettgewebe	Wabitsch et al., 2001	---

#### 3.2 Vektoren

Tabelle 3: Vektoren

Vektor	Antibiotikaresistenz	Firma	Verwendungszweck
pCR2.1	Kanamycin, Ampicillin	Invitrogen (Karlsruhe)	Klonierung
psiCheck2	Ampicillin	Promega (Heidelberg)	Luziferase-Assay

#### 3.3 Primer

Die folgenden Primer wurden mittels des Programms CloneManager designt und von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert:

Tabelle 4: Primer für Klonierung und quantitative real-time PCR. Fw = forward, rv = reverse.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Orientierung
ADIPOQ-fw	CTCGAGAGCTCCTGTCTTGGGAAGGACTAC	sense
ADIPOQ-rv	GCGGCCGCAACCTGAAGTCTCAGCTACTC	antisense
AR-fw	CTCGAGAGCCCCAGTGAAGCATTGGAAAC	sense
AR-rv	GCGGCCGCAAGTGTGGCTGGCACAGAGTAG	antisense
ARHGEF12-fw 1	GGTGGCGCACTCGAGCCGAGGGTGGGATGGGAGTGGGTA	sense
ARHGEF12-rv 1	GGTGGCGCGGCCGCACCGCAATCACGGCCCCGTGTGGAA	antisense
ARHGEF12-fw 2	GGTGGCGCACTCGAGCCGCTGTCATGTGCACACTGTTGG	sense

ARHGEF12-rv 2	GGTGGCGCGGCCGCACCGGTCTGACAGTCACTGACAGG	antisense
GAPDH-fw	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	sense
GAPDH-rv	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	antisense
Leptin-fw	CTCGAGAGCCCCTCAGGGATCTTGCAATC	sense
Leptin-rv	GCGGCCGCAACCCTTCAAGGTCCTTCAG	antisense
PPAR $\gamma$ -fw	CTCGAGAGCGAGCCCAAGTTTGAGTTTGC	sense
PPAR $\gamma$ -rv	GCGGCCGCAAGGTGTCAGATTTTCCCTCA	antisense
RASD1-fw	GGTGGCGCACTCGAGCCGTGCCCGCTTGAGGGTCAGGA	sense
RASD1-rv	GGTGGCGCGGCCGCACCGTAAAGACCTCACACACAC	antisense
TNF $\alpha$ -fw	CTCGAGAGCGGGCCTACAGCTTTGATCCC	sense
TNF $\alpha$ -rv	GCGGCCGCAAGGAGCAGAGGCTCAGCAATG	antisense

Die weiteren Primer wurden ebenfalls mittels des Programms CloneManager designt und von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert.

**Tabelle 5:** Mutagenese-Primer. Fw = forward, rv = reverse.

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Orientierung</b>
ADIPOQ-fw 1	CCCTACACTACTCTACTTCC	sense
ADIPOQ-rv 1	GGAAGTAGAGTAGTGTAGGG	antisense
AR-fw 1	AACTCTACACTACTCCTCTG	sense
AR-rv 1	CAGAGGAGTAGTGTAGAGTT	antisense
ARHGEF12-fw 1	ATTTTCGCACTGATGGTGCCAAAGG	sense
ARHGEF12-rv 1	CCTTTGGCACCATCAGTGCGAAAAT	antisense
ARHGEF12-fw 2	GGCTGTATGTTTCTGGCACAAAATATTGGTCATC	sense
ARHGEF12-rv 2	GATGACCAATATTTTGTGCCAGAAACATACAGCC	antisense
Leptin-fw 1	CCCTGCTCGCACTTTGTAAC	sense
Leptin-rv 1	GTTACAAAGTGCGAGCAGGG	antisense
PPAR $\gamma$ -fw 1	TTCTTCCAGTCGCACTATTC	sense
PPAR $\gamma$ -rv 1	GAATAGTGCGACTGGAAGAA	antisense
RASD1-fw 1	CAAACTCGCACTTTAACGGTAGTTCC	sense
RSASD1-rv 1	GGAACTACCGTTAAAGTGCGAGTTTTG	antisense
RASD1-fw 2	GGACACGCACGAAACCTTAC	sense
RASD1-rv 2	GTAAGTTTTCTGTCGTGTCC	antisense

TNF $\alpha$ -fw 1	GCCAGCTCCCTCTATTTATGTTTCGCACTTG	sense
TNF $\alpha$ -rv 1	CAAGTGCGAACATAAATAGAGGGAGCTGGC	antisense

Die verwendeten microRNA-Primer enthalten den stem-loop-Primer und den TaqMan-Primer für die entsprechende microRNA und wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) synthetisiert.

**Tabelle 6:** TaqMan-Primer

Bezeichnung	Assay-ID
hsa-miR-130a	Hs04231495_s1
hsa-miR-301	Hs04231543_s1
U18-snoRNA	001204

### 3.4 Oligonukleotide

**Tabelle 7:** microRNA-sequenzgleiche Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'	Firma
hsa-miR-130a	CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU	Ambion (Kassel)
hsa-miR-301a	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC	
Anti-miR Negativ Control	random sequence Pre-miR™ molecule	

### 3.5 Antikörper

**Tabelle 8:** Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Ursprungsorganismus	Klon	Firma	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>				
AR	Kaninchen; monoklonal	D6F11	CellSignaling (Frankfurt/Main)	1:500
Adiponektin	Maus; monoklonal	19F1	Abcam (Cambridge, UK)	1:1000
PPAR- $\gamma$	Kaninchen; monoklonal	81B8	CellSignaling (Frankfurt/Main)	1:1000
TNF- $\alpha$	Maus; monoklonal	C-4	Santa Cruz (Heidelberg)	1:200

β-Actin	Maus; monoklonal	AC-15	Sigma (Steinheim)	1:10000
<b>Sekundärantikörper</b>				
Anti-Maus-IgG	Kaninchen; polyklonal	---	Dako (Hamburg)	1:2500
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege; polyklonal	---	CellSignaling (Frankfurt/Main)	1:2500

### 3.6 Kits

BigDyeDirect Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DNase, RNase-free (1500 Kunitz-Units)	Qiagen (Hilden)
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)
ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz	GE Healthcare (München)
FuGene HD Transfection Reagent	Promega (Mannheim)
Hot FIREPol DNA Polymerase	Solis BioDyne (Tartu)
Interferin siRNA Transfection Reagent	Polyplus Transfection (New York)
OneShot TOP10-Zellen (E.coli)	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR Mycoplasma Test Kit	AppliChem (Darmstadt)
PeqGoldPhaseTrap A	Peqlab (Erlangen)
Protein-Assay-Kit (Bradford-Reagenz)	Biorad (München)
QIAquickGelextraktionskit	Qiagen (Hilden)
Maxima SyBrGreen/ROXqPCR Master Mix	Fermentas (St-Leon-Rot)
QuikChange Site-DirectedMutagenesis Kit	Agilent (Waldbronn)
RevertAid H Minus First Strand	
cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St-Leon-Rot)
TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
ZR Plasmid Miniprep Classic	Zymo Research (Freiburg)
Zyppy Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research (Freiburg)

### 3.7 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Apotransferrin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Biotin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Borsäure	AppliChem (Darmstadt)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Promega (Mannheim)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt)
Deoxycholat	AppliChem (Darmstadt)
Dexamethason	AppliChem (Darmstadt)
Dihydrotestosteron (DHT)	AppliChem (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
DNA-Standard (100 bp-Leiter)	Invitrogen (Karlsruhe)
D-Pantothensäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM high glucose; 4,5 g/l L-Glukose)	Gibco (Darmstadt)
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM/F12)	Gibco (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem (Darmstadt)
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	AppliChem (Darmstadt)
Ethanol (96 %)	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid (10 mg/l)	Serva (Heidelberg)
Fötales Bovines Serum	Gibco (Darmstadt)
Gel Pilot Loading Dye (5x)	Qiagen (Hilden)
Glycerin	AppliChem (Darmstadt)
Glykogen (200 µg/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Hydrocortison	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Insulin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isobutylmethylxanthin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Isopropanol	AppliChem (Darmstadt)
Kodak Professional D19 Entwickler	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kodak Professional D19 Fixierer-Konzentrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
LDS Sample Buffer (4x)	Novex (Darmstadt)
LB-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
MES-Puffer (20x)	Novex (Darmstadt)
Methanol (100 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
NotI (Restriktionsenzym)	Fermentas (St-Leon-Rot)
NuPage Bis-Tris-Gel (4 %-12 %)	Novex (Darmstadt)
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH (Berlin)
PenStrep(Penicillin und Streptomycin)	Gibco (Darmstadt)
Protease-Inhibitor	Qiagen (Hilden)
Rosiglitazone	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Proteinstandard SeeBlue Plus 2	Invitrogen (Karlsruhe)
RDD-Puffer (DNA Digest Buffer)	Qiagen (Hilden)
Sample Reducing Agent (10x)	Novex (Darmstadt)
Testosteron	AppliChem (Darmstadt)
Transferpuffer (20x)	Novex (Darmstadt)
Triiodthyronin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
TritonX-100	Serva (Heidelberg)
TRiZoL-Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin	Gibco (Darmstadt)
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)
XhoI (Restriktionsenzym)	Fermentas (St-Leon-Rot)

### 3.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

15/50 ml Röhrchen	Greiner (Nürtingen)
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare (München)
Analysewaage	Kern (Balingen)
Bechergläser	Merck (Darmstadt)
Brutschrank HeraCell 240i	ThermoScientific (Schwerte)
Einweghandschuhe	Sempermed (Wien)
Elektrophoresegerät	Biorad (München)
Freezing Container (Kryokonservierung)	Nalgene (Hereford)
Handzentrifuge	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Kühlschrank	Ewald (Bad Nenndorf)
Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Kryoröhrchen	Nalgene (Hereford)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
Magnetrührstäbchen	Merck (Darmstadt)
Megafuge 1.0 R	Heraeus (Hanau)
Messzylinder	Merck (Darmstadt)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop Eclipse T5100	Nikon (Düsseldorf)
Parafilm	Merck (Darmstadt)
Photometer Bio	Eppendorf (Hamburg)
Pipetboy	Integra Bioscience (Fernwald)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Plattenreader GENios	Tecan (Gröding)
PVDF-Membran	Millipore (Schwabach)
Reaktionsgefäße (0,2/0,5/1,5/2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Real-Time Cyclers	Biorad (München)
Rollmischer	Kisker (Steinfurt)
Schüttler Unimax 1010	Heidolph (Schwabach)
SterilbankHERAsafe	Heraeus (Hanau)

ThermocyclerT3000	Biometra (Göttingen)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Vortex-Schüttler	StarLab (Hamburg)
Zellkultur-Plastikartikel (25/75/175 cm <sup>2</sup> Gewebekulturflaschen, Pipettenspitzen, Einmalpipetten, 96-well-Platten)	Greiner (Nürtingen)
Westernblot-Kammer	Biorad (München)
Zentrifuge 5414 D	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 4-5 L	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Zellzählkammern	Invitrogen (Karlsruhe)
Zellzählgerät	Invitrogen (Karlsruhe)

### **3.9 Puffer und Lösungen**

#### **3.9.1 Zellkultur**

*PBS Dulbecco*

*Trypsin*

*Kultivierungsmedium SAOS-2:* 500 ml DMEM high-glucose  
50 ml Fötale Bovines Serum  
5 ml Antibiotika (Penicillin und Streptomycin)  
bei 4°C aufbewahren

*Basalmedium SGBS:* 500 ml DMEM/F12  
5 ml Antibiotika (Penicillin und Streptomycin)  
500 µl Biotin  
200 µl D-Pantothensäure  
bei 4°C aufbewahren

*Kultivierungsmedium SGBS:* 500 ml DMEM/F12  
50 ml Fötale Bovines Serum  
5 ml Antibiotika (Penicillin und Streptomycin)  
500 µl Biotin  
200 µl D-Pantothensäure



	bei 4°C aufbewahren
<i>Differenzierungsmedium SGBS:</i>	500 ml DMEM/F12
	5 ml Antibiotika (Penicillin und Streptomycin)
	2,5 ml Apotransferrin
	1 ml Insulin
	500 µl Biotin
	500 µl Hydrocortison
	500 µl Dexamethason
	500 µl Isobutylmethylxanthin
	200 µl D-Pantothensäure
	50 µl Triiodthyronin
	50 µl Rosiglitazone
	bei 4°C aufbewahren
<i>3FC-Medium SGBS:</i>	500 ml DMEM/F12
	5 ml Antibiotika (Penicillin und Streptomycin)
	2,5 ml Apotransferrin
	1 ml Insulin
	500 µl Biotin
	500 µl Hydrocortison
	200 µl D-Pantothensäure
	50 µl Triiodthyronin
	bei 4°C aufbewahren
<i>Gefriermedium:</i>	Fötales Bovines Serum
	10 % Glycerin
<b>3.9.2 Proteinisolation</b>	
<i>RIPA-Lysepuffer:</i>	50 nM (pH 7,4) Tris-HCl
	200 nM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	1 % TritonX-100

0,25 % Deoxycholat

### **3.9.3 Agarosegel-Elektrophorese**

*10x TBE-Puffer:* 54 g Tris  
27,5 g Borsäure  
20 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)  
in 1 l Aqua bidest. lösen

### **3.9.4 Klonierung**

*LB-Medium:* 20 g in 1 l Aqua bidest. lösen und autoklavieren  
Zusatz von Ampicillin (100 mg/l)

*LB-Agar für Bakterienkulturen:* 32 g in 1 l Aqua bidest. lösen und autoklavieren  
Zusatz von Ampicillin (100 mg/l)

### **3.9.5 Western-Blot**

*10x TBS:* 100 ml 5 M NaCl  
300 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0)  
600 ml Aqua bidest.

*1x TBS-T:* 50 ml 10x TBS  
500 µl Tween 20  
450 ml Aqua bidest.

*Transferpuffer:* 50 ml Transferpuffer (20x)  
100 ml Methanol  
850 ml Aqua bidest.  
bei 4°C aufbewahren

## **4. Methodik**

### **4.1 Erstellung der Luziferase-Vektoren**

Zur in vitro-Bestimmung von Zielgenen einer microRNA mittels Luziferase-Assay, wurden Fragmente aus dem 3'UTR der mRNA des putativen Zielgens, welche die Bindestelle der microRNA enthalten, in psiCheck2-Vektoren kloniert. Die dafür verwendeten Methoden werden im Folgenden genauer erläutert.

#### **4.1.1 PCR**

Zur Amplifizierung der gewünschten Genabschnitte erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung spezifischer Primer. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz (15 µl) gewählt:

9,1 µl	Wasser (RNase-frei)
1,5 µl	Puffer (10x)
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1,0 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	fw-Primer (10 µM)
0,5 µl	rv-Primer (10 µM)
1,0 µl	cDNA

Das verwendete Programm enthielt folgende Schritte:

1. 95°C	15 min
2. 95°C	20 sec
3. 60°C	30 sec
4. 72°C	30 sec
Schritt 2-4	30x wiederholen
5. 72°C	5 min
6. 4°C	

Die amplifizierte cDNA wurde im Anschluss daran mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt.

#### **4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese und cDNA-Aufreinigung**

Die PCR-Effizienz wurde durch die elektrophoretische Auftrennung der cDNA-PCR-Produkte überprüft. Die Auftrennung erfolgte dabei bei 90 Volt in 1 %-igen Agarosegelen, welche pro 100 ml mit 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/l) versetzt wurden. Die Auftragsmenge betrug jeweils 10 µl des PCR-Produktes plus 1 µl DNA-Auftragspuffer (5x). DNA-Längenstandards dienten der Größenbestimmung der cDNA-Fragmente. Die Banden wurden nach dem Gellauf unter UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschten Fragmente wurden aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt.

Mittels des QIAQuickGelextraktionskits wurde die cDNA aus der Agarose extrahiert. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstück in dem 3-fachen Volumen des QG-Puffers durch Schütteln bei 50°C mittels Thermoblock vollständig gelöst. Es wurde 250 µl Isopropanol zum Ansatz gegeben, dieser wurde invertiert und anschließend über eine Säule mit 10.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl QG-Puffer, sowie 500 µl PE-Puffer gewaschen. Um den im Puffer enthaltenen Ethanol zu entfernen, wurde die Säule im Anschluss zweimal mit 10.000 U/min für je 1 min zentrifugiert. Die cDNA wurde dann in 20 µl Aqua bidest. eluiert und bei -20°C gelagert.

#### **4.1.3 Ligation**

Insgesamt fanden zwei Klonierungsschritte statt. Zuerst wurden die nach der Gelaufreinigung entstandenen cDNA-Fragmente in den pCR2.1-Vektor kloniert, um die gewünschten Fragmente anschließend durch einen Restriktionsverdau mit sticky ends zu versehen. Diese verdauten Fragmente konnten dann in den psiCheck2-Vektor umkloniert werden.

Die Ligation erfolgte dabei in folgendem Ansatz (20 µl):

6 µl	Wasser (RNase-frei)
5 µl	Vektor-Lösung
2 µl	Ligase-Puffer (10x)
1 µl	T4-Ligase
6 µl	cDNA

Dieser Ansatz wurde jeweils für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **4.1.4 Restriktionsverdau**

Nach Transformation des pCR2.1-Vektors in OneShot TOP10-Zellen (E. coli), wurde dieser mittels Plasmid isolation aufgereinigt und sequenziert. Der erhaltene Vektor mit dem gewünschten cDNA-Fragment, sowie der psiCheck2-Vektor wurden anschließend einem Restriktionsverdau unterzogen, um die für die Ligation der cDNA-Fragmente in den psiCheck2-Vektor passenden Insertionsstellen zu schaffen. Der Verdau der cDNA-Fragmente im pCR2.1-Vektor fand nach folgendem Protokoll statt:

10 µl	Wasser (RNase-frei)
2 µl	Puffer R (10x)
3 µl	XhoI
5 µl	cDNA

Der Verdau des psiCheck2-Vektors fand in folgendem Ansatz (20 µl) statt:

13 µl	Wasser (RNase-frei)
2 µl	Puffer R (10x)
3 µl	XhoI
2 µl	Vektor

Die Ansätze wurden jeweils für 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde sofort die zweite Ligationsreaktion durchgeführt.

#### **4.1.5 Klonierung**

Die Klonierung der Plasmide erfolgte in OneShot TOP10-Zellen (*E. coli*), die während der Experimente auf Eis gelagert wurden. Zu einem Röhrchen *E. coli* wurden 5 µl des verdauten und ligierten Plasmids zugesetzt. Dieses wurde dann für 10 min bei 0°C inkubiert, für 30 sec einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und wieder für 10 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium zum Ansatz gegeben, die Bakterien für 1 h bei 37°C und 100 U/min ankultiviert und schließlich auf Agar-Platten mit 100 mg/l Ampicillin ausgestrichen. Die Kultivierung der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C. Auf den Platten gewachsene Kolonien wurden im nächsten Schritt mit sterilen Zahnstochern gepickt und in 5 ml LB-Medium verbracht. Diese Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 200 U/min kultiviert

#### **4.1.6 Plasmidisolation und -messung**

Um die Plasmide zu isolieren, wurden die kultivierten Bakterien für 10 min bei 4.000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl P1-Puffer aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl des basischen Puffers P2 zugesetzt und die Lösung mehrmals invertiert. Die Lyse wurde nach 2-minütiger Inkubationszeit durch Zugabe von 400 µl des sauren N3-Puffers abgestoppt. Dieser Ansatz wurde vermischt und für 3 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, um die bakteriellen Proteine abzuscheiden. Der Überstand wurde abgenommen und auf eine Säule überführt. Diese wurde für 30 sec bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und die an die Säule gebundene DNA wurde mit 200 µl EndoWash-Puffer und 400 µl DNAWash-Puffer gewaschen. Nach abschließender Zentrifugation bei 13.000 U/min für 30 sec wurde die DNA in 30 µl Aqua bidest. eluiert.

Nach einer 1:25-Verdünnung der Proben wurde die DNA photometrisch gemessen, wobei einer OD von 1 eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt war.

#### **4.1.7 Sequenzierung**

Um die Exaktheit der Sequenz und die richtige Orientierung im Plasmid zu kontrollieren, wurden die isolierten DNA-Proben unter Verwendung des BigDyeDirect Cycle Sequencing Kits sequenziert. Dazu wurde folgender Ansatz (20 µl) hergestellt:

11,72 µl	Wasser (RNase-frei)
4 µl	Puffer (5x)
2 µl	Sequenzier-Mix
1,28 µl	fw-Primer (10 µM)
1 µl	cDNA

Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt:

1. 96°C	1 min
2. 96°C	10 sec
3. 50°C	5 sec
4. 60°C	4 min
Schritt 2-4	30x wiederholen
5. 4°C	

Im Anschluss folgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte, indem 2 µl EDTA (125 mM), 2µl Natriumacetat (3 M) und 50 µl 96 %-iges Ethanol zum Ansatz gegeben wurden. Dieser Ansatz wurde für 15 min unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 6.000 U/min für 30 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und das cDNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes wurde erneut mit 70 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und für 10 min mit 6.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen und die Probe bei 65°C getrocknet. Die Sequenzierung der Proben wurde durch die Core Facility Sequenzierung im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung durchgeführt.

#### **4.2 Mutagenese der Luziferase-Vektoren**

Um die Effekte einer microRNA im Luziferase-Assay zu verifizieren, wurden die erstellten Luziferase-Vektoren innerhalb der Bindestelle der microRNA mittels spezifischer Primer und einer PCR-Reaktion mutiert. Dafür wurde folgender Ansatz (25 µl) vorgelegt:

19,75 µl	Wasser (RNase-frei)
2,5 µl	QuikChange-Lightning-Reaktionspuffer (10x)

0,75 µl	QuikSolution-Reagent
0,5 µl	fw-Primer (20 µM)
0,5 µl	rv-Primer (20 µM)
0,5 µl	dNTP-Mix
0,5 µl	Pfu Turbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
0,5 µl	Luziferase-Vektor

Folgendes PCR-Programm wurde gewählt:

1. 95°C	2 min
2. 95°C	20 sec
3. 60°C	10 sec
4. 68°C	4 min
5. 68°C	5 min
6. 4°C	

Um den nicht mutierten Plasmid-Strang aus dem Ansatz zu entfernen, wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C mit 1 µl des Restriktionsenzym DpnI inkubiert. Nach Transformation des Plasmids in OneShot TOP10-Zellen (*E. coli*) und Anzuchten der entsprechenden Bakterienkulturen, wurden die Plasmide isoliert und sequenziert. Zusammen mit den Wildtyp-Vektoren wurden diese schließlich für den Luziferase-Assay genutzt.

### **4.3 Zellkultur**

Die Osteosarkom-Zelllinie SAOS-2 wurde für die Detektion der Effekte der microRNAs mittels der Luziferase-Assays kultiviert. Bei den SGBS-Zellen handelt es sich um Präadipozyten aus dem viszeralen Fettgewebe von Neugeborenen mit dem Simpsons-Golabi-Behmel-Syndrom. Diese wurden für 14-tägige Differenzierungsversuche mit Vermessung der RNA- und Protein-Expression kultiviert. Die verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 37°C vortemperiert und alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

#### **4.3.1 Kultivierung und Passagierung der Zellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in den entsprechenden Kulturmedien, wie unter 2.9.1 beschrieben bei 37°C und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt. Eine Ausnahme stellen die SGBS-Zellen dar, da diese nach dem Auftauen mit einer Zellzahl von 2.500/cm<sup>2</sup> (laut den Standardprotokollen von Prof. Dr. med. Wabitsch aus Ulm) kultiviert wurden. Bei jedem Mediumwechsel wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

Die Passagierung erfolgte bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % im Verhältnis 1:3. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert, um die Zellen von der Flasche zu lösen. Die Trypsin-Reaktion wurde unter Zugabe von Kultivierungsmedium abgestoppt, die Zell-Suspension wurde in ein Greiner-Röhrchen überführt und durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1.000 U/min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet wurde in frischem Medium aufgelöst und in entsprechendem Verhältnis in neue Zellkulturflaschen eingestreut. Alle Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des PCR Mycoplasma Test Kits auf Mykoplasmen kontrolliert.

#### **4.3.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Die Kryokonservierung erfolgte durch Einfrieren der Zellen nach der Trypsinierung. Nach Zentrifugation (5 min bei 1.000 U/min) und Pelletierung der Zell-Suspension wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 1,6 ml Gefriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte für 24 h bei -20°C, für weitere 24 h bei -80°C und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff.

Um die Zellen in Kultur aufzunehmen, wurden die Kryoröhrchen rasch bei Raumtemperatur erwärmt. Der Inhalt wurde in 10 ml Medium aufgenommen, für 5 min bei 1.000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in Medium gelöst und in sterile Zellkulturflaschen überführt.

#### **4.3.3 Einstreuen der SAOS-2-Zellen mit definierter Zellzahl**

Die SAOS-2-Zellen wurden für die Transfektionsversuche bei einer Konfluenz von 80 % mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen/well in eine 96-well-Platte eingestreut. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde unter Zugabe von Kultivierungsmedium abgestoppt, die Zell-Suspension wurde in ein Greiner-Röhrchen überführt und durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1.000 U/min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet wurde je nach Größe in einer bestimmten Menge Medium aufgelöst. Die Zellzahl wurde mit 10 µl Tryphanblau am Zellzahlmessgerät bestimmt. Das entsprechende Volumen für die gewünschte Zellzahl wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Volumen } [\mu\text{l}] = \frac{\text{gewünschte Zellzahl/ml} \times \text{Gesamtvolumen } [\mu\text{l}]}{\text{gemessene Zellzahl/ml}}$$

Das errechnete Volumen für die gewünschte Zellzahl wurde aus der Zellsuspension entnommen und zusammen mit dem Gesamtvolumen, welches aus dem Medium entnommen



wurde in einer Petri-Schale vermischt. Aus diesem Gemisch wurden 200 µl pro Well eingestreut.

#### 4.3.4 Differenzierung der SGBS-Zellen

Für die Differenzierungsversuche wurden die SGBS-Zellen wie in 3.3.1 beschrieben in 175 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen eingestreut, kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 % abtrypsiniert und pelletiert. Anschließend wurde das erhaltene Pellet in Medium resuspendiert und mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen pro Flasche auf 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen aufgeteilt und für weitere 3 bis 4 Tage kultiviert. Das einzusetzende Volumen für die gewünschte Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumen } [\mu\text{l}] = \frac{250.000 \times \text{Gesamtvolumen } [\mu\text{l}]}{\text{gemessene Zellzahl}}$$

Am Tag 0 erfolgte die adipogene Differenzierung durch Abnahme des Kultivierungsmediums, Waschen mit PBS und Zugabe des Differenzierungsmediums. Dieses wurde für 4 Tage auf den Zellen belassen und an Tag 4 durch das 3FC-Medium ausgetauscht. Die Kultivierung wurde für weitere 10 Tage durchgeführt. Bei einem Teil der Zellen wurde zeitgleich ab Tag 0 die Differenzierung unter Zugabe von 100 nM Testosteron, bei einem weiteren Teil unter Zugabe von 30 nM Dihydrotestosteron eingeleitet. Die 14-tägige Differenzierung wurde an definierten Zeitpunkten durch abtrypsinieren und pelletieren der Zellen abgestoppt, um die RNA- und Protein-Expression der Zellen während der adipogenen Differenzierung zu vermessen.

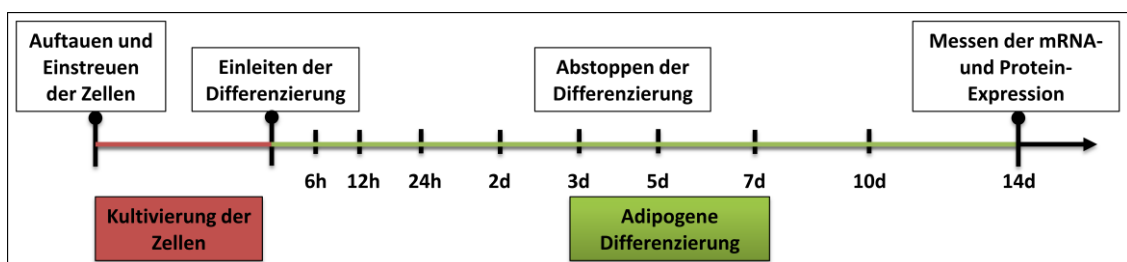


Abbildung 4: Versuchsaufbau der adipogenen Differenzierung der SGBS-Zellen.

#### 4.4 Transfektionsversuche

Um mit Hilfe der Luziferase-Assays Effekte der untersuchten microRNAs zu detektieren, wurden SAOS-2-Zellen mit psiCheck2-Vektoren, die ein die putative Bindestelle der microRNA enthaltendes Fragment aus dem 3'UTR der mRNA des Zielgens enthalten, sowie mit microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotiden transfiziert. Die Transfektion erfordert zwei verschiedene Methoden, die im Folgenden aufgeführt sind.

#### **4.4.1 Transfektion der Luziferase-Vektoren**

Zur Transfektion der Luziferase-Vektoren wurde FuGene HD Transfection Reagent genutzt. Für die Transfektion eines Wells einer 96-well-Platte wurde folgender Ansatz (175  $\mu$ l) gemischt:

9,24 $\mu$ l	serumfreies DMEM high glucose Medium
0,8 $\mu$ l	FuGene-Reagenz
0,16 $\mu$ l	Vektor

Der Ansatz wurde gevortext und für 15 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen abgenommen und gegen serumfreies DMEM high glucose Medium getauscht. Nach Inkubation wurde das Transfektionsgemisch dazugegeben.

#### **4.4.2 Transfektion der microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotide**

Die Transfektion von microRNA-sequenzgleichen Oligonukleotiden erfolgte mithilfe des Transfektionskits Interferin. Die Nukleotide wurden jeweils in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Für die Transfektion eines Wells einer 96-well Platte wurde folgender Ansatz (50  $\mu$ l) gewählt:

47,325 $\mu$ l	serumfreies DMEM high glucose Medium
2,5 $\mu$ l	Interferin
0,175 $\mu$ l	Oligonukleotid

Der Ansatz wurde gevortext und für 20 min inkubiert. Anschließend wurde dieses Transfektionsgemisch auf die vorher mit Luziferase-Vektoren transfizierten Zellen gegeben. Nach 24 stündiger Inkubation der Transfektionsansätze erfolgte die Vermessung der microRNA-Effekte mittels Luziferase-Assay.

#### **4.5 Luziferase-Assay**

Es wurden mehrere Luziferase-Assays durchgeführt, um putative Ziel-Gene einer microRNA in vitro nachzuweisen. Dazu wurde im Vorfeld wie in 3.1 beschrieben ein die putative Bindestelle enthaltendes Fragment aus dem 3'UTR der mRNA des Zielgens in einen Luziferase-Vektor (psiCheck2) kloniert.

Im ersten Schritt wurden SAOS-2 Zellen mit einer definierten Zellzahl in 96-well-Platten eingestreut und über 24 h im Kultivierungsmedium angezchtet. Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben mit dem Luziferase-Vektor transfiziert. Nach 20 minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen außerdem wie in Abschnitt 3.4.2 mit microRNA-

sequenzgleichen Oligonukleotiden oder mit Anti-miR Negativ-Kontrollen kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h kultiviert und anschließend auf ihre Luziferase-Aktivität vermessen.

Dazu wurde der Dual-Glo Luziferase-Assay Kit verwendet. Zu Beginn wurden je 50 µl Firefly-Substrat pro well auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Firefly-Luziferase-Aktivität (Kontrollgen) bei Raumtemperatur mit Hilfe des Plattenreaders GENios vermessen. Anschließend wurde eine Substrat-Lösung zur Inhibition der Firefly-Luziferase-Aktivität und zur Vermessung der Aktivität der Renilla-Luziferase (Reportergen) hergestellt, indem 49,5 µl Puffer und 0,5 µl Renilla-Substrat pro well vermischt wurden. Nach erneuter Inkubation von 10 min erfolgte eine zweite Messung am Plattenreader GENios bei Raumtemperatur. Die beiden Werte wurden dann in Beziehung gesetzt, um die relative Luziferase-Aktivität zu bestimmen.

#### **4.6 mRNA- und microRNA-Expressionsanalysen**

Für die Analyse der mRNA- und microRNA-Expression ist eine sorgfältige Aufreinigung der zu untersuchenden RNA aus den SGBS-Zellen und eine spezifische Umschreibung in cDNA erforderlich. Im Folgenden werden die verwendeten Methoden erläutert.

##### **4.6.1 RNA-Isolation und -messung**

Die Isolation der mRNA bzw. microRNA erfolgte mittels TRIzol-Reagenz gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dazu wurden im Vorfeld die Zellen abtrypsiniert und durch Zentrifugation bei 1.000 U/min für 5 min pelletiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 700 µl Trizol-Reagenz resuspendiert, in PhaseTrap A-Tubes überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugefügt. Dieser Ansatz wurde manuell für 2 min vermischt und für 10 min bei 4°C mit 13.000 U/min zentrifugiert. Die so entstandene obere wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und mit einem DNase-Gemisch aus 35 µl RDD-Puffer und 5 µl RNase-freier DNase für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 1 µl einer Glykogen-Verdünnung (5 µg) und 500 µl Isopropanol zugesetzt. Dieser Ansatz wurde ausgiebig gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Ansatz für 10 min bei 4°C mit 13.000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das erhaltende RNA-Pellet wurde mit 700 µl eiskaltem 96 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C mit 13.000 U/min für 10 min und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet noch einmal mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und schließlich an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde dann in 15 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Nach einer 1:25-Verdünnung der Proben wurde die RNA photometrisch gemessen, wobei eine OD von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml zugrunde gelegt war.

#### **4.6.2 cDNA-Synthese zur mRNA-Expressionsanalyse**

Die cDNA-Synthese der mRNA erfolgte mittels des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits. Es wurde je 1 µg RNA für die Reaktion eingesetzt. Das benötigte Volumen wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Volumen für 1 } \mu\text{g RNA} = \frac{1.000 \text{ ng RNA}}{c \text{ (ng/}\mu\text{l)}}$$

Der Pre-Annealing-Mix (11 µl) setzt sich folgendermaßen zusammen:

x µl	RNA (1 µg)
1 µl	random-Primer (0,2 µg/µl)
ad 10 µl	Wasser (RNase-frei)

Dieser Mix wurde bei 65°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde hinzugefügt:

4 µl	RT-Buffer (5x)
2 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	RNase-Inhibitor (20 U/µl)
1 µl	RevertAid H Reverse Transcriptase (200 U/µl)
1 µl	Wasser (RNase-frei)

Für die Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

1. 25°C	10 min
2. 42°C	60 min
3. 85°C	10 min
4. 4°C	

Nach der Synthese wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

#### **4.6.3 cDNA-Synthese zur microRNA-Expressionsanalyse**

Zur Synthese von cDNA aus microRNAs wurden stem-loop-Primer verwendet, die nur eine spezifische microRNA amplifizieren. Diese wurden von der Firma Applied Biosystems synthetisiert und zusammen mit den entsprechenden TaqMan-Primern geliefert. Mithilfe der folgenden Formel wurde eine 2 ng/µl-Verdünnung der RNA hergestellt:

$$\text{Volumen für } 2 \text{ ng}/\mu\text{l microRNA} = \frac{2 \text{ ng}}{c \text{ (ng}/\mu\text{l)}} \times 100 \mu\text{l}$$

Folgender Ansatz (15  $\mu\text{l}$ ) mit insgesamt 10 ng RNA-Verdünnung wurde hergestellt:

4,12 $\mu\text{l}$	Wasser (RNase-frei)
3,3 $\mu\text{l}$	RT-Buffer (5x)
1,5 $\mu\text{l}$	stem-loop-Primer
0,7 $\mu\text{l}$	RevertAid H Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ )
0,21 $\mu\text{l}$	RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ )
0,17 $\mu\text{l}$	dNTPs (10 mM)
5 $\mu\text{l}$	RNA-Verdünnung (2ng/ $\mu\text{l}$ )

Für die cDNA-Synthese wurde folgendes Programm gewählt:

1. 16°C	30 min
2. 42°C	30 min
3. 85°C	5 min
4. 4°C	

Die synthetisierte miR-cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### **4.6.4 Quantitative real-time-PCR**

Je nach Fragestellung wurden zwei verschiedene Methoden der quantitativen real-time-PCR gewählt. Zur Vermessung der mRNA-Expression wurde der Maxima SyBrGreen Master Mix verwendet und folgender Ansatz (15  $\mu\text{l}$ ) vorgelegt:

7,5 $\mu\text{l}$	SyBrGreen Master Mix (2x)
5,5 $\mu\text{l}$	Wasser (RNase-frei)
0,5 $\mu\text{l}$	fw-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	rv-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
1 $\mu\text{l}$	cDNA

Der Ansatz wurde mittels folgenden Programmes im Real-Time Cycler vermessen:

1. 95°C	15 min
2. 95°C	20 sec
3. 60°C	30 sec

4. 72°C	30 sec
Schritt 2-4	40x wiederholen
5. Melt	

Die Quantifizierung der microRNA-Expression wurde mittels TaqMan-Primer durchgeführt. Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz (15 µl) gewählt:

9,85 µl	Wasser (RNase-frei)
1,5 µl	Puffer (10x)
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,75 µl	TaqMan-Primer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	Hot FIREPol DNA Polymerase
1 µl	cDNA

Folgendes Programm wurde zur Vermessung des Ansatzes verwendet:

1. 95°C	15 min
2. 95°C	30 sec
3. 60°C	60 sec
Schritt 2, 3	40x wiederholen

Die Auswertung der mRNA- sowie der microRNA-Expression erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen, 2001). Es handelt sich dabei um eine relative Quantifizierung mittels des Vergleichs der  $C_T$ -Werte der zu untersuchenden mRNA bzw. microRNA mit den  $C_T$ -Werten eines Referenzgens bzw. einer Referenz-microRNA. Als Referenz diente GAPDH bzw. die U18-snoRNA. Die  $\Delta\Delta C_T$ -Werte errechneten sich mithilfe der folgenden Formel:

$$\Delta\Delta C_T = 2^{-(C_T(\text{Gen}) - C_T(\text{Referenz})) - ((C_T(\text{Kalibrator}) - C_T(\text{Referenz}))}$$

Der Kalibrator entspricht der Referenzprobe mit dem niedrigsten  $C_T$ -Wert. Der  $C_T$ -Wert gibt die Anzahl der Zyklen an, bei der die Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht.

#### 4.7 Protein-Expressionsanalyse

Zur Beurteilung der Protein-Expression ist eine Isolation aus den SGBS-Zellen, sowie eine Vermessung und Auftragung der Proben notwendig. Die dafür verwendeten Methoden werden im Folgenden beschrieben.

#### **4.7.1 Protein-Isolation und –messung**

Die Protein-Isolation erfolgte mittels RIPA-Puffer. Dazu wurden im Vorfeld die Zellen abtrypsiniert und durch Zentrifugation bei 1.000 U/min für 5 min pelletiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 30 µl RIPA-Puffer (versetzt mit 1 % Protease-Inhibitor) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 13.000 U/min wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen, in ein neues Tube überführt und bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Reagenz. Dazu wurden 398 µl einer 1:5 Verdünnung (80 % Bradford-Reagenz, 20 % Aqua bidest.) hergestellt, 15 min bei 4°C inkubiert und schließlich 2 µl der zu vermessenden Probe zugesetzt. Die Bestimmung erfolgte am Eppendorf-Photometer mit einer zuvor aufgenommenen Standardkurve bei einer Extinktion von 595 nm.

#### **4.7.2 Western-Blot-Analyse**

Durch den Western-Blot können Veränderungen im Gehalt eines Proteins aufgezeigt werden. Dazu werden die zu vermessenden Proben im Vorfeld mit Ladepuffer versetzt. Ein Probenansatz für 20 µg Gesamtprotein setzt sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	LDS Sample Buffer (4x)
1,0 µl	Sample Reducing Agent (10x)
x µl	Proteinprobe (20 µg)
ad 10 µl	Wasser (RNase-frei)

Der 10 µl Ansatz wurde für 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben zusammen mit 6 µl eines Protein-Molekulargewichtsstandards auf ein 4-12 %-iges Bis-Tris-Gradienten-Gel aufgetragen und in einem elektrischen Feld von 200 V und 125 mA für 1,5 h bei 4°C mittels MES-Laufpuffer aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden dann mittels Tank-Blot auf eine PVDF-Membran überführt. Diese Membran wurde vorher mit Methanol aktiviert und mit Aqua bidest. gewaschen. Der Transfer erfolgte mit Transferpuffer bei einer Stromstärke von 300 mA und einer Spannung von 200 V für 2 h bei 4°C. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h mit einer Magermilch-Suspension aus 10 % Milchpulver und TBS-T inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation eines primären Antikörpers in einer geeigneten Verdünnung mit 10 %-iger Magermilch-Suspension bei 4°C über Nacht. Nach einem 2-maligen Waschschrift mit TBS-T und einem 1-maligen Waschschrift mit 1x TBS für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers in Verdünnung mit einer 10 %-igem Milchpulver-Suspension für 1 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte ein zweiter Waschschrift mit TBS-T und 1x TBS wie oben beschrieben. Die

Proteinbanden des gesuchten Proteins wurden mittels ECL-Reagenz auf einem photoempfindlichen Film detektiert. Dazu wurde die Membran in der Dunkelkammer in einer 1:1 Verdünnung aus Luminol Enhancer Solution und Peroxide Solution inkubiert und der Röntgenfilm wurde durch die Chemilumineszenz belichtet. Nach entsprechender Belichtungsdauer wurde dieser entwickelt und fixiert und mittels des aufgetragenen Größenmarkers konnte das Molekulargewicht des Proteins bestimmt werden.

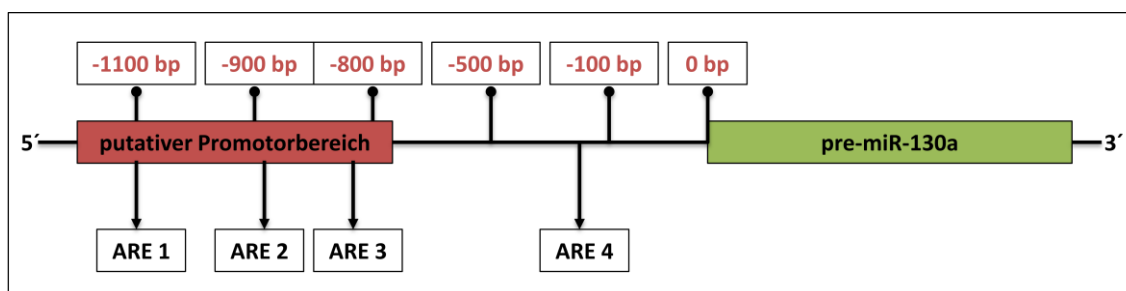
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Androgen-abhängige microRNA-Expression

Androgene gehören zu den Steroidhormonen, welche lipophile Eigenschaften aufweisen und deshalb die Zellmembran durchwandern können. In den Zellen wirken sie aufgrund dieser Eigenschaften vor allem intranukleär, auf DNA-Ebene, indem sie über sogenannte Androgen-responsive Elemente (ARE) im Promotorbereich bestimmter Gene binden und somit deren Expression verändern. Auch im Promotorbereich einiger microRNAs konnten diese Elemente nachgewiesen werden, sodass auch die microRNA-Expression durch Androgene gesteuert werden kann. Eine Androgen-abhängige Expression des microRNA-Clusters-130/301 ist bis dato nicht untersucht.

#### 5.1.1 *microRNA-Cluster-130/301-Expression unter Androgensubstitution*

Um eine mögliche Androgen-abhängige Regulation der miR-130a als Teil des microRNA-Clusters-130/301 nachzuweisen, wurde die Genumgebung der microRNA mittels NCBI auf Sequenzen bereits bekannter ARE überprüft. Bei den durchgeführten in-silico-Analysen fanden sich vor der stem-loop-Sequenz der miR-130a mehrere Sequenzen (5'-TGTCCT-3'), die nach Dai und Burnstein als ARE identifiziert wurden (Dai und Burnstein; 1996).

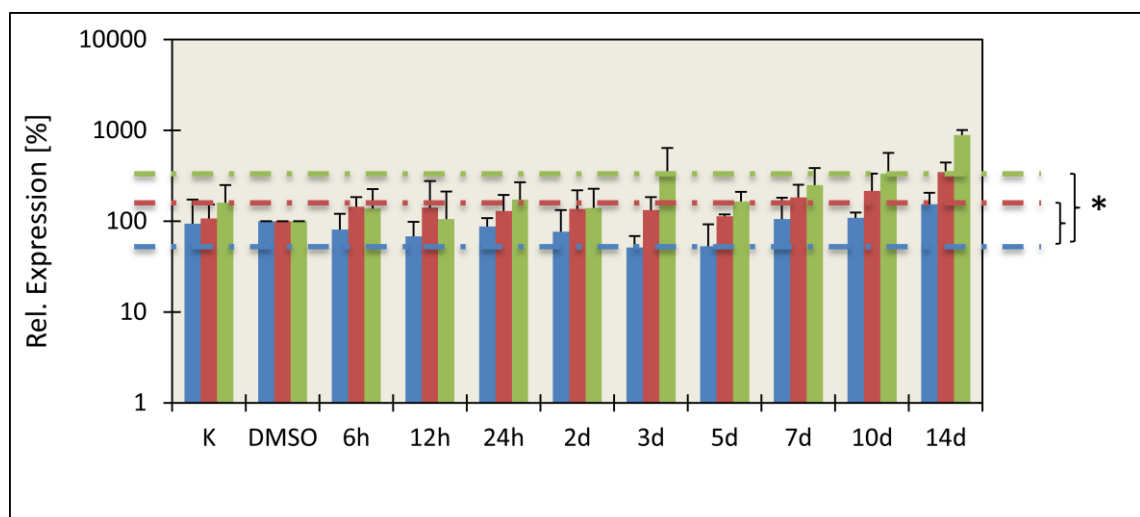


**Abbildung 5:** Androgen-responsive Elemente im putativen Promotorbereich der miR-130a.

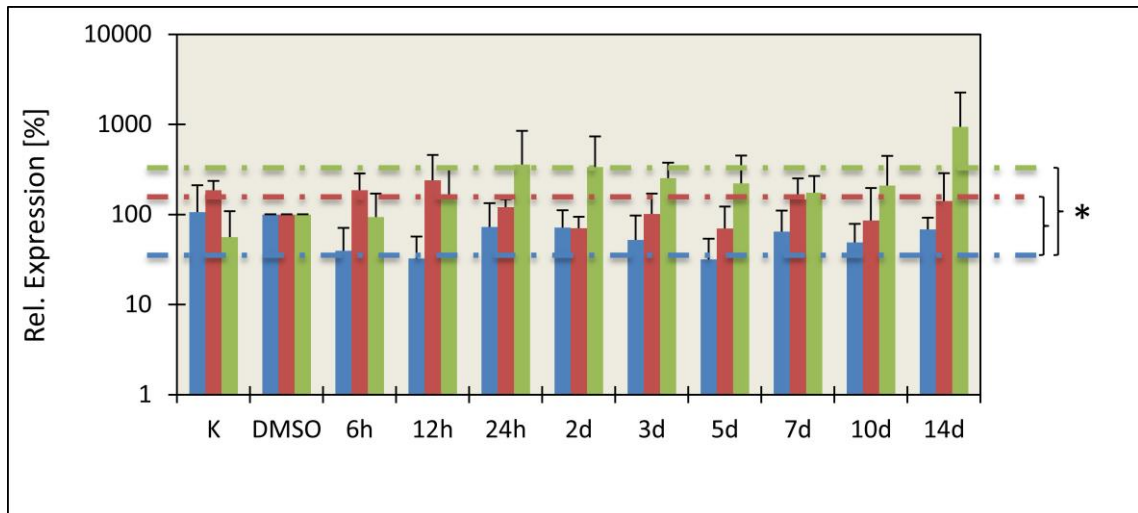
Da die durchgeführten Untersuchungen lediglich auf mögliche Androgen-responsive Elemente hindeuten, eine androgen-abhängige Regulation der microRNA jedoch nicht bestätigen können, wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR die Expression des microRNA-Clusters-



130/301 in SGBS-Zellen sowohl ohne Androgenzugabe als auch unter Androgensubstitution gemessen. In den SGBS-Prädipozyten wurde die adipogene Differenzierung durch Zugabe eines Differenzierungsmediums (ADM) eingeleitet. Außerdem wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit 100 nM Testosteron (T) und 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) behandelt. Die Differenzierung wurde an ausgewählten Zeitpunkten abgestoppt, um die Expression der miRs zu vermessen. Sowohl für die miR-130a als auch für die miR-301 ist mit 87 % bzw. 54 % im Vergleich zur 100 % DMSO-Kontrolle eine konstant niedrige Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung zu sehen. Unter Zugabe von Testosteron ist für die miR-130a eine signifikante Erhöhung der Expression um 85 % ( $p=0,01$ ), für die miR-301 eine signifikante Erhöhung um 75 % ( $p=0,001$ ) im Vergleich zur Expression ohne Testosteronsubstitution zu erkennen. Nach Behandlung mit Dihydrotestosteron zeigt sich sogar eine signifikante Erhöhung der Expression um 193 % für die miR-130a ( $p=0,03$ ) und um 252 % für die miR-301 ( $p=0,01$ ) im Vergleich zur adipogenen Differenzierung ohne DHT-Zugabe.



**Abbildung 6:** microRNA-130a-Expression in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (blau), sowie mit Zugabe von 100 nM Testosteron (rot) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (grün). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf die mit DMSO (Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel der verwendeten Hormone) behandelten Zellen. Die gestrichelten Linien stellen die Mittelwerte der microRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung +/- Androgensubstitution dar. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit der U18-snoRNA als Referenz. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test).



**Abbildung 7:** microRNA-301-Expression in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (blau), sowie mit Zugabe von 100 nM Testosteron (rot) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (grün). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf die mit DMSO (Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel der verwendeten Hormone) behandelten Zellen. Die gestrichelten Linien stellen die Mittelwerte der microRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung +/- Androgensubstitution dar. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit der U18-snoRNA als Referenz. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine Androgen-abhängige Zunahme der Expression der miR-130a sowie der miR-301 während der adipogenen Differenzierung in SGBS-Prädipozyten hin. Um die Effekte der miR-130a während der Adipogenese zu untersuchen, wurden anschließend putative Targetgene selektiert und verifiziert.

## 5.2 Identifikation Adipogenese-assoziiierter Zielgene des microRNA-Clusters-130/301

Die Adipogenese ist die Entwicklung einer mesenchymalen Stammzelle zu einem reifen Adipozyten. Dieser Prozess gliedert sich in zwei Teilphasen, der Determination der mesenchymalen Stammzelle zur adipogenen Differenzierungslinie, sowie der Differenzierung des Prädipoyzten zum reifen Adipozyten. Diese Entwicklung wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren und Regulatorproteine gesteuert. Um einen Effekt der miR-130/301 während der Adipogenese zu zeigen, haben wir durch in silico- und in vitro-Analysen Zielgene der microRNA identifiziert, die für die Regulation der Adipogenese und die Funktion der reifen Adipozyten eine entscheidende Rolle spielen.

### 5.2.1 In silico Identifizierung von Targetgenen des microRNA-Clusters-130/301

Mithilfe verschiedener Internet-Suchmaschinen können in-silico Targetgene für ausgewählte microRNAs identifiziert werden. Die Auswahl durch die entsprechenden Algorithmen erfolgt dabei anhand der Übereinstimmung einer Sequenz im 3'-UTR der mRNA des Targetgens zur „seed“-Sequenz der ausgewählten microRNA sowie durch weitere Parameter, die eine Bindung

der miR wahrscheinlich machen. Mittels der Suchalgorithmen „Targetscan“ (www.targetscan.org, release 4.2, 2011), „PicTar“ (www.pictar.org, Version 2007) und „miRanda“ (www.microrna.org, release August 2010) sollten putative Targetgene des microRNA-Clusters-130/301 selektiert und nachfolgend verifiziert werden.

**Tabelle 9:** Putative Targetgene des microRNA-Clusters-130/301 bei verschiedenen Suchalgorithmen

<b>Gensymbol</b>	<b>Genname und Beschreibung</b>	<b>TargetScan context score</b>	<b>PicTar context score</b>	<b>miRanda</b>
<b>AR</b>	androgen receptor (dihydrotestosterone receptor; testicular feminization; spinal and bulbar muscular atrophy; Kennedy disease)	-0,12	-	-0,077
<b>AdipoQ</b>	adiponectin	-	-	-0,3506
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	peroxisome proliferator- activated receptor gamma	-0,34	-	-0,8807
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor alpha	-0,38	-	-1,1947
<b>Leptin</b>	leptin	-	-	-0,0596
<b>ARHGEF-12</b>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	-0,29	1,63	-0,3088
<b>RASD-1</b>	RAS, dexamethasone-induced 1	-0,27	3,24	-0,7642

### **5.2.2 Verifizierung der putativen Targetgene des microRNA-Clusters-130/301**

Nicht jedes durch in silico-Analysen identifizierte Zielgen einer microRNA wird auch in vitro und in vivo durch diese reguliert. Deshalb ist eine Verifizierung der putativen Zielgene notwendig. Mittels Luziferase-Assays sollten die Effekte der miR-130a als Teil des microRNA-Clusters-130/301 auf AR, AdipoQ, Leptin, PPAR- $\gamma$ , ARHGEF-12, RASD-1 und TNF- $\alpha$  untersucht werden. Im Vorfeld wurden deshalb Wildtyp-Vektoren kloniert, welche den 3'UTR-Bereich der mRNA des Zielgens enthalten. An diesen 3'UTR-Bereich kann die miR mithilfe ihrer „seed“-Sequenz binden und die Genexpression regulieren. Diese konservierte Hexanukleotid-Sequenz am 5'-Ende der microRNA ist komplementär zu ihrer jeweiligen Bindesequenz im 3'UTR-Bereich der mRNA und somit maßgeblich für die spezifische Bindung an die jeweiligen Targets verantwortlich (Krek et al., 2005). Um die Spezifität dieser microRNA-Bindung nachzuweisen, wurde die 3'UTR des Wildtyp-Vektors durch einen Basenaustausch mutiert (Hill et al., 2014).

### 5.2.2.1 Luziferase-Assays

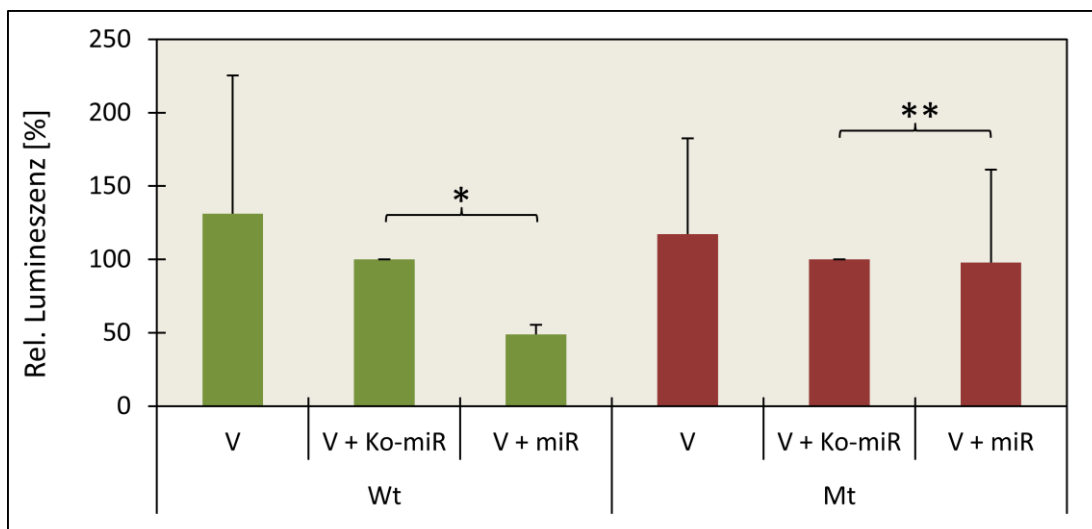
Der Luziferase-Assay dient dem Nachweis der RNA-Interferenz in vitro. Mittels TargetScan wurden im Vorfeld die putativen Bindungsstellen der miR-130a in der 3'UTR der mRNA von AR, AdipoQ, Leptin, PPAR- $\gamma$ , ARHGEF-12, RASD-1 und TNF- $\alpha$  lokalisiert. Diese zur „seed“-Sequenz der microRNA komplementären Bindungsstellen wurden jeweils als Wildtyp-Form und in mutierter Form in die „multiple cloning site“ eines psiCheck2-Vektors kloniert. Durch diese Klonierung entsteht ein Fusionsgen aus Renilla-Luziferase und dem zu untersuchenden Targetgen. Dieses Reporterkonstrukt wurde in SAOS-2-Zellen transfiziert und anschließend mit der miR-130a kotransfiziert. 24 Stunden nach dieser Behandlung wurde die Luziferase-vermittelte Lumineszenz vermessen.

**Tabelle 10:** Klonierte Sequenzen der Reporterkonstrukte

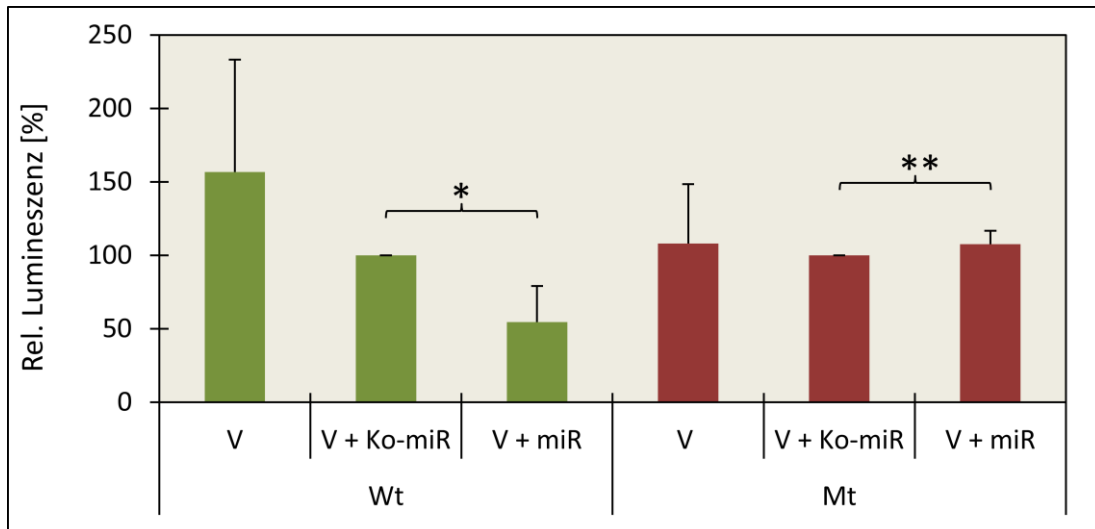
Putatives Targetgen	mRNA-Sequenz 5' → 3'	Bindesequenz der miR-130a 5' → 3'	Mutierte Bindesequenz 5' → 3'
AR	NM_000044.3 Position 3871 - 4235	TGCACT Position 3949 - 3954	<u>T</u> CACT (G→A)
AdipoQ	NM_004797.2 Position 1399 - 1714	TGCACT Position 1433 - 1438	<u>T</u> CACT (G→A)
PPAR- $\gamma$	NM_13811 Position 1367 - 1780	TTGCACT Position 1750 - 1756	<u>T</u> CGCACT (T→C)
TNF- $\alpha$	NM_000594 Position 1118 - 1601	TTGCACT Position 1322 - 1328	<u>T</u> CGCACT (T→C)
Leptin	NM_000230.2 Position 2265 - 2844	TTGCACT Position 2432 - 2438	<u>T</u> CGCACT (T→C)
ARHGEF-12	NM_015313.2 Position 5650 - 5945	TGCACT Position 5795 - 5800	<u>C</u> GCACT (T→C)
RASD-1	NM_016084.4 Position 1428 - 1690	TTGCACT Position 1604 - 1610	<u>T</u> CGCACT (T→C)

Im Vergleich zu den mit Wildtyp-Vektor (Wt) und Kontroll-miR kotransfizierten SAOS-2-Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen Lumineszenz (Luziferase-Aktivität) in den mit Wildtyp-Vektor und miR-130a transfizierten Zellen für AR um 38 % ( $p = 0,0002$ ), für AdipoQ um 39% ( $p = 0,03$ ) und für TNF- $\alpha$  um 24 % ( $p = 0,02$ ). Für das transfizierte Wt-Reporterkonstrukt von PPAR- $\gamma$  zeigte nach Zugabe der miR-130a zwar eine Abnahme der

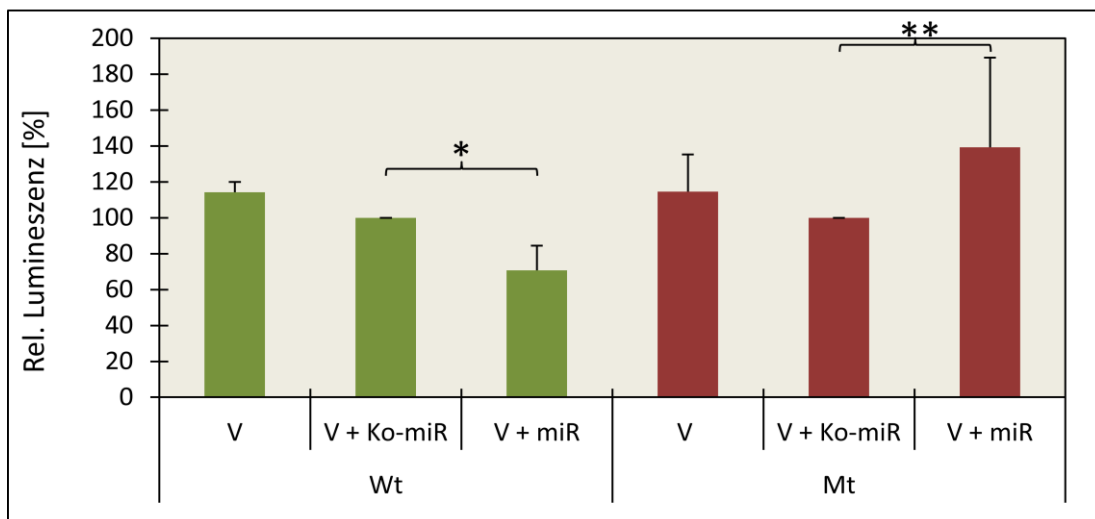
Lumineszenz um 25 % im Vergleich zur Kontroll-miR, diese war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,07$ ). Nach Kotransfektion der mutierten Vektoren (Mt) von AR, AdipoQ, PPAR- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und der miR-130a war keine signifikante Veränderung der Lumineszenz zu erkennen. Der transfizierte Wildtyp-Vektor von Leptin hingegen zeigte nach Zugabe der miR-130a eine signifikante Zunahme der Lumineszenz um 48 % im Vergleich zur Kontroll-miR ( $p = 0,01$ ), der mutierte Vektor zeigte nach miR-Zugabe keine Lumineszenz-Veränderung. Die transfizierten Reporterstrukture für ARHGEF-12 zeigten nach Zugabe der miR-130a im Vergleich zur Kontroll-miR weder bei den Wildtyp-Vektoren noch bei den mutierten Vektoren signifikante Lumineszenz-Veränderungen. Für RASD-1 zeigte sich keine Veränderung der Lumineszenz in Bezug auf die Wildtyp-Vektoren, jedoch zeigte das mutierte Reporterkonstrukt nach Zugabe der miR-130a eine signifikante Zunahme der Lumineszenz um 20 % im Vergleich zur Kontroll-miR ( $p = 0,0005$ ).



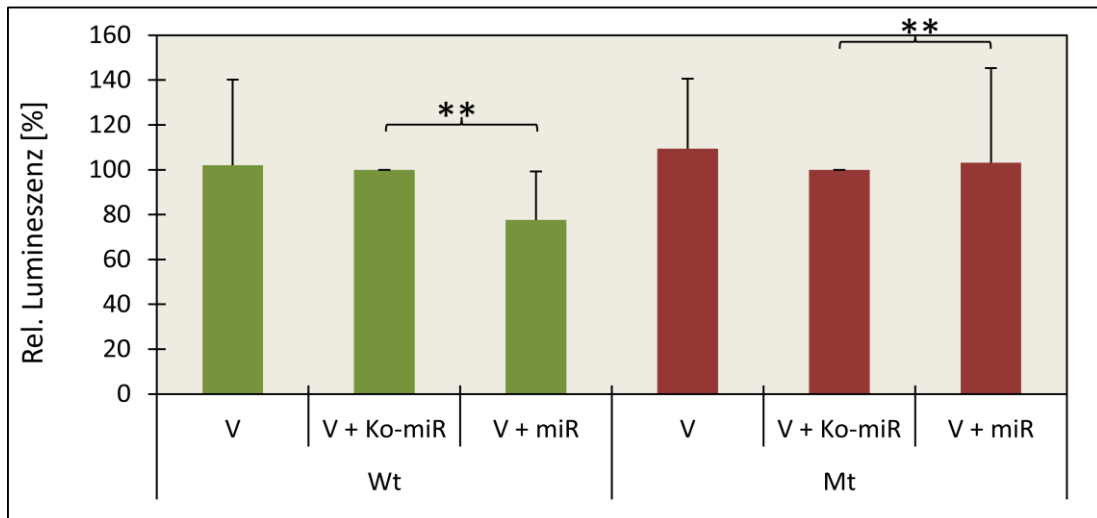
**Abbildung 8:** Luziferase-Assay mit den transfizierten Reporterkonstrukten für AR nach Kotransfektion mit der miR-130a (miR). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf das Reporterkonstrukt (V) mit transfizierter Kontroll-miR (Ko-miR). Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test). Wt = Wildtyp-Vektor, Mt = mutierter Vektor



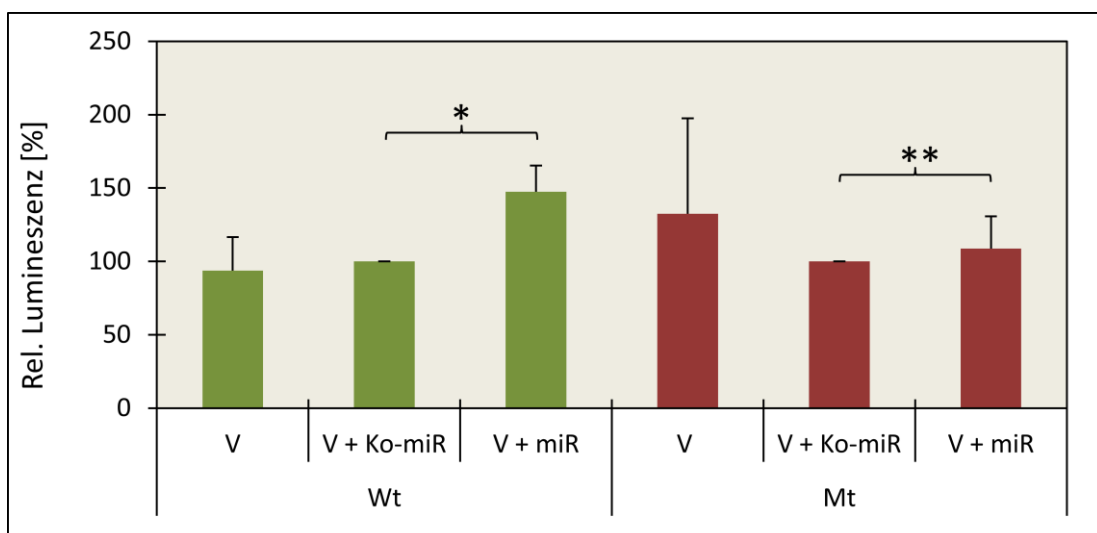
**Abbildung 9:** Luziferase-Assay mit den transfizierten Reporterkonstrukten für AdipoQ nach Kotransfektion mit der miR-130a (miR). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf das Reporterkonstrukt (V) mit transfizierter Kontroll-miR (Ko-miR). Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test). Wt = Wildtyp-Vektor, Mt = mutierter Vektor



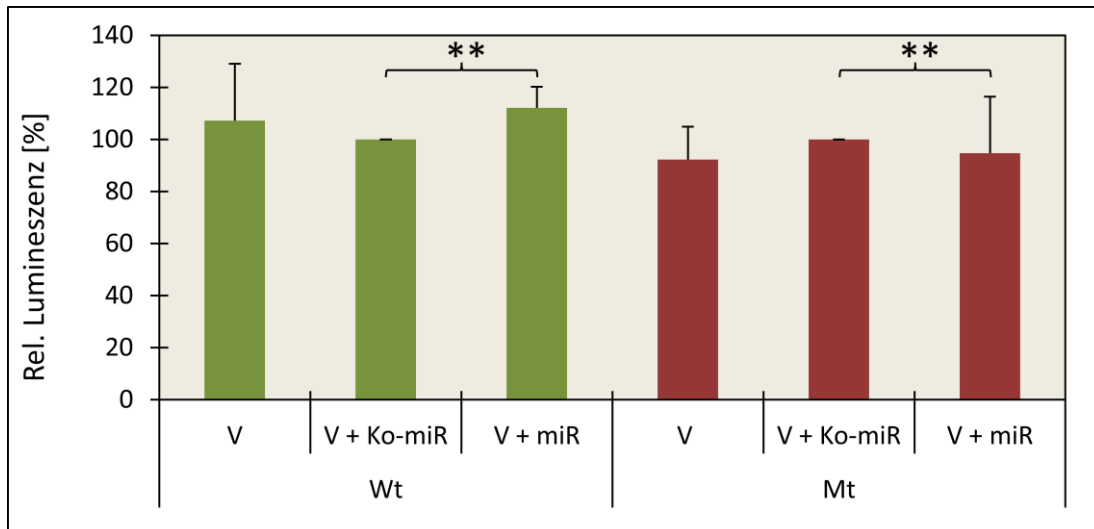
**Abbildung 10:** Luziferase-Assay mit den transfizierten Reporterkonstrukten für TNF- $\alpha$  nach Kotransfektion mit der miR-130a (miR). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf das Reporterkonstrukt (V) mit transfizierter Kontroll-miR (Ko-miR). Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test). Wt = Wildtyp-Vektor, Mt = mutierter Vektor



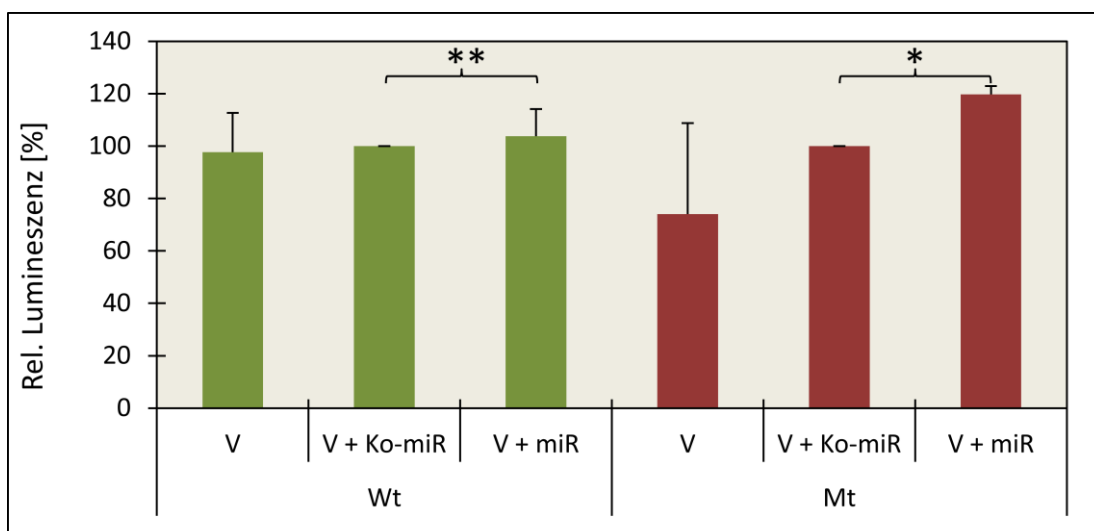
**Abbildung 11:** Luziferase-Assay mit den transfizierten Reporterkonstrukten für PPAR- $\gamma$  nach Kotransfektion mit der miR-130a (miR). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf das Reporterkonstrukt (V) mit transfizierter Kontroll-miR (Ko-miR). Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test). Wt = Wildtyp-Vektor, Mt = mutierter Vektor



**Abbildung 12:** Luziferase-Assay mit den transfizierten Reporterkonstrukten für Leptin nach Kotransfektion mit der miR-130a (miR). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf das Reporterkonstrukt (V) mit transfizierter Kontroll-miR (Ko-miR). Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test). Wt = Wildtyp-Vektor, Mt = mutierter Vektor



**Abbildung 13:** Luziferase-Assay mit den transfizierten Reporterkonstrukten für ARHGEF-12 nach Kotransfektion mit der miR-130a (miR). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf das Reporterkonstrukt (V) mit transfizierter Kontroll-miR (Ko-miR). Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test). Wt = Wildtyp-Vektor, Mt = mutierter Vektor



**Abbildung 14:** Luziferase-Assay mit den transfizierten Reporterkonstrukten für RASD-1 nach Kotransfektion mit der miR-130a (miR). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf das Reporterkonstrukt (V) mit transfizierter Kontroll-miR (Ko-miR). Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test). Wt = Wildtyp-Vektor, Mt = mutierter Vektor

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die miR-130a als Teil des microRNA-Clusters-130/301 die Translation von AR, AdipoQ und TNF- $\alpha$  über eine spezifische Bindung an die 3'UTR der mRNA regulieren kann. Auf die Translation von PPAR- $\gamma$  zeigt sie jedoch keinen signifikanten Effekt. Leptin, ARHGEF-12 und RASD-1 können mithilfe dieser Assays nicht als Zielgene der miR-130a validiert werden. Weiterhin zeigen diese Untersuchungen auch, dass die translationale Wirkung der microRNAs durch gezielte Punktmutationen im Bereich der Bindesequenz im 3'UTR des Gens unterdrückt werden kann.



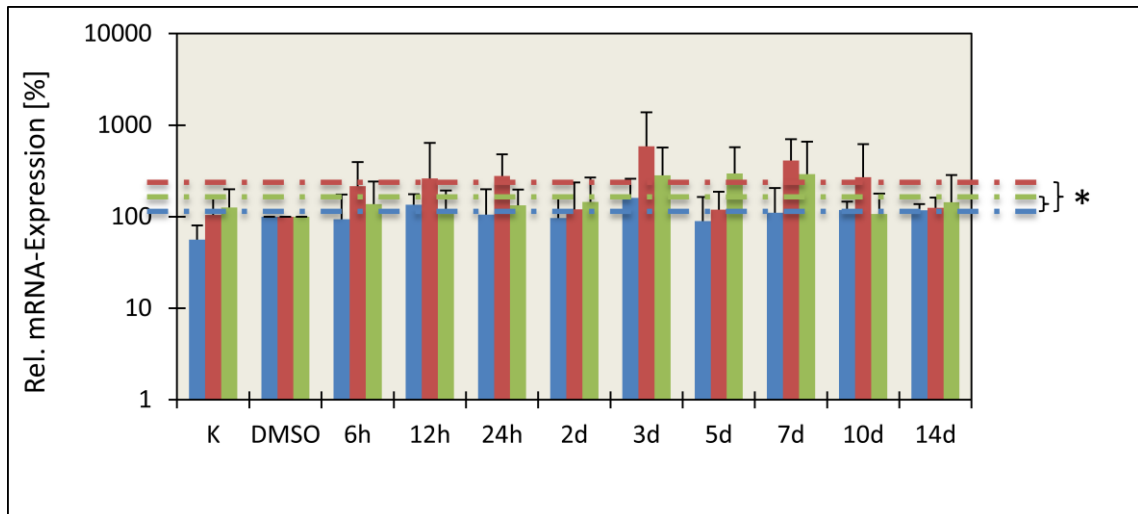
### **5.3 Androgen-abhängige Expression der putativen Targetgene**

Androgene können die Expression verschiedener Gene über eine intranukleäre Bindung an Androgen-responsive Elemente beeinflussen, wodurch das Ablesen entsprechender Gene erleichtert oder aber auch komplett verhindert wird. Über diese und weitere Regulationsmechanismen steuern sie die verschiedensten biologischen Funktionen, so beispielsweise auch die adipogene Differenzierung der Präadipozyten durch Steuerung der Expression Adipogenese-assoziiierter Gene.

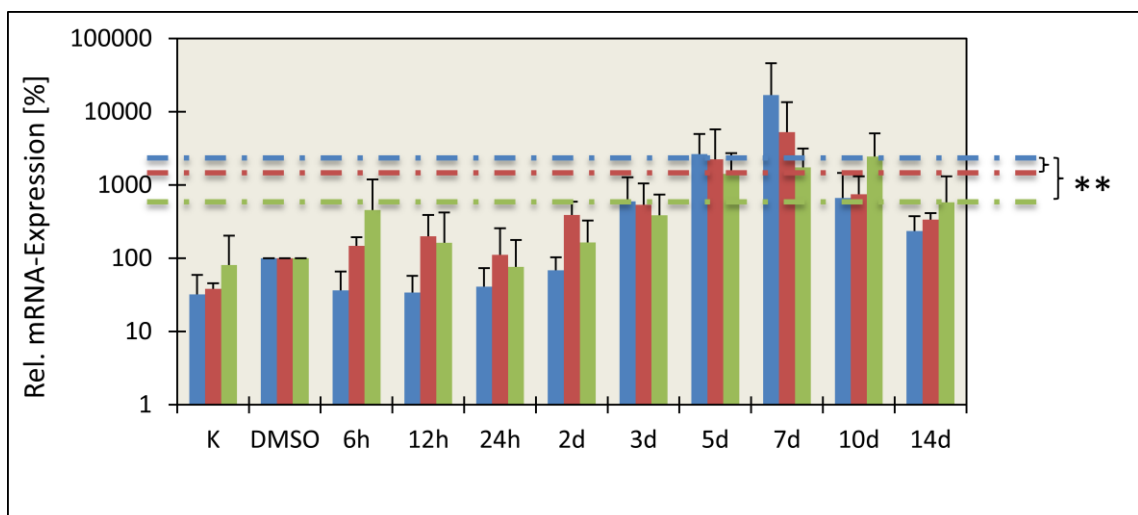
#### **5.3.1 Quantitative Real-Time-PCRs**

Mittels der oben beschriebenen Luziferase-Assays konnten AR, AdipoQ und TNF- $\alpha$  als putative Targetgene der miR-130a verifiziert werden. Laut der aktuellen Literatur scheinen diese Gene außerdem eine entscheidende Rolle in der Adipogenese zu spielen (siehe 1.2.5). PPAR- $\gamma$  konnte mittels der durchgeführten Untersuchungen nicht als Zielgen validiert werden, jedoch existieren Arbeiten, in denen PPAR- $\gamma$  als Zielgen der miR-130a verifiziert konnte (Lee et al., 2011). Außerdem gilt PPAR- $\gamma$  als der Masterregulator der Adipogenese, deshalb wurde auch dieses Gen mittels der folgenden Versuche genauer untersucht. Um eine Androgen-abhängige Expression auf mRNA-Ebene der genannten Gene während der adipogenen Differenzierung zu untersuchen, wurden quantitative Real-Time-PCRs ohne und mit Zugabe von Androgenen durchgeführt. Die SGBS-Präadipozyten wurden durch Verwendung eines Differenzierungsmediums (ADM) zur adipogenen Differenzierung angeregt und zusätzlich mit 100 nM Testosteron (T) und 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) behandelt. Die Differenzierung wurde an ausgewählten Zeitpunkten abgestoppt, um die mRNA-Expression der Gene zu vermessen. Während die mRNA-Expression des Androgenrezeptors in der 14-tägigen Adipogenese mit 114 % im Bezug auf die 100 % DMSO-Kontrolle weitestgehend konstant bleibt, steigt sie unter Zugabe von Testosteron bzw. Dihydrotestosteron um 151 % ( $p = 0,01$ ) bzw. um 70 % ( $p = 0,02$ ) im Bezug auf die mRNA-Expression ohne Androgenzugabe an. Die mRNA-Expression von AdipoQ zeigt sich im Verlauf der adipogenen Differenzierung zwar 20-fach erhöht im Vergleich zur 100 % DMSO-Kontrolle, jedoch zeigt sich unter Zugabe von Testosteron (1112 %;  $p = 0,53$ ) bzw. Dihydrotestosteron (826 %;  $p = 0,42$ ) im Bezug auf die mRNA-Expression ohne Androgenzugabe keine signifikante Änderung. Auch die mRNA-Expression von PPAR- $\gamma$  zeigt im Verlauf der 14 Tage eine Zunahme der Expression um fast 800 % im Vergleich zur 100 % DMSO-Kontrolle, jedoch zeigt sich auch hier keine signifikante Expressionsänderung unter Zugabe von Testosteron (689 %;  $p = 0,65$ ) oder Dihydrotestosteron (417 %;  $p = 0,24$ ). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ . Die Expression im Verlauf der Adipogenese steigt um 336 % im Vergleich zur 100 % DMSO-

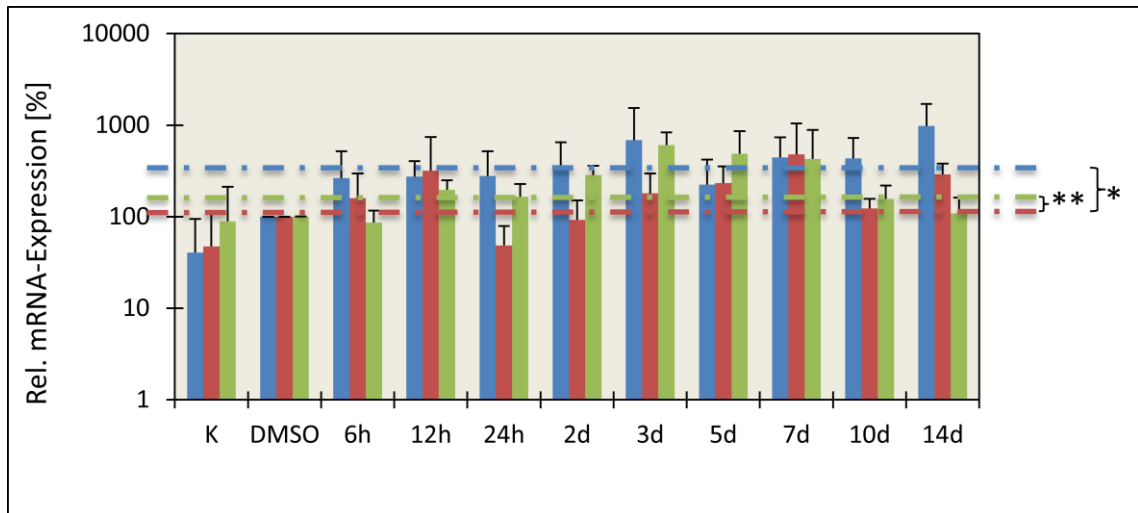
Kontrolle. Unter Zugabe von Testosteron zeigt sich zwar eine signifikante Abnahme der Expression um 222 % ( $p = 0,032$ ) im Vergleich zur Expression ohne Androgenzugabe, unter Zugabe von Dihydrotestosteron zeigt sich jedoch keine signifikante Änderung (280 %;  $p = 0,15$ ).



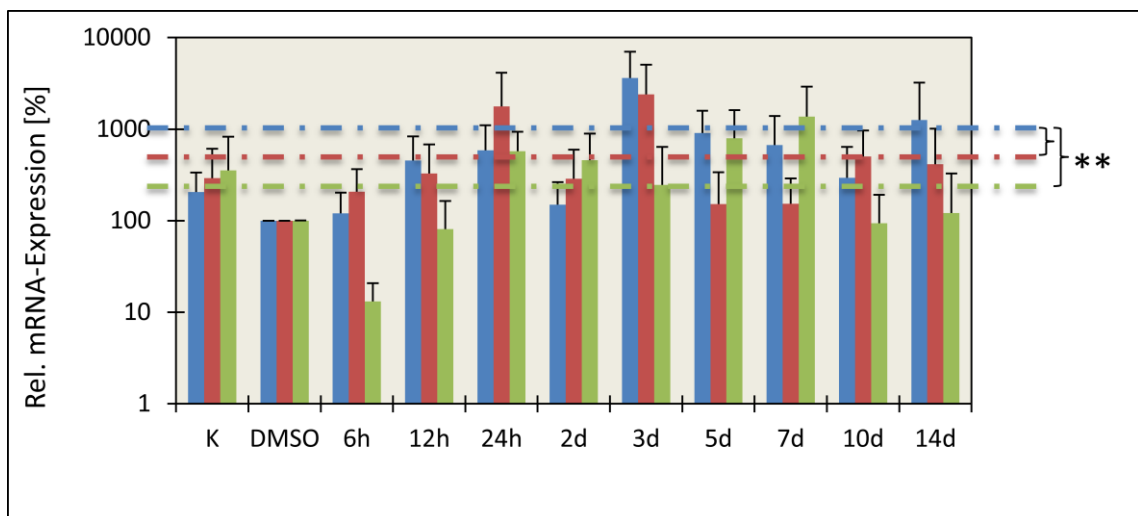
**Abbildung 15:** mRNA-Expression von AR in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (blau), sowie unter Zugabe von 100 nM Testosteron (rot) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (grün). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf die mit DMSO (Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel der verwendeten Hormone) behandelten Zellen. Die gestrichelten Linien stellen die Mittelwerte der mRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung +/- Androgensubstitution dar. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit GAPDH als Referenzgen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test).



**Abbildung 16:** mRNA-Expression von AdipoQ in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (blau), sowie unter Zugabe von 100 nM Testosteron (rot) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (grün). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf die mit DMSO (Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel der verwendeten Hormone) behandelten Zellen. Die gestrichelten Linien stellen die Mittelwerte der mRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung +/- Androgensubstitution dar. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit GAPDH als Referenzgen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test).



**Abbildung 17:** mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (blau), sowie unter Zugabe von 100 nM Testosteron (rot) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (grün). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf die mit DMSO (Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel der verwendeten Hormone) behandelten Zellen. Die gestrichelten Linien stellen die Mittelwerte der mRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung +/- Androgensubstitution dar. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit GAPDH als Referenzgen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test).

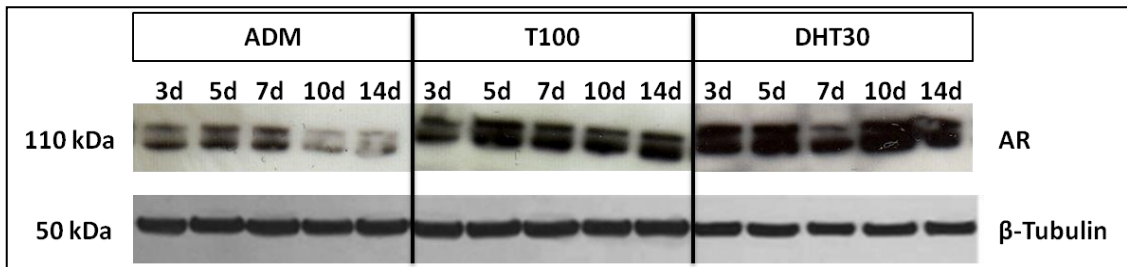


**Abbildung 18:** mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (blau), sowie unter Zugabe von 100 nM Testosteron (rot) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (grün). Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte nach Normierung auf 100 % in Bezug auf die mit DMSO (Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel der verwendeten Hormone) behandelten Zellen. Die gestrichelten Linien stellen die Mittelwerte der mRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung +/- Androgensubstitution dar. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit GAPDH als Referenzgen. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p > 0,05$  im zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test).

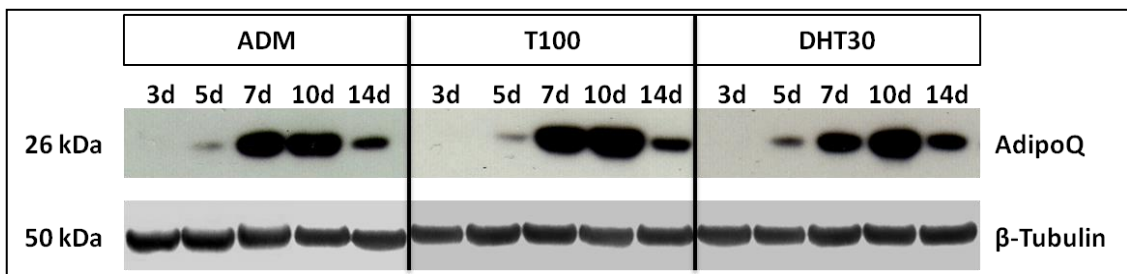
Androgene scheinen somit keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von AdipoQ, PPAR- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu haben, während die mRNA-Expression von Androgenrezeptor Androgen-abhängig erscheint.

### 5.3.2 Western-Blot-Analysen

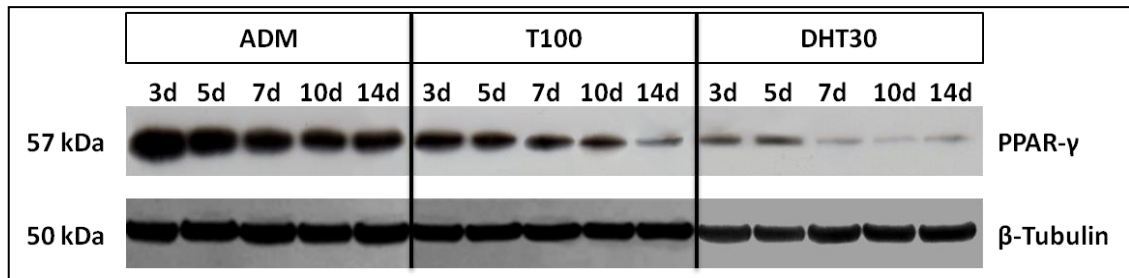
Da die mRNA-Expression der untersuchten Gene kaum Veränderungen zeigt und nur auf Ebene der Proteinexpression die posttranskriptionale Genregulation untersucht werden kann, führten wir abschließend Western-Blot-Analysen durch. Die Proteinexpression der Gene AR, AdipoQ und PPAR- $\gamma$  wurde nach Anregung der adipogenen Differenzierung durch Zugabe eines Differenzierungsmediums zu den SGBS-Zellen an ausgewählten Zeitpunkten gemessen. Weiterhin wurde ein Teil der zur Adipogenese angeregten SGBS-Zellen mit 100 nM Testosteron bzw. 30 nM Dihydrotestosteron behandelt, um die Proteinexpression unter Androgeneinfluss zu vermessen. AR zeigt eine weitgehend konstante Proteinexpression während der Adipogenese. Unter Testosteronzugabe steigt die Expression des AR an, unter Zugabe von Dihydrotestosteron ist sogar eine weitere Zunahme der Proteinexpression zu erkennen. Während die Proteinexpression von AdipoQ im Verlauf der adipogenen Differenzierung ansteigt und ihr Maximum am Tag 10 erreicht, zeigt sich unter Zugabe der Androgene keine Veränderung der Expression. PPAR- $\gamma$  hingegen zeigt bereits frühzeitig ein Maximum der Expression an Tag 3 mit nachfolgender Abnahme während der adipogenen Differenzierung. Unter Zugabe von Testosteron zeigt sich eine deutliche Expressionsabnahme, die unter Dihydrotestosteron noch stärker ausfällt.



**Abbildung 19:** AR-Proteinexpression in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (ADM), sowie unter Zugabe von 100 nM Testosteron (T100) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (DHT30). Die Proteinexpression von  $\beta$ -Tubulin dient als Referenz, es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.



**Abbildung 20:** AdipoQ-Proteinexpression in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (ADM), sowie unter Zugabe von 100 nM Testosteron (T100) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (DHT30). Die Proteinexpression von  $\beta$ -Tubulin dient als Referenz, es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.



**Abbildung 21:** PPAR- $\gamma$ -Proteinexpression in SGBS-Zellen während der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium (ADM), sowie unter Zugabe von 100 nM Testosteron (T100) bzw. 30 nM Dihydrotestosteron (DHT30). Die Proteinexpression von  $\beta$ -Tubulin dient als Referenz, es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Entsprechend der mRNA-Expression zeigt sich auch die Proteinexpression von AR Androgen-abhängig. Die mRNA-Expression von AdipoQ und PPAR- $\gamma$  hingegen zeigt keine Veränderung unter Androgenzugabe. Auch die Proteinexpression von AdipoQ zeigt sich unter Zugabe von T oder DHT weitgehend konstant. Nur die Proteinexpression von PPAR- $\gamma$  zeigt im Unterschied zur mRNA-Expression eine Abnahme unter Androgensubstitution. Dies spricht für eine posttranskriptionale Genregulation von PPAR- $\gamma$ , entweder durch Androgene selbst oder aber durch bisher unbekannte Regulatoren innerhalb dieser Signalwege. Für TNF- $\alpha$  war es uns leider nicht möglich einen geeigneten Antikörper zu etablieren, sodass wir keine Ergebnisse der Proteinexpression von TNF- $\alpha$  zeigen können.

## 6. Diskussion

Der Late-onset-Hypogonadismus stellt ein klinisches und biochemisches Syndrom dar, das mit zunehmendem Alter und typischen klinischen Symptomen sowie einem Testosteronmangel verbunden ist und somit mit einer signifikanten Abnahme der Lebensqualität und negativen Auswirkungen auf multiple Organsysteme einhergehen kann (Nieschlag et al., 2005). Vor allem die Zunahme des viszeralen Fettgewebes ist mit erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten verbunden (Pye et al., 2014). Bisher stellt eine Androgen-Substitutionstherapie die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit dar, da die molekularen Mechanismen der negativen metabolischen Effekte längst nicht vollständig erforscht sind.

In dieser Arbeit soll das microRNA-Cluster-130/301, ein mögliches therapeutisches Target in der Behandlung des LOH, als eine Adipogenese-hemmende microRNA, deren Expression Androgen-abhängig erfolgt, identifiziert werden.

## **6.1 Androgen-abhängige Expression des microRNA-Clusters-130/301 während der adipogenen Differenzierung**

Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, die den Einfluss der Androgene auf die microRNA-Expression untersucht haben. Da die Prostata eine hohe Androgenrezeptor-Dichte aufweist, beruhen die meisten Erkenntnisse auf diesem Gebiet auf Untersuchungen an Prostatakarzinom-Zelllinien (Nilsson et al., 2015; Scaravilli et al., 2016). Die Sertoli-Zellen des Hodens exprimieren ebenfalls Androgenrezeptoren, sodass auch in murinen Sertoli-Zellen Androgen-responsive microRNAs nachgewiesen werden konnten (Panneerdoss et al., 2012). Da Androgene an der Entwicklung und Funktion weiterer Gewebe beteiligt sind, wird auch hier eine Androgen-vermittelte Regulation der microRNA-Expression vermutet (Bouhaddioui et al., 2016; Casaburi et al., 2016). In Bezug auf die Symptome des LOH ist jedoch vor allem das Verhalten der microRNAs unter Androgensubstitution im Fettgewebe interessant.

In dieser Arbeit wurde die Expression des microRNA-Clusters-130/301 während der adipogenen Differenzierung sowie unter Zugabe von Testosteron oder Dihydrotestosteron mittels quantitativer Real-Time-PCR vermessen. Im Vorfeld wurde mittels in-silico-Analysen der putative Promotorbereich der miR-130a auf bekannte Androgen-responsive-Elemente abgesucht (Dai und Burnstein et al., 1996). Dabei zeigten sich vier ARE-Sequenzen, sodass eine Androgen-abhängige Regulation der miR-130a möglich ist. In den durchgeführten quantitativen Real-Time-PCRs zeigte sich eine eher niedrige Expression der miR-130a sowie der miR-301 während der adipogenen Differenzierung. Unter Zugabe von 100 nM Testosteron während der Adipogenese stieg sowohl die Expression der miR-130a als auch die Expression der miR-301 auf das Doppelte an. Dihydrotestosteron, der bioaktivere Metabolit des Testosterons, führte während der adipogenen Differenzierung sogar zu einer 3-fach höheren Expression der miR-130a und einer 6-fach höheren Expression der miR-301.

Ein verändertes microRNA-Expressionsprofil durch eine Abnahme der Serum-Testosteronkonzentration konnte auch im subkutanen Fettgewebe kastrierter Schweine nachgewiesen werden (Cai et al., 2014). Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem eine weitere microRNA nachweisen, die Androgen-vermittelt die Adipogenese reguliert. Die miR-375 zeigte nicht nur in Microarray-Analysen eine verminderte Expression unter Zugabe von 100 nM Testosteron während der adipogenen Differenzierung in humanen mesenchymalen Stammzellen, sondern auch eine Abnahme der Expression während der adipogenen Differenzierung in humanen mesenchymalen Stammzellen unter Androgensubstitution in quantitativen Real-Time-Analysen (Kraus et al., 2015). Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit existieren somit zahlreiche Hinweise, dass auch die microRNA-Expression in

Prädipozyten durch Androgene reguliert werden kann. Androgene weisen dabei vor allem hemmende Effekte während der adipogenen Differenzierung auf und können sowohl die Phase der Determinierung als auch die nachfolgende Differenzierung beeinflussen (Gupta et al., 2008; Chazenbalk et al., 2013; Hartig et al., 2013). In den reifen Adipozyten hemmen Androgene die Expression Adipozyten-spezifischer Gene, wodurch die Funktion der Zellen gestört wird (Xu et al., 1991; Gupta et al., 2008).

Der Einfluss des microRNA-Clusters-130/301 auf die adipogene Differenzierung und daraus entstehender Folgeerkrankungen wurde in verschiedenen Studien untersucht. Entsprechend der Ergebnisse dieser Arbeit, konnten Lee und Kollegen zeigen, dass die Expression der miR-130a im Verlauf der adipogenen Differenzierung humaner Fettzellen verringert ist, während die Expression Adipozyten-spezifischer Gene zunimmt. Außerdem konnten sie diese verringerte Expression während der adipogenen Differenzierung auch für die miR-130b nachweisen. Eine Transfektion der humanen Fettzellen, die sich in der Differenzierungsphase befinden, mit der miR-130a und der miR-130b führte zu einer signifikanten Abnahme der Ausreifung. Diese Abnahme der Differenzierung stellte sich durch morphologische Veränderungen der reifen Fettzellen sowie durch eine verminderte Triglyzeridproduktion dar. Außerdem zeigte sich eine verminderte Expression Adipozyten-spezifischer Marker wie Leptin, Adiponektin und PPAR- $\gamma$ . Die gegenteiligen Versuche mit Transfektion der Antagomirs zeigten eine zunehmende Ausreifung mit erhöhter Triglyzeridproduktion und erhöhter Expression der Adipozyten-spezifischen Gene in den Fettzellen. In murinen 3T3-L1-Adipozyten waren die Ergebnisse identisch (Lee et al., 2011). Auch im Brust-Fettgewebe von Ziegen konnte für die miR-130b ein inhibierender Effekt auf die Triglyzerid-Akkumulation sowie auf die Expression Adipozyten-spezifischer Gene nachgewiesen werden. Dieser Effekt wird durch PPAR- $\gamma$ -Coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) als direktes Targetgen der miR-130b vermittelt (Chen et al., 2015b). Die miR-301a wurde durch eine direkte Bindung in der 3'UTR von PPAR- $\gamma$  als hemmender Faktor der Adipogenese in 3T3-L1-Zellen beschrieben. Eine abnehmende Expression dieser microRNA führt zu einer Zunahme der Produktion proinflammatorischer Zytokine und ist somit für eine Störung im Metabolismus der Adipozyten verantwortlich (Li et al., 2016). Die miR-130a weist außerdem endothelial stabilisierende Effekte auf, die mit einer Abnahme der kardiovaskulären Risikofaktoren einhergehen. Runx-3, ein direktes Targetgen der miR-130a führt in endothelialen Progenitorzellen (EPCs) von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu einer verminderten Proliferation, Migration und Differenzierung sowie zu einer erhöhten Apoptoseneigung der Zellen. Damit ist eine Abnahme der endothelialen Reparaturprozesse verbunden, welche mit den typischen diabetischen Gefäßschäden und damit assoziierten

Folgeerkrankungen einhergeht (Meng et al., 2013). In-vivo-Studien belegen ebenfalls den positiven Einfluss des microRNA-Clusters-130/301 auf die Fettzellentwicklung und damit assoziierter metabolischer Störungen. Die miR-130a und miR-130b zeigten eine signifikant niedrigere Expression im abdominalen Fettgewebe übergewichtiger Frauen im Vergleich zum abdominellen Fettgewebe schlanker Frauen. Gleichzeitig zeigte sich die Expression Adipozyten-spezifischer Gene erhöht (Lee et al., 2011). Im Serum stark übergewichtiger Männer konnte eine verminderte Expression der miR-130b nachgewiesen werden. Die Serumlevel der miR-130b waren außerdem signifikant mit dem BMI, der Fettmasse sowie dem Hüftumfang assoziiert, das heißt je größer BMI, Fettmasse und Hüftumfang, desto niedriger war die Serumkonzentration der miR-130b. Nach Gewichtsverlust durch eine operative Maßnahme zeigte sich ein Anstieg der miR-130b-Serumkonzentration (Ortega et al., 2013). Ähnlich der Theorie dieser Arbeit konnten sowohl die erwähnten in-vitro-, als auch die in-vivo-Studien antiadipogene und positive metabolische Effekte des microRNA-Clusters-130/301 nachweisen. Im Gegensatz dazu existieren einige Studien, die das microRNA-Cluster-130/301 als potentiellen Biomarker für das metabolische Syndrom sehen. Im Serum übergewichtiger Mäuse konnte eine erhöhte miR-130b-Konzentration nachgewiesen werden. Während der adipogenen Differenzierung in 3T3-L1-Adipozyten war die Expression der miR-130b zwar ähnlich wie in dieser Arbeit eher niedrig, doch zeigte sich eine erhöhte miR-130b-Konzentration im Medium der Zellen. Dies spricht für eine zunehmende Sekretion der microRNA durch die ausreifenden Fettzellen. Auch im Serum übergewichtiger Männer zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Adipositas und der miR-130b-Konzentration. Jedoch fand man auch hier eine eher geringe Expression der microRNA in den Adipozyten selbst (Wang et al., 2013). Identische Ergebnisse konnten für übergewichtige Kinder nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich eine positive Korrelation der miR-130b-Serumkonzentration zum BMI, Hüftumfang sowie zur Fettgewebsmasse sowohl für Jungen als auch für Mädchen (Prats-Puig et al., 2013). Karolina und Kollegen fanden außerdem einen positiven Zusammenhang zwischen einer erhöhten miR-130a-Serumkonzentration und einem erhöhten Blutdruck bei Patienten mit dem metabolischen Syndrom (Karolina et al., 2012). Im Gegensatz zu der eher niedrigen Expression des microRNA-Clusters-130/301 in ausreifenden Adipozyten, wie in dieser Arbeit gezeigt, belegen diese Studien eine Zunahme der Serumkonzentration der microRNA mit zunehmender Fettgewebsmasse.

Das microRNA-Cluster zeigt also einerseits eine eher niedrige Expression sowie inhibierende Effekte in ausreifenden Adipozyten, andererseits jedoch erhöhte Serumkonzentrationen vor allem bei übergewichtigen Individuen, die an dem metabolischen Syndrom leiden.



Möglicherweise wird die Expression sowie die Sekretion der microRNA neben Androgenen durch weitere Faktoren beeinflusst, die bisher kaum untersucht wurden. TNF- $\alpha$  beispielsweise führt zu einer Induktion der miR-130-Expression im weißen Fettgewebe von Mäusen, die wiederum zu einer gestörten Funktion und zunehmender Inflammation in reifen Adipozyten führt (Kim et al., 2013). Auch weitere microRNAs sind bekannt, deren Expression durch Adipozytokine reguliert wird (Liu et al., 2011; Xu et al., 2013; Xu et al., 2014). Um die molekularen Mechanismen in der Funktion und Regulation des microRNA-Clusters-130/301 besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen vor allem, dass das microRNA-Cluster-130/301 während der adipogenen Differenzierung der SGBS-Präadipozyten eher gering exprimiert wird, aber durch Androgene, die vor allem positive metabolische Effekte aufweisen, induziert werden kann. Die microRNA könnte somit sowohl in der Pathogenese als auch der Behandlung des LOH und der damit verbundenen metabolischen Störungen eine Rolle spielen.

## **6.2 Adipogenese-assoziierte Zielgene der microRNA-130a**

Im nächsten Schritt der Arbeit sollten Zielgene der miR-130a als Teil des microRNA-Clusters-130/301 identifiziert werden, die in der adipogenen Differenzierung eine Rolle spielen. Dazu wurden im Vorfeld mögliche Kandidaten mit der Hilfe verschiedener microRNA-Datenbank (TargetScan, PicTar und miRanda) erfasst. Um diese anschließend zu verifizieren, wurden Luziferase-Assays durchgeführt. Für das humane microRNA-Cluster-130/301 sind derzeit 1029 mögliche Targetgene in der microRNA-Datenbank TargetScan verzeichnet. Bisher wurde das microRNA-Cluster-130/301 vor allem im Zusammenhang mit der Regulation von Genen beschrieben, die an der Entstehung von pulmonaler Hypertonie, Krebs, Psoriasis vulgaris, kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2 und entzündlichen Erkrankungen beteiligt sind ([http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir\\_sc=miR-130-3p%2F301-3p%2F454-3p&mir\\_c=&mir\\_nc=&mir\\_vnc=&mirg](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=miR-130-3p%2F301-3p%2F454-3p&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg), aufgerufen am 10.02.2017). Gene, die während der adipogenen Differenzierung eine Rolle spielen, wurden bisher kaum als Targets der miR-130/301 identifiziert.

In den Luziferase-Assays dieser Arbeit konnten AR, AdipoQ und TNF- $\alpha$  als Zielgene der miR-130a verifiziert werden. Leptin, ARHGEF-12 und RASD-1 wurden als direkte Zielgene der miR-130a ausgeschlossen. PPAR- $\gamma$  zeigte zwar nach Transfektion mit der miR-130a eine Abnahme der Lumineszenz um 25 % im Vergleich zur Kontroll-miR, diese war jedoch nicht signifikant, sodass PPAR- $\gamma$  ebenfalls nicht als Zielgen der miR-130a nachgewiesen werden konnte. In der Literatur hingegen wurde PPAR- $\gamma$  mehrfach als Target der miR-130a aber auch der miR-130b

beschrieben. Nachdem Lee und Kollegen eine gegenläufige Expression der miR-130a und miR-130b und der PPAR- $\gamma$ -mRNA in humanen und murinen Adipozyten fanden, führten sie EGFP-Reporterassays in HeLa-Zellen durch, um PPAR- $\gamma$  als direktes Target der miR-130a und b zu identifizieren. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression sowie der Proteinexpression der PPAR- $\gamma$ -Reporterkonstrukte. Außerdem konnten sie nachweisen, dass die miR-130a und b sowohl in der kodierenden Region als auch in der 3'UTR der mRNA Bindesequenzen aufweisen und somit die Expression von PPAR- $\gamma$  regulieren. Die Bindestelle in der kodierenden Region weist dabei die stärkeren Effekte auf (Lee et al., 2011). Eine Regulation der PPAR- $\gamma$ -Expression durch Bindung der miR-130a und b in der 3'UTR der mRNA konnte auch in weiteren Studien nachgewiesen werden. In der Hepatozyten-Zelllinie HepG-2 zeigte sich die PPAR- $\gamma$ -Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene unter Transfektion mit der miR-130a verringert (Huang et al., 2015). In einer hepatischen Sternzelllinie von Ratten zeigte sich im Rahmen von Studien zur Leberfibrose eine Hemmung der PPAR- $\gamma$ -Expression durch Bindung der miR-130a und b im 3'UTR der mRNA (Le Lu et al., 2015). Die Abweichungen zu den Ergebnissen dieser Arbeit könnten durch die Verwendung verschiedener Zelllinien sowie verschiedener Reportersysteme erklärt werden. Außerdem erfolgten die beschriebenen Arbeiten auch an verschiedenen Spezies. Die Rolle von PPAR- $\gamma$  als Masterregulator der Adipogenese steht außer Frage. Neben der Fähigkeit zur Induktion der adipogenen Differenzierung, ist PPAR- $\gamma$  an der Aufrechterhaltung des differenzierten Zustandes maßgeblich beteiligt (Tontonoz et al., 1994b; Tamori et al., 2002).

Der Androgenrezeptor entfaltet seine Wirkung über die Bindung an Androgen-responsive Elemente (AREs), wodurch eine transkriptionelle Regulation verschiedener Gene aber auch verschiedener microRNAs möglich ist (Claessens et al., 2008; Panneerdoss et al., 2012; Casaburi et al., 2016). In Brustkrebs-Zelllinien wurde beispielsweise ein verändertes microRNA-Expressionsprofil nachgewiesen, wenn diese Zellen den AR exprimieren (Shi et al., 2017). Auch in Prostatakarzinom-Zelllinien ist eine Androgen-abhängige microRNA-Expression beschrieben (Wan et al., 2016). Andererseits gibt es auch microRNAs, die die Expression des Androgenrezeptors regulieren. Die miR-1207-3p beispielsweise ist in hochaggressiven Prostatakarzinom-Zelllinien eher gering exprimiert, während AR in diesen aggressiven, teilweise auch metastasierenden Karzinom-Zelllinien stark exprimiert wird. Diese gegensätzliche Expression veranlasste Das und Kollegen zur genaueren Untersuchung dieser Signalwege. Dabei zeigte sich eine Hemmung der AR-Expression durch eine direkte Interaktion der miR-1207-3p mit dem Protein FNDC-1 (Das et al., 2016). In einer weiteren Studie konnten mehrere microRNAs identifiziert werden, die die AR-Expression in Prostatakarzinom-Zelllinien

beeinflussen. AR wurde mittels Luziferase-Assays als direktes Targetgen der miR-30b-3p und der miR-30d-5p nachgewiesen. Die genannten microRNAs führen dabei über eine Bindung an die 3'UTR der mRNA zur Hemmung der AR-Expression und somit zu einer Hemmung der Proliferation dieser Zelllinien (Kumar et al., 2016). Mittels Reporter-Assays und Western-Blot-Analysen wurde AR außerdem als direktes Target der miR-203, der miR-205 und der miR-130a in Prostatakarzinom-Zelllinien nachgewiesen (Boll et al., 2013). Diese Ergebnisse decken sich mit denen dieser Arbeit. Mittels Luziferase-Assay wurde eine direkte Bindung der miR-130a im 3'UTR des AR nachgewiesen und dieses Gen somit als direktes Target identifiziert.

AdipoQ kodiert für das Protein Adiponektin, ein Adipozytokin mit antiinflammatorischen, antidiabetogenen und antiatherogenen Eigenschaften, welches fast ausschließlich vom Fettgewebe sezerniert wird. Die Überexpression von Adiponektin führt sowohl in-vitro als auch in vivo zu einer Zunahme der Fettgewebsmasse (Fu et al., 2005), jedoch weißt dieses Adipozytokin an den peripheren Organen positive metabolische Effekte auf (Kim et al., 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften wird der Zusammenhang zwischen der Adiponektin-Expression und verschiedener microRNAs während der Adipogenese intensiv untersucht. Die meisten Studien zeigen dabei regulierende Effekte der microRNAs auf die Adiponektin-Rezeptor-Expression und somit nur einen indirekten Einfluss auf Adiponektin selbst. Die miR-375 beispielsweise hemmt über eine Bindung an die 3'UTR der mRNA die Expression des AdipoR-2 in humanen SGBS-Zellen, welcher an der Entstehung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt ist (Kraus et al., 2015). Die Transfektion von HepG-2-Zellen mit der miR-218 zeigte eine Hemmung der Adiponektin-vermittelten Glukose-Aufnahme. Diese Hemmung beruht vor allem auf einer verminderten AdipoR-2-Expression, da dieser Rezeptor mittels Luziferase-Assays als direktes Target der miR-218 nachgewiesen werden konnte (Du et al., 2015). Auch die Expression des AdipoR-1 wird durch verschiedene microRNAs reguliert. In humanen Endothelzellen der Nabelvene beispielsweise führte eine miR-221-Expression zu einer Abnahme der Expression des AdipoR-1, welcher mittels Luziferase-Assay als direktes Target der microRNA nachgewiesen werden konnte. Eine Überexpression der miR-221 ging mit einer Abnahme der Adiponektin-vermittelten Stickstoffmonoxid-Produktion einher, welche an der Regulation der endothelialen Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Die Bindung an den AdipoR-1 entfaltet diese antiatherogenen Effekte des Adiponektins, welche jedoch durch die miR-221 gehemmt werden (Chen et al., 2015a). Die miR-378 wiederum zeigt direkte Effekte auf die Adiponektin-Expression. Durch eine Überexpression der microRNA zeigte sich eine verminderte mRNA- und Proteinexpression des Adiponektins in 3T3-L1-Zellen. Luziferase-Assays wiesen eine direkte Bindung der miR-378 an die 3'UTR der AdipoQ-mRNA nach (Ishida

et al., 2014). Auch in dieser Arbeit konnte AdipoQ mittels Luziferase-Assays als direktes Targetgen einer microRNA nachgewiesen werden. Durch eine Bindung der miR-130a in der 3'UTR der mRNA wird die AdipoQ-Expression gehemmt.

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches in eine Vielzahl an biologischen Prozessen beispielsweise Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose und Lipidmetabolismus involviert ist. Es wird vor allem von Makrophagen, aber in geringen Mengen auch vom Fettgewebe sezerniert. TNF- $\alpha$  hemmt die Expression Adipozyten-spezifischer Gene sowie die Expression von PPAR- $\gamma$  und verschiedener C/EBPs (Stephens und Pekala, 1991; Feingold und Grunfeld, 1992; Zhang et al., 1996), führt jedoch über eine Zunahme der Insulinresistenz sowie durch eine erhöhte Lipolyserate zu eher negativen metabolischen Effekten (Hauner et al., 1995). Auch im Zusammenspiel mit den microRNAs weist TNF- $\alpha$  sehr unterschiedliche Effekte auf. Einerseits reguliert TNF- $\alpha$  die Expression verschiedener microRNAs und somit die Expression der entsprechenden Targetgene, andererseits wird die TNF- $\alpha$ -Expression durch Bindung einiger microRNAs an ihre Zielgene reguliert. TNF- $\alpha$  als direktes Targetgen einer microRNA wurde bisher nur selten nachgewiesen. Chou und Kollegen konnten zwar eine Abnahme der TNF- $\alpha$ -Expression in humanen Adipozyten-Stammzellen nach miR-221-Transfektion nachweisen, jedoch wurde kein Reporterassay durchgeführt (Chou et al., 2013). Die Effekte von TNF- $\alpha$  auf die Expression verschiedener microRNAs sind dagegen deutlich besser untersucht. Die miR-378 beispielsweise wird in 3T3-L1-Adipozyten durch TNF- $\alpha$  vermehrt exprimiert und somit wird die Adiponektin-Expression gehemmt (Ishida et al., 2014). Auch eine TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung der miR-155 in 3T3-L1-Prädipozyten hemmt die C/EBP- $\beta$ -Expression und somit die adipogene Differenzierung (Liu et al., 2011). Die Expression der miR-26b hingegen, eine proadipogene microRNA, wird durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  während der adipogenen Differenzierung in humanen Prädipozyten gehemmt (Xu et al., 2013). Interessant ist auch die Wechselwirkung zwischen der miR-130 und TNF- $\alpha$ . In dieser Arbeit wurde TNF- $\alpha$  mittels Luziferase-Assay als Zielgen der miR-130a identifiziert. Kim und Kollegen hingegen beschreiben eine Zunahme der miR-130a- und b-Expression im subkutanen Fettgewebe übergewichtiger Mäuse sowie eine Zunahme der microRNA-Expression nach Zugabe von TNF- $\alpha$  in murinen 3T3-L1-Zellen. Diese TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionssteigerung der miR-130 führt zu einer Hemmung der PPAR- $\gamma$ -Expression und somit zur Hemmung der adipogenen Differenzierung (Kim et al., 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit wiederum beschreiben eine Hemmung der TNF- $\alpha$ -Expression durch die Bindung der miR-130a an die 3'UTR der mRNA. TNF- $\alpha$  stellt somit ein direktes Zielgen der miR-130a dar. Dies könnte auf

eine Art negativen Feedbackmechanismus in der Regulation der TNF- $\alpha$  vermittelten Inflammation im Fettgewebe hindeuten.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Mutation der Bindesequenz der miR-130a im 3'UTR der entsprechenden Gene und den damit einhergehenden Veränderungen der Genexpression. Auch Lee und Kollegen mutierten diese Bindesequenz sowohl im 3'UTR als auch in der kodieren Region der PPAR- $\gamma$ -mRNA-Reporterkonstrukte durch einen Austausch von insgesamt vier Basen. Durch diese Mutationen wurde die translationale Hemmung der PPAR- $\gamma$ -Expression durch die miR-130a und b aufgehoben (Lee et al., 2011). In der Arbeit von Kraus und Kollegen genügte bereits der Austausch zweier Basen in der Bindesequenz der microRNA, um die Hemmung der AdipoR-2-Expression durch die miR-375 zu verhindern (Kraus et al., 2015). Für die untersuchten Targetgene dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bereits der Austausch einer Base die Bindung der microRNA stört und somit eine Regulation der Genexpression durch die miR-130a verhindert wird. Diese Ergebnisse zeigen wie spezifisch die Bindung der microRNAs an ihre Zielgene erfolgt und das bereits der Austausch einer Base innerhalb dieser konservierten Sequenzen das Spektrum der Zielgene einer microRNA deutlich verändern kann (Hill et al., 2014).

In Zusammenschau der Ergebnisse und der aktuellen Literatur lässt sich nur erahnen, wie komplex das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren in der Regulation der Adipogenese ist. Um die molekularen Mechanismen vollständig zu verstehen, sind weitere Studien nötig. In dieser Arbeit wurden die Adipogenese-relevanten Gene AR, AdipoQ und TNF- $\alpha$  als Zielgene der miR-130a als Teil des microRNA-Clusters-130/301 identifiziert und die Spezifität der microRNA-Bindung an ihre entsprechenden Targets aufgezeigt. Die Expression dieser Gene während der adipogenen Differenzierung in SGBS-Zellen sowie unter Androgensubstitution wurde im letzten Teil der Arbeit untersucht.

### **6.3 Androgen-abhängige Expression der Zielgene während der adipogenen Differenzierung**

Im letzten Schritt dieser Arbeit wurde die Expression der gefunden Zielgene der miR-130a als Teil des microRNA-Clusters-130/301 während der adipogenen Differenzierung in humanen SGBS-Prädipozyten untersucht. Außerdem wurden die differenzierenden Fettzellen mit Testosteron oder Dihydrotestosteron behandelt, um den Effekt der Androgene auf die Fettzellentwicklung und die Expression der microRNA-Targets zu eruieren und somit die molekularen Mechanismen der zunehmenden viszeralen Fettgewebssmasse im Krankheitsbild des LOH besser zu verstehen.

Mittels quantitativen Real-Time-PCRs und Western-Blot-Analysen wurde die Expression von Androgenrezeptor während der adipogenen Differenzierung in SGBS-Zellen vermessen. Dabei zeigte sich eine von Beginn an konstante mRNA- und Proteinexpression für AR in den SGBS-Zellen während der 14-tägigen Differenzierung. Das bedeutet, dass bereits humane Präadipozyten AR exprimieren und sensibel für Androgene sind. Entsprechend dieser Ergebnisse beschreibt die Arbeit von Dieudonné und Kollegen die Proteinexpression des AR sowohl in humanen Präadipozyten als auch in reifen humanen Fettzellen, wobei die Proteinexpression im Verlauf der adipogenen Differenzierung sogar abnimmt. Die mRNA-Expression hingegen steigt im Verlauf an und erreicht ihr Maximum in reifen Adipozyten (Dieudonné et al., 1998). In murinen 3T3-L1-Präadipozyten zeigt sich eine eher niedrige mRNA-Expression des AR zu Beginn der Differenzierung mit einer Zunahme der Expression in reifen Fettzellen (Fu et al., 2005; Hartig et al., 2013). Im Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeiten zeigen weitere Untersuchungen an humanen SGBS-Präadipozyten, ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit, einen konstanten Expressionsverlauf der AR-mRNA während der Adipogenese (Horenbug et al., 2008). Die Ergebnisse der AR-Expression während der adipogenen Differenzierung unter Androgensubstitution hingegen fallen in allen Studien ähnlich aus. In dieser Arbeit zeigt sich eine Zunahme der mRNA- sowie der Proteinexpression unter Zugabe von Testosteron oder Dihydrotestosteron zu den differenzierenden SGBS-Zellen. DHT zeigt dabei im Vergleich zu Testosteron eine stärkere Zunahme der AR-Expression. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Arbeit von Dieudonné und Kollegen. Auch hier steigt die Proteinexpression des AR unter Androgenzugabe in humanen Präadipozyten, die interventionell von Männern und Frauen gewonnen wurden, an (Dieudonné et al., 1998). Sogar in humanen mesenchymalen Stammzellen konnten Gupta und Kollegen diese DHT-vermittelte Expressionszunahme des AR nachweisen (Gupta et al., 2008). Dies bestätigt die Annahme, dass bereits die Fettvorläuferzellen AR exprimieren. Die voneinander abweichenden Ergebnisse der AR-Expression während der adipogenen Differenzierung ohne Androgen-Zugabe könnten zum einen durch die Instabilität des Proteins ohne Ligandenbindung erklärt werden (Kempainen et al., 1992), zum anderen aber auch durch die Messungen auf verschiedenen Expressionsebenen. Aufgrund einer möglichen posttranskriptionellen Genregulation, beispielsweise durch microRNAs wie die miR-130a, zeigen die mRNA- und Proteinexpression eines Gens nicht selten unterschiedliche Ergebnisse.

Die Adiponektin-Expression während der Adipogenese in humanen SGBS-Präadipozyten wurde ebenfalls sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene vermessen. Auf beiden Ebenen fand sich dabei zunächst eine sehr geringe Expression mit einem Anstieg im Verlauf der 14-tägigen

Differenzierung der SGBS-Prädipozyten. Der Expressionsanstieg auf Ebene der mRNA zeigt sein Maximum an Tag 7. Dieser Expressionsanstieg der Adiponektin-mRNA konnte in weiteren Studien sowohl für murine 3T3-L1-Prädipozyten als auch für humane Prädipozyten bestätigt werden (Horenburg et al., 2008; Lee et al., 2011). Ähnlich dem Expressionsverlauf in dieser Arbeit konnten auch Körner und Kollegen ein Maximum der mRNA-Expression von Adiponektin an Tag 8 nachweisen. Die Proteinexpression hingegen zeigte ihr Maximum zeitlich versetzt an Tag 10 (Körner et al., 2005). Auch die Western-Blot-Analysen dieser Arbeit zeigten ein Expressionsmaximum für Adiponektin an Tag 10. Diese Ergebnisse entsprechen der bisherigen Annahme, dass Adiponektin vor allem vom reifen Fettgewebe exprimiert und sezerniert wird. Unter Androgensubstitution konnten in dieser Arbeit weder auf mRNA- noch auf Proteinebene Expressionsänderungen für Adiponektin nachgewiesen werden. Auch die Arbeit von Horenburg und Kollegen zeigte keinen Effekt von Testosteron oder Dihydrotestosteron auf die mRNA- oder Proteinexpression von Adiponektin in SGBS-Zellen (Horenburg et al., 2008). In-vitro- und in-vivo-Untersuchungen von Nishizawa und Kollegen konnten ähnliche Effekte der Androgene auf die Adiponektin-Expression im Fettgewebe nachweisen, jedoch fand sich unter Androgeneinfluss eine verminderte Sekretion des Adiponektins aus den Fettzellen (Nishizawa et al., 2002). Auch Xu und Kollegen konnten eine verminderte Sekretion, speziell der HMW-Form des Adiponektins, durch Testosteron nachweisen (Xu et al., 2005). Dies könnte erklären, warum die Plasma-Adiponektinspiegel bei Männern deutlich niedriger sind als bei Frauen. Androgene üben demnach durch bisher unbekannte Mechanismen einen Einfluss auf die Adiponektinsekretion aus. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Adiponektin-Expression im Verlauf der Adipogenese der humanen SGBS-Zellen zunimmt und Androgene keinen Einfluss auf die Expression in Fettzellen aufweisen. Ein möglicher Serumfaktor, der die abweichenden Serumkonzentrationen dieses Adipozytokins erklären könnte, stellt die miR-130a dar, die Androgen-abhängig exprimiert wird und Adiponektin als Zielgen aufweist.

TNF- $\alpha$ , ein Zytokin, welches mit zunehmender Fettgewebsmasse verstärkt sezerniert wird, zeigte in dieser Arbeit eine Zunahme der mRNA-Expression während der adipogenen Differenzierung in humanen SGBS-Zellen. Eine Zunahme der TNF- $\alpha$ -Expression mit zunehmendem Fettgewebe ist bekannt (Hotamisligil et al., 1993), die Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung ist bisher jedoch kaum untersucht. Lediglich eine Arbeit zeigte ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit eine Zunahme der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  im Verlauf der Adipogenese in Prädipozyten, die von Schweinen gewonnen werden konnten und zur Differenzierung angeregt wurden. An Tag sechs zeigte sich ein Maximum der Expression mit nachfolgender Abnahme (Li et al., 2013b). Eine Hemmung der TNF- $\alpha$ -Expression im

Fettgewebe durch eine Testosteron-Substitutionstherapie konnte bereits nachgewiesen werden (Malkin et al., 2004). In dieser Arbeit konnte der hemmende Effekt von Testosteron zumindest auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in humanen differenzierenden SGBS-Zellen bestätigt werden. Da TNF- $\alpha$  insgesamt eher negative metabolische Effekte zeigt (Hauner et al., 1995), weist die Androgen-vermittelte Expressionshemmung hier am ehesten antiadipogene Effekte auf. Ob auch hier microRNAs wie die miR-130a eine Rolle spielen, muss jedoch erst mittels weiterer Untersuchungen bestätigt werden.

PPAR- $\gamma$ , als der Masterregulator der Adipogenese, ist das wohl am besten untersuchte Gen während der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu reifen Adipozyten. Außerdem stellt dieses Gen ein Marker für die erfolgreiche adipogene Differenzierung dar, denn nur durch eine gesteigerte Expression dieses Gens wird die Adipogenese induziert und aufrecht erhalten (Tontonoz et al., 1994b; Tamori et al., 2002). In dieser Arbeit zeigt sich bereits zu Beginn der adipogenen Differenzierung in SGBS-Zellen eine hohe PPAR- $\gamma$ -Expression, die während der gesamten Adipogenese aufrecht erhalten wird. Diese Ergebnisse spiegeln die aktuelle Literatur wider, in der sich sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression nicht nur in murinen sondern auch in humanen Präadipozyten auf einem konstant hohem Niveau zeigt (Lee et al., 2011). Der hemmende Effekt der Androgene auf die PPAR- $\gamma$ -Expression wurde bereits in vielen Arbeiten untersucht und bestätigt (Gupta et al., 2008). In dieser Arbeit konnte sich dieser Effekt lediglich auf Proteinebene bestätigen. Die mRNA-Expression von PPAR- $\gamma$  zeigte keine signifikanten Veränderungen unter Androgensubstitution. In der Arbeit von Hartig und Kollegen hingegen zeigte sich eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung in murinen 3T3-L1-Zellen nach Zugabe des synthetischen Androgens R1881 (Hartig et al., 2013). Die Unterschiede der mRNA-Expression von PPAR- $\gamma$  könnten durch die verschiedenen Zellsysteme, aber auch durch die verschiedenen verwendeten Hormone zustande gekommen sein. Auf Proteinebene der SGBS-Zellen zeigte sich nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch in der Arbeit von Kraus und Kollegen eine Abnahme der Expression während der adipogenen Differenzierung unter Testosteronzugabe, die sich unter DHT-Zugabe sogar noch verstärkte (Kraus et al., 2015). Eine weitere Erklärung für die abweichende Proteinexpression von PPAR- $\gamma$  stellt auch hier die posttranskriptionelle Genregulation dar. Möglicherweise gibt es einen bisher unbekanntem Faktor, der durch Androgene reguliert die PPAR- $\gamma$ -Proteinexpression steuert. Ein potentieller Kandidat dafür ist das microRNA-Cluster-130/301, jedoch müssen weitere Untersuchungen folgen, um dies zu validieren.

Insgesamt decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit zum größten Teil mit denen der bisherigen Literatur. Unterschiede könnten dabei auf Differenzen in den verwendeten Zelllinien bzw.



abweichende Substrate zurückgeführt werden. Aufgrund einer möglichen posttranskriptionellen Genregulation ist es außerdem nicht selten, dass mRNA- und Proteinexpression der Gene unterschiedliche Muster aufweisen. Potentielle Faktoren, die posttranskriptionell die Genexpression regulieren, sind microRNAs. Besonders die miR-130a, für die AR, Adiponektin und TNF- $\alpha$  in dieser Arbeit sowie PPAR- $\gamma$  in der Literatur als Targetgene beschrieben wurden, stellt einen denkbaren Faktor in der Regulation der adipogenen Differenzierung in humanen SGBS-Zellen unter Androgensubstitution dar.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Der Late-onset-Hypogonadismus ist eine Erkrankung des alternden Mannes, die mit typischen Symptomen und einer Abnahme der Serum-Testosteronkonzentration einhergeht. Zu den Prognose-relevanten Symptomen zählen neben der Zunahme des viszeralen Fettgewebes auch die damit einhergehenden Folgeerscheinungen wie das metabolische Syndrom, Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen. MicroRNAs sind kurze, einzelsträngige, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die an der posttranskriptionellen Regulation einer Vielzahl an Genen beteiligt sind. Auch in der adipogenen Differenzierung humaner Adipozyten spielen sie eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit sollte das microRNA-Cluster-130/301 als ein regulierender Faktor in der Adipogenese identifiziert werden und dessen Expression sowie die Expression der entsprechenden Zielgene während der adipogenen Differenzierung in humanen SGBS-Zellen unter Androgensubstitution untersucht werden. Im ersten Schritt wurde zunächst die Expression des microRNA-Clusters untersucht. Sowohl die Expression der miR-130a als auch die Expression der miR-301 zeigte sich unter Androgenzugabe erhöht. Um einen Effekt des microRNA-Clusters während der adipogenen Differenzierung nachzuweisen, stellte sich nun die Frage, welche Gene durch diese miR reguliert werden. Durch in-silico Analysen mithilfe bestimmter microRNA-Datenbanken wurden mögliche Zielgene der miR-130a gesucht, die Adipogenese-relevant sind. In den nachfolgenden Luziferase-Assays konnten AR, AdipoQ und TNF- $\alpha$  als Targets der miR in-vitro bestätigt werden. Abschließend sollten nun die Effekte der Androgene während der adipogenen Differenzierung der SGBS-Zellen auf die Expression der microRNA-Zielgene und die Expression des Masterregulators der Adipogenese PPAR- $\gamma$  untersucht werden. Dabei zeigte sich eine Zunahme der AR-Expression unter Androgensubstitution, während zumindest die PPAR- $\gamma$ -Proteinexpression unter Zugabe von Testosteron oder Dihydrotestosteron abnahm. Für die Expression von Adiponektin und TNF- $\alpha$  konnte kein Einfluss der Androgene beobachtet werden, obwohl es Studien gibt, die eine Abnahme der Serumkonzentration dieser Proteine unter Testosteronsubstitution zeigen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es weitere Faktoren gibt, die Androgen-abhängig die Expression der Gene steuern und somit die Adipogenese regulieren. Potentielle Kandidaten dafür sind microRNAs wie beispielsweise das microRNA-Cluster-130/301. Um jedoch die molekularen Mechanismen hinter der microRNA-Funktion in der adipogenen Differenzierung humaner Fettzellen genauer zu erfassen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Sollte das microRNA-Cluster-130/301 Androgen-vermittelt die Adipogenese regulieren können, stellt es zukünftig ein mögliches Target nicht nur in der Behandlung des LOH sondern auch in der Behandlung der Adipositas und damit verbundener Folgeerkrankungen dar.

## Literaturverzeichnis

- Ali, Aus Tariq; Hochfeld, Warren E.; Myburgh, Renier; Pepper, Michael S. (2013): Adipocyte and adipogenesis. In: *European journal of cell biology* 92 (6-7), S. 229–236.
- Allan, C. A.; Strauss, B J G; Burger, H. G.; Forbes, E. A.; McLachlan, R. I. (2008): Testosterone therapy prevents gain in visceral adipose tissue and loss of skeletal muscle in nonobese aging men. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (1), S. 139–146.
- Asterholm, Ingrid Wernstedt; Scherer, Philipp E. (2010): Enhanced Metabolic Flexibility Associated with Elevated Adiponectin Levels. In: *The American Journal of Pathology* 176 (3), S. 1364–1376.
- Avram, Mathew M.; Avram, Alison Sharpe; James, William D. (2007): Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 56 (3), S. 472–492.
- Banerjee, S. S. (2002): The Kruppel-like Factor KLF2 Inhibits Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma Expression and Adipogenesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (4), S. 2581–2584.
- Baskerville, Scott; Bartel, David P. (2005): Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. In: *RNA (New York, N.Y.)* 11 (3), S. 241–247.
- Basyuk, Eugenia; Suavet, Florence; Doglio, Alain; Bordonne, Remy; Bertrand, Edouard (2003): Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. In: *Nucleic acids research* 31 (22), S. 6593–6597.
- Behmel, A.; Plochl, E.; Rosenkranz, W. (1984): A new X-linked dysplasia gigantism syndrome: identical with the Simpson dysplasia syndrome? In: *Human genetics* 67 (4), S. 409–413.
- Behre, Hermann M.; Tammela, Teuvo L J; Arver, Stefan; Tolra, Josep R.; Bonifacio, Vincenzo; Lamche, Michael et al. (2012): A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of testosterone gel on body composition and health-related quality-of-life in men with hypogonadal to low-normal levels of serum testosterone and symptoms of androgen deficiency over 6 months with 12 months open-label follow-up. In: *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male* 15 (4), S. 198–207.
- Beilin, J.; Ball, E. M.; Favaloro, J. M.; Zajac, J. D. (2000): Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. In: *Journal of molecular endocrinology* 25 (1), S. 85–96.
- Benten, W. P.; Lieberherr, M.; Stamm, O.; Wrehlke, C.; Guo, Z.; Wunderlich, F. (1999): Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. In: *Molecular biology of the cell* 10 (10), S. 3113–3123.
- Bhasin, Shalender; Pencina, Michael; Jasuja, Guneet Kaur; Travison, Thomas G.; Coviello, Andrea; Orwoll, Eric et al. (2011): Reference ranges for testosterone in men generated using liquid chromatography tandem mass spectrometry in a community-based sample of healthy nonobese young men in the Framingham Heart Study and applied to three geographically distinct cohorts. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96 (8), S. 2430–2439.
- Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F. et al. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. In: *Nature* 385 (6618), S. 729–733.
- Blouin, Karine; Boivin, Ariane; Tchernof, Andre (2008): Androgens and body fat distribution. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 108 (3-5), S. 272–280.

- Blouin, Karine; Despres, Jean-Pierre; Couillard, Charles; Tremblay, Angelo; Prud'homme, Denis; Bouchard, Claude; Tchernof, Andre (2005): Contribution of age and declining androgen levels to features of the metabolic syndrome in men. In: *Metabolism: clinical and experimental* 54 (8), S. 1034–1040.
- Bohnsack, Markus T.; Czaplinski, Kevin; Gorlich, Dirk (2004): Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. In: *RNA (New York, N.Y.)* 10 (2), S. 185–191.
- Boll, K.; Reiche, K.; Kasack, K.; Morbt, N.; Kretschmar, A. K.; Tomm, J. M. et al. (2013): MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. In: *Oncogene* 32 (3), S. 277–285.
- Bork, Simone; Horn, Patrick; Castoldi, Mirco; Hellwig, Isabelle; Ho, Anthony D.; Wagner, Wolfgang (2011): Adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells is down-regulated by microRNA-369-5p and up-regulated by microRNA-371. In: *Journal of cellular physiology* 226 (9), S. 2226–2234.
- Bouhaddioui, Wafae; Provost, Pierre R.; Tremblay, Yves (2016): Expression profile of androgen-modulated microRNAs in the fetal murine lung. In: *Biol Sex Differ* 7 (1), S. 226.
- Brey, Christopher W.; Nelder, Mark P.; Hailemariam, Tiruneh; Gaugler, Randy; Hashmi, Sarwar (2009): Kruppel-like family of transcription factors: an emerging new frontier in fat biology. In: *International journal of biological sciences* 5 (6), S. 622–636.
- Cai, Xuezhong; Hagedorn, Curt H.; Cullen, Bryan R. (2004): Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. In: *RNA (New York, N.Y.)* 10 (12), S. 1957–1966.
- Cai, Zhaowei; Zhang, Lifan; Chen, Minli; Jiang, Xiaoling; Xu, Ningying (2014): Castration-induced changes in microRNA expression profiles in subcutaneous adipose tissue of male pigs. In: *Journal of applied genetics* 55 (2), S. 259–266.
- Caro, J. F.; Sinha, M. K.; Kolaczynski, J. W.; Zhang, P. L.; Considine, R. V. (1996): Leptin: the tale of an obesity gene. In: *Diabetes* 45 (11), S. 1455–1462.
- Casaburi, Ivan; Cesario, Maria Grazia; Dona, Ada; Rizza, Pietro; Aquila, Saveria; Avena, Paola et al. (2016): Androgens downregulate miR-21 expression in breast cancer cells underlining the protective role of androgen receptor. In: *Oncotarget* 7 (11), S. 12651–12661.
- Chawla, A.; Lazar, M. A. (1994): Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (5), S. 1786–1790.
- Chawla, A.; Schwarz, E. J.; Dimaculangan, D. D.; Lazar, M. A. (1994): Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. In: *Endocrinology* 135 (2), S. 798–800.
- Chazenbalk, Gregorio; Singh, Prapti; Irge, Dana; Shah, Amy; Abbott, David H.; Dumesic, Daniel A. (2013): Androgens inhibit adipogenesis during human adipose stem cell commitment to preadipocyte formation. In: *Steroids* 78 (9), S. 920–926.
- Chen, Chao-Feng; Huang, Jinyu; Li, Hong; Zhang, Chu; Huang, Xurui; Tong, Guoxin; Xu, Yi-Zhou (2015)a: MicroRNA-221 regulates endothelial nitric oxide production and inflammatory response by targeting adiponectin receptor 1. In: *Gene* 565 (2), S. 246–251.
- Chen, Lin; Cui, Junhui; Hou, Jia; Long, Jie; Li, Cai; Liu, Lei (2014): A novel negative regulator of adipogenesis: microRNA-363. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (2), S. 510–520.

- Chen, Zhi; Luo, Jun; Ma, LiuAn; Wang, Hui; Cao, WenTing; Xu, HuiFei et al. (2015)b: MiR130b-Regulation of PPARgamma Coactivator- 1alpha Suppresses Fat Metabolism in Goat Mammary Epithelial Cells. In: *PLoS one* 10 (11), S. e0142809.
- Chou, Wen-Wen; Wang, Yu-Ting; Liao, Yi-Chu; Chuang, Shih-Chang; Wang, Shen-Nien; Juo, Suh-Hang Hank (2013): Decreased microRNA-221 is associated with high levels of TNF-alpha in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells from obese woman. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 32 (1), S. 127–137.
- Choy, Lisa; Derynck, Rik (2003): Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (11), S. 9609–9619.
- Christodoulides, C.; Scarda, A.; Granzotto, M.; Milan, G.; Dalla Nora, E.; Keogh, J. et al. (2006): WNT10B mutations in human obesity. In: *Diabetologia* 49 (4), S. 678–684.
- Claessens, Frank; Denayer, Sarah; van Tilborgh, Nora; Kerkhofs, Stefanie; Helsen, Christine; Haelens, Annemie (2008): Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. In: *Nuclear receptor signaling* 6, S. e008.
- Dai, J. L.; Burnstein, K. L. (1996): Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 10 (12), S. 1582–1594.
- D'Alessandra, Y.; Devanna, P.; Limana, F.; Straino, S.; Di Carlo, A.; Brambilla, P. G. et al. (2010): Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. In: *European Heart Journal* 31 (22), S. 2765–2773.
- Das, Dibash K.; Naidoo, Michelle; Ilboudo, Adeodat; Park, Jong Y.; Ali, Thahmina; Krampis, Konstantinos et al. (2016): miR-1207-3p regulates the androgen receptor in prostate cancer via FNDC1/fibronectin. In: *Experimental Cell Research* 348 (2), S. 190–200.
- Della-Fera, M. A.; Qian, H.; Baile, C. A. (2001): Adipocyte apoptosis in the regulation of body fat mass by leptin. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 3 (5), S. 299–310.
- Dieudonne, M. N.; Pecquery, R.; Boumediene, A.; Leneuve, M. C.; Giudicelli, Y. (1998): Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. In: *The American journal of physiology* 274 (6 Pt 1), S. C1645-52.
- Du, Hechun; Fu, Zimu; He, Guohua; Wang, Yuejuan; Xia, Guiyu; Fang, Min; Zhang, Tao (2015): MicroRNA-218 targets adiponectin receptor 2 to regulate adiponectin signaling. In: *Molecular medicine reports* 11 (6), S. 4701–4705.
- Esau, Christine; Kang, Xiaolin; Peralta, Eigen; Hanson, Elaine; Marcusson, Eric G.; Ravichandran, Lingamanaidu V. et al. (2004): MicroRNA-143 Regulates Adipocyte Differentiation. In: *J. Biol. Chem.* 279 (50), S. 52361–52365.
- Farooqi, I. S.; Jebb, S. A.; Langmack, G.; Lawrence, E.; Cheetham, C. H.; Prentice, A. M. et al. (1999): Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. In: *The New England journal of medicine* 341 (12), S. 879–884.
- Feingold, K. R.; Grunfeld, C. (1992): Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. In: *Diabetes* 41 Suppl 2, S. 97–101.
- Fogh, J.; Wright, W. C.; Loveless, J. D. (1977): Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. In: *Journal of the National Cancer Institute* 58 (2), S. 209–214.

- Friedman, Jeffrey (2014): 20 years of leptin: leptin at 20: an overview. In: *The Journal of endocrinology* 223 (1), S. T1-8.
- Fu, Yuchang; Luo, Nanlan; Klein, Richard L.; Garvey, W. Timothy (2005): Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. In: *Journal of lipid research* 46 (7), S. 1369–1379.
- Ge, Kai; Guermah, Mohamed; Yuan, Chao-Xing; Ito, Mitsuhiro; Wallberg, Annika E.; Spiegelman, Bruce M.; Roeder, Robert G. (2002): Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. In: *Nature* 417 (6888), S. 563–567.
- Golabi, M.; Rosen, L. (1984): A new X-linked mental retardation-overgrowth syndrome. In: *American journal of medical genetics* 17 (1), S. 345–358.
- Gregory, Richard I.; Yan, Kai-Ping; Amuthan, Govindasamy; Chendrimada, Thimmaiah; Doratotaj, Behzad; Cooch, Neil; Shiekhattar, Ramin (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. In: *Nature* 432 (7014), S. 235–240.
- Gupta, Vandana; Bhasin, Shalender; Guo, Wen; Singh, Rajan; Miki, Rika; Chauhan, Pratibha et al. (2008): Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 296 (1-2), S. 32–40.
- Hall, Susan A.; Esche, Gretchen R.; Araujo, Andre B.; Travison, Thomas G.; Clark, Richard V.; Williams, Rachel E.; McKinlay, John B. (2008): Correlates of low testosterone and symptomatic androgen deficiency in a population-based sample. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (10), S. 3870–3877.
- Hamam, D.; Ali, D.; Vishnubalaji, R.; Hamam, R.; Al-Nbaheen, M.; Chen, L. et al. (2014): microRNA-320/RUNX2 axis regulates adipocytic differentiation of human mesenchymal (skeletal) stem cells. In: *Cell Death Dis* 5 (10), S. e1499.
- Hammond, G. L.; Ruokonen, A.; Kontturi, M.; Koskela, E.; Vihko, R. (1977): The simultaneous radioimmunoassay of seven steroids in human spermatic and peripheral venous blood. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 45 (1), S. 16–24.
- Hartig, Sean M.; Feng, Qin; Ochsner, Scott A.; Xiao, Rui; McKenna, Neil J.; McGuire, Sean E.; He, Bin (2013): Androgen receptor agonism promotes an osteogenic gene program in preadipocytes. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434 (2), S. 357–362.
- Haurer, H.; Petruschke, T.; Russ, M.; Rohrig, K.; Eckel, J. (1995): Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. In: *Diabetologia* 38 (7), S. 764–771.
- He, Honghui; Chen, Ke; Wang, Fang; Zhao, Liling; Wan, Xinxing; Wang, Linghao; Mo, Zhaohui (2015): miR-204-5p promotes the adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by modulating DVL3 expression and suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. In: *Int J Mol Med*.
- Hill, Christopher G.; Jabbari, Neda; Matyunina, Lilya V.; McDonald, John F. (2014): Functional and evolutionary significance of human microRNA seed region mutations. In: *PloS one* 9 (12), S. e115241.
- Hong, Jeong-Ho; Hwang, Eun Sook; McManus, Michael T.; Amsterdam, Adam; Tian, Yu; Kalmukova, Ralitsa et al. (2005): TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. In: *Science (New York, N.Y.)* 309 (5737), S. 1074–1078.

- Horenburg, S.; Fischer-Posovszky, P.; Debatin, K.-M.; Wabitsch, M. (2008): Influence of Sex Hormones on Adiponectin Expression in Human Adipocytes. In: *Horm Metab Res* 40 (11), S. 779–786.
- Horton, R.; Tait, J. F. (1966): Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone. In: *The Journal of clinical investigation* 45 (3), S. 301–313.
- Hotamisligil, G. S. (1999): The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance. In: *Journal of internal medicine* 245 (6), S. 621–625.
- Hotamisligil, G. S.; Arner, P.; Atkinson, R. L.; Spiegelman, B. M. (1997): Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. In: *Diabetes* 46 (3), S. 451–455.
- Hotamisligil, G. S.; Shargill, N. S.; Spiegelman, B. M. (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5091), S. 87–91.
- Huang, Chiung-Kuei; Lai, Kuo-Pao; Luo, Jie; Tsai, Meng-Yin; Kang, Hong-Yo; Chen, Yuhchyou et al. (2013): Loss of androgen receptor promotes adipogenesis but suppresses osteogenesis in bone marrow stromal cells. In: *Stem Cell Research* 11 (2), S. 938–950.
- Huang, Jyun-Yuan; Chou, Shu-Fan; Lee, Jun-Wei; Chen, Hung-Lin; Chen, Chun-Ming; Tao, Mi-Hua; Shih, Chiaho (2015): MicroRNA-130a can inhibit hepatitis B virus replication via targeting PGC1 $\alpha$  and PPAR $\gamma$ . In: *RNA (New York, N.Y.)* 21 (3), S. 385–400.
- Hube, F.; Hauner, H. (1999): The role of TNF- $\alpha$  in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 31 (12), S. 626–631.
- Hutvagner, Gyorgy; Zamore, Phillip D. (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5589), S. 2056–2060.
- Ishida, Masayoshi; Shimabukuro, Michio; Yagi, Shusuke; Nishimoto, Sachiko; Kozuka, Chisayo; Fukuda, Daiju et al. (2014): MicroRNA-378 regulates adiponectin expression in adipose tissue: a new plausible mechanism. In: *PloS one* 9 (11), S. e111537.
- Isomaa, B.; Almgren, P.; Tuomi, T.; Forsen, B.; Lahti, K.; Nissen, M. et al. (2001): Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. In: *Diabetes care* 24 (4), S. 683–689.
- Iwashima, Yoshio; Katsuya, Tomohiro; Ishikawa, Kazuhiko; Ouchi, Noriyuki; Ohishi, Mitsuru; Sugimoto, Ken et al. (2004): Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 43 (6), S. 1318–1323.
- Jeong, B-C; Kang, I-H; Hwang, Y-C; Kim, S-H; Koh, J-T (2014): MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression. In: *Cell Death Dis* 5 (11), S. e1532.
- Karbiener, Michael; Fischer, Christoph; Nowitsch, Susanne; Opriessnig, Peter; Papak, Christine; Ailhaud, Gerard et al. (2009): microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR $\gamma$ . In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 (2), S. 247–251.
- Karbiener, Michael; Neuhold, Claudia; Opriessnig, Peter; Prokesch, Andreas; Bogner-Strauss, Juliane G.; Scheideler, Marcel (2014)a: MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. In: *RNA Biology* 8 (5), S. 850–860.

- Karbiener, Michael; Pisani, Didier F.; Frontini, Andrea; Oberreiter, Lisa M.; Lang, Eleonore; Vegiopoulos, Alexandros et al. (2014)b: MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (6), S. 1578–1590.
- Karolina, Dwi Setyowati; Tavintharan, Subramaniam; Armugam, Arunmozhiarasi; Sepramaniam, Sugunavathi; Pek, Sharon Li Ting; Wong, Michael T K et al. (2012): Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. In: *J Clin Endocrinol Metab* 97 (12), S. E2271-6.
- Kaufman, Jean M.; Vermeulen, Alex (2005): The Decline of Androgen Levels in Elderly Men and Its Clinical and Therapeutic Implications. In: *Endocrine Reviews* 26 (6), S. 833–876.
- Keating, Nancy L.; O'Malley, A. James; Smith, Matthew R. (2006): Diabetes and cardiovascular disease during androgen deprivation therapy for prostate cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (27), S. 4448–4456.
- Kemppainen, J. A.; Lane, M. V.; Sar, M.; Wilson, E. M. (1992): Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (2), S. 968–974.
- Kern, P. A.; Saghizadeh, M.; Ong, J. M.; Bosch, R. J.; Deem, R.; Simsolo, R. B. (1995): The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. In: *The Journal of clinical investigation* 95 (5), S. 2111–2119.
- Kern, Philip A.; Di Gregorio, Gina B; Lu, Tong; Rassouli, Negah; Ranganathan, Gouri (2003): Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. In: *Diabetes* 52 (7), S. 1779–1785.
- Khvorova, Anastasia; Reynolds, Angela; Jayasena, Sumedha D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. In: *Cell* 115 (2), S. 209–216.
- Kim, Chongtae; Lee, Heejin; Cho, Yoon Mi; Kwon, Oh-Joo; Kim, Wook; Lee, Eun Kyung (2013): TNF $\alpha$ -induced miR-130 resulted in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation. In: *FEBS letters*.
- Kim, J. B.; Spiegelman, B. M. (1996): ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. In: *Genes & development* 10 (9), S. 1096–1107.
- Kim, Ja-Young; van de Wall, Esther; Laplante, Mathieu; Azzara, Anthony; Trujillo, Maria E.; Hofmann, Susanna M. et al. (2007): Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (9), S. 2621–2637.
- Kim, Sang Yun; Kim, A. Young; Lee, Hyun Woo; Son, You Hwa; Lee, Gha Young; Lee, Joo-Won et al. (2010): miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR $\gamma$  expression. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392 (3), S. 323–328.
- Kim, Yeon Jeong; Hwang, Soo Hyun; Lee, Sun Young; Shin, Keun Koo; Cho, Hyun Hwa; Bae, Yong Chan; Jung, Jin Sup (2012): miR-486-5p induces replicative senescence of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and its expression is controlled by high glucose. In: *Stem cells and development* 21 (10), S. 1749–1760.
- Kim, Yeon Jeong; Hwang, Soo Jin; Bae, Yong Chan; Jung, Jin Sup (2009): miR-21 Regulates Adipogenic Differentiation Through the Modulation of TGF- $\beta$  Signaling in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. In: *Stem Cells*, S. N/A.



- Kinoshita, Minako; Ono, Koh; Horie, Takahiro; Nagao, Kazuya; Nishi, Hitoo; Kuwabara, Yasuhide et al. (2010): Regulation of Adipocyte Differentiation by Activation of Serotonin (5-HT) Receptors 5-HT 2A R and 5-HT 2C R and Involvement of MicroRNA-448-Mediated Repression of KLF5. In: *Molecular Endocrinology* 24 (10), S. 1978–1987.
- Knobil, E. (1990): The GnRH pulse generator. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 163 (5 Pt 2), S. 1721–1727.
- Körner, Antje; Wabitsch, Martin; Seidel, Bertolt; Fischer-Posovszky, Pamela; Berthold, Antje; Stumvoll, Michael et al. (2005): Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight. In: *Biochem Biophys Res Commun* 337 (2), S. 540–550.
- Kraus, Matthias; Greither, Thomas; Wenzel, Carina; Brauer-Hartmann, Daniela; Wabitsch, Martin; Behre, Hermann M. (2015): Inhibition of adipogenic differentiation of human SGBS preadipocytes by androgen-regulated microRNA miR-375. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 414, S. 177–185.
- Krek, Azra; Grun, Dominic; Poy, Matthew N.; Wolf, Rachel; Rosenberg, Lauren; Epstein, Eric J. et al. (2005): Combinatorial microRNA target predictions. In: *Nature genetics* 37 (5), S. 495–500.
- Kumar, Binod; Khaleghzadegan, Salar; Mears, Brian; Hatano, Koji; Kudrolli, Tarana A.; Chowdhury, Wasim H. et al. (2016): Identification of miR-30b-3p and miR-30d-5p as direct regulators of androgen receptor signaling in prostate cancer by complementary functional microRNA library screening. In: *Oncotarget* 7 (45), S. 72593–72607.
- Kupelian, Varant; Page, Stephanie T.; Araujo, Andre B.; Travison, Thomas G.; Bremner, William J.; McKinlay, John B. (2006): Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91 (3), S. 843–850.
- Laaksonen, David E.; Niskanen, Leo; Punnonen, Kari; Nyysönen, Kristiina; Tuomainen, Tomi-Pekka; Valkonen, Veli-Pekka et al. (2004): Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. In: *Diabetes care* 27 (5), S. 1036–1041.
- Lagos-Quintana, Mariana; Rauhut, Reinhard; Yalcin, Abdullah; Meyer, Jutta; Lendeckel, Winfried; Tuschl, Thomas (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. In: *Current biology : CB* 12 (9), S. 735–739.
- Laine, Salla K.; Alm, Jessica J.; Virtanen, Sanna P.; Aro, Hannu T.; Laitala-Leinonen, Tiina K. (2012): MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Journal of cellular biochemistry* 113 (8), S. 2687–2695.
- Lara-Castro, Cristina; Luo, Nanlan; Wallace, Penny; Klein, Richard L.; Garvey, W. Timothy (2006): Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. In: *Diabetes* 55 (1), S. 249–259.
- Lau, N. C.; Lim, L. P.; Weinstein, E. G.; Bartel, D. P. (2001): An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543), S. 858–862.
- Lau, Pick-Wei; Guiley, Keelan Z.; De, Nabanita; Potter, Clinton S.; Carragher, Bridget; MacRae, Ian J. (2012): The molecular architecture of human Dicer. In: *Nat Struct Mol Biol* 19 (4), S. 436–440.

- Lau, David C W; Dhillon, Bikramjit; Yan, Hongyun; Szmitko, Paul E.; Verma, Subodh (2005): Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288 (5), S. H2031-41.
- Laughlin, Gail A.; Barrett-Connor, Elizabeth; May, Susanne; Langenberg, Claudia (2007): Association of adiponectin with coronary heart disease and mortality: the Rancho Bernardo study. In: *American journal of epidemiology* 165 (2), S. 164–174.
- Le Lu; Wang, Jinlong; Lu, Hongwei; Zhang, Guoyu; Liu, Yang; Wang, Jiazhong et al. (2015): MicroRNA-130a and -130b enhance activation of hepatic stellate cells by suppressing PPARgamma expression: A rat fibrosis model study. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 465 (3), S. 387–393.
- Lee, Eun Kyung; Lee, Mi Jeong; Abdelmohsen, Kotb; Kim, Wook; Kim, Mihee M.; Srikantan, Subramanya et al. (2011): miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. In: *Mol Cell Biol* 31 (4), S. 626–638.
- Lee, Mi-Hye; Klein, Richard L.; El-Shewy, Hesham M.; Luttrell, Deirdre K.; Luttrell, Louis M. (2008): The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. In: *Biochemistry* 47 (44), S. 11682–11692.
- Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854.
- Lee, Yoontae; Ahn, Chiyong; Han, Jinju; Choi, Hyounjeong; Kim, Jaekwang; Yim, Jeongbin et al. (2003): The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. In: *Nature* 425 (6956), S. 415–419.
- Lee, Yoontae; Jeon, Kipyong; Lee, Jun-Tae; Kim, Sunyoung; Kim, V. Narry (2002): MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. In: *The EMBO journal* 21 (17), S. 4663–4670.
- Lee, Yoontae; Kim, Minju; Han, Jinju; Yeom, Kyu-Hyun; Lee, Sanghyuk; Baek, Sung Hee; Kim, V. Narry (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *The EMBO journal* 23 (20), S. 4051–4060.
- Lewis, Benjamin P.; Shih, I-hung; Jones-Rhoades, Matthew W.; Bartel, David P.; Burge, Christopher B. (2003): Prediction of mammalian microRNA targets. In: *Cell* 115 (7), S. 787–798.
- Li, Hongling; Li, Tangping; Wang, Shihua; Wei, Jianfeng; Fan, Junfen; Li, Jing et al. (2013)a: miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. In: *Stem Cell Research* 10 (3), S. 313–324.
- Li, Hongyi; Chen, Xiao; Guan, Lizeng; Qi, Qien; Shu, Gang; Jiang, Qingyan et al. (2013)b: MiRNA-181a regulates adipogenesis by targeting tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the porcine model. In: *PLoS one* 8 (10), S. e71568.
- Li, Hui; Xue, Mei; Xu, Jing; Qin, Xiaohong (2016): MiR-301a is involved in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation via suppression of PPARgamma. In: *Die Pharmazie* 71 (2), S. 84–88.
- Licinio, Julio; Caglayan, Sinan; Ozata, Metin; Yildiz, Bulent O.; de Miranda, Patricia B; O'Kirwan, Fiona et al. (2004): Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (13), S. 4531–4536.

- Lindsay, S.; Ireland, M.; O'Brien, O.; Clayton-Smith, J.; Hurst, J. A.; Mann, J. et al. (1997): Large scale deletions in the GPC3 gene may account for a minority of cases of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. In: *Journal of medical genetics* 34 (6), S. 480–483.
- Liu, Sanhong; Yang, Ying; Wu, Jiarui (2011): TNF $\alpha$ -induced up-regulation of miR-155 inhibits adipogenesis by down-regulating early adipogenic transcription factors. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414 (3), S. 618–624.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408.
- Lu, Jun; Getz, Gad; Miska, Eric A.; Alvarez-Saavedra, Ezequiel; Lamb, Justin; Peck, David et al. (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. In: *Nature* 435 (7043), S. 834–838.
- Maeda, Norikazu; Shimomura, Ichihiro; Kishida, Ken; Nishizawa, Hitoshi; Matsuda, Morihiko; Nagaretani, Hiroyuki et al. (2002): Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. In: *Nature medicine* 8 (7), S. 731–737.
- Malkin, Chris J.; Pugh, Peter J.; Jones, Richard D.; Kapoor, Dheeraj; Channer, Kevin S.; Jones, T. Hugh (2004): The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (7), S. 3313–3318.
- Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K. et al. (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. In: *Cell* 83 (6), S. 835–839.
- Marin, P.; Holmang, S.; Gustafsson, C.; Jonsson, L.; Kvist, H.; Elander, A. et al. (1993): Androgen treatment of abdominally obese men. In: *Obesity research* 1 (4), S. 245–251.
- Martinelli, Rosanna; Nardelli, Carmela; Piloni, Vincenzo; Buonomo, Tonia; Liguori, Rosario; Castanò, Ilenia et al. (2010): miR-519d Overexpression Is Associated With Human Obesity. In: *Obesity* 18 (11), S. 2170–2176.
- Mei, Yang; Bian, Chunjing; Li, Jing; Du, Zhijian; Zhou, Hong; Yang, Zhuo; Zhao, Robert C H (2013): miR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation. In: *Journal of cellular biochemistry* 114 (6), S. 1374–1384.
- Mendoza-Nunez, Victor Manuel; Garcia-Sanchez, Angel; Sanchez-Rodriguez, Martha; Galvan-Duarte, Rosa Elba; Fonseca-Yerena, Maria Eugenia (2002): Overweight, waist circumference, age, gender, and insulin resistance as risk factors for hyperleptinemia. In: *Obesity research* 10 (4), S. 253–259.
- Meng, Shu; Cao, Jiatian; Zhang, Xiaoping; Fan, Yuqi; Fang, Lu; Wang, Changqian et al. (2013): Downregulation of microRNA-130a contributes to endothelial progenitor cell dysfunction in diabetic patients via its target Runx3. In: *PloS one* 8 (7), S. e68611.
- <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>, aufgerufen am 28.03.2017, 10.15 Uhr
- Mohamed-Ali, V.; Goodrick, S.; Rawesh, A.; Katz, D. R.; Miles, J. M.; Yudkin, J. S. et al. (1997): Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82 (12), S. 4196–4200.
- Montague, C. T.; Prins, J. B.; Sanders, L.; Zhang, J.; Sewter, C. P.; Digby, J. et al. (1998): Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. In: *Diabetes* 47 (9), S. 1384–1391.

- Mori, Toshiyuki; Sakaue, Hiroshi; Iguchi, Haruhisa; Gomi, Hideyuki; Okada, Yuko; Takashima, Yasuhiro et al. (2005): Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (13), S. 12867–12875.
- Mueller, Elisabetta; Drori, Stavit; Aiyer, Anita; Yie, Junming; Sarraf, Pasha; Chen, Hong et al. (2002): Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (44), S. 41925–41930.
- Muller, Majon; Grobbee, Diederick E.; den Tonkelaar, Isolde; Lamberts, Steven W J; van der Schouw, Yvonne T (2005): Endogenous sex hormones and metabolic syndrome in aging men. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (5), S. 2618–2623.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/367>, aufgerufen am 03.02.2017, 11.30 Uhr
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>, aufgerufen am 06.02.2017, 13.10 Uhr
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23365>, aufgerufen am 06.02.2017, 13.40 Uhr
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51655>, aufgerufen am 06.02.2017, 14.30 Uhr
- Neaves, W. B.; Johnson, L.; Porter, J. C.; Parker, C R Jr; Petty, C. S. (1984): Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 59 (4), S. 756–763.
- Ng, Marie; Fleming, Tom; Robinson, Margaret; Thomson, Blake; Graetz, Nicholas; Margono, Christopher et al. (2014): Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In: *Lancet (London, England)* 384 (9945), S. 766–781.
- Nieschlag E, Behre HM: *Testosterone, Action, Deficiency, Substitution*, 4. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, 2012; S.21
- Nieschlag E, Behre HM: *Testosterone, Action, Deficiency, Substitution*, 4. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, 2012; pp. 24-25
- Nieschlag E, Behre HM: *Testosterone, Action, Deficiency, Substitution*, 4. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge, 2012; pp. 114-115
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S: *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 2009, S. 38-41
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S: *Andrologie, Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 2009, S. 111
- Nieschlag, E.; Swerdloff, R.; Behre, H. M.; Gooren, L. J.; Kaufman, J. M.; Legros, J-J et al. (2005): Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. In: *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male* 8 (2), S. 56–58.
- Nilsson, Emeli M.; Laursen, Kristian B.; Whitchurch, Jonathan; McWilliam, Andrew; Odum, Niels; Persson, Jenny L. et al. (2015): MiR137 is an androgen regulated repressor of an extended network of transcriptional coregulators. In: *Oncotarget* 6 (34), S. 35710–35725.
- Nishizawa, Hitoshi; Shimomura, Ichihiro; Kishida, Ken; Maeda, Norikazu; Kuriyama, Hiroshi; Nagaretani, Hiroyuki et al. (2002): Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. In: *Diabetes* 51 (9), S. 2734–2741.
- Oishi, Yumiko; Manabe, Ichiro; Tobe, Kazuyuki; Tsushima, Kensuke; Shindo, Takayuki; Fujiu, Katsuhito et al. (2005): Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. In: *Cell Metabolism* 1 (1), S. 27–39.

- Ortega, F. J.; Mercader, J. M.; Catalan, V.; Moreno-Navarrete, J. M.; Pueyo, N.; Sabater, M. et al. (2013): Targeting the Circulating MicroRNA Signature of Obesity. In: *Clinical Chemistry* 59 (5), S. 781–792.
- Ortega, Francisco J.; Moreno-Navarrete, José M.; Pardo, Gerard; Sabater, Monica; Hummel, Manuela; Ferrer, Anna et al. (2010): MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. In: *PloS one* 5 (2), S. e9022.
- Pajvani, Utpal B.; Du, Xuiliang; Combs, Terry P.; Berg, Anders H.; Rajala, Michael W.; Schulthess, Therese et al. (2003): Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (11), S. 9073–9085.
- Pang, Lingxia; You, Lianghai; Ji, Chenbo; Shi, Chunmei; Chen, Ling; Yang, Lei et al. (2016): miR-1275 inhibits adipogenesis via ELK1 and its expression decreases in obese subjects. In: *Journal of molecular endocrinology* 57 (1), S. 33–43.
- Panneerdoss, Subbarayalu; Chang, Yao-Fu; Buddavarapu, Kalyan C.; Chen, Hung-I Harry; Shetty, Gunapala; Wang, Huizhen et al. (2012): Androgen-responsive microRNAs in mouse Sertoli cells. In: *PLoS One* 7 (7), S. e41146.
- Park, Jong-Eun; Heo, Inha; Tian, Yuan; Simanshu, Dharendra K.; Chang, Hyesik; Jee, David et al. (2011): Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. In: *Nature* 475 (7355), S. 201–205.
- Petruschke, T.; Hauner, H. (1993): Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76 (3), S. 742–747.
- Prats-Puig, Anna; Ortega, Francisco J.; Mercader, Josep M.; Moreno-Navarrete, Jose M.; Moreno, Maria; Bonet, Nuria et al. (2013): Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. In: *J Clin Endocrinol Metab*.
- Prins, J. B.; Niesler, C. U.; Winterford, C. M.; Bright, N. A.; Siddle, K.; O'Rahilly, S. et al. (1997): Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. In: *Diabetes* 46 (12), S. 1939–1944.
- Pye, S. R.; Huhtaniemi, I. T.; Finn, J. D.; Lee, D. M.; O'Neill, T. W.; Tajar, A. et al. (2014): Late-onset hypogonadism and mortality in aging men. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99 (4), S. 1357–1366.
- Qadir, Abdul S.; Lee, Hye-Lim; Baek, Kyung Hwa; Park, Hyun-Jung; Woo, Kyung Mi; Ryoo, Hyun-Mo; Baek, Jeong-Hwa (2011): Msx2 is required for TNF-alpha-induced canonical Wnt signaling in 3T3-L1 preadipocytes. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408 (3), S. 399–404.
- Qin, Limei; Chen, Yaosheng; Niu, Yuna; Chen, Weiquan; Wang, Qiwei; Xiao, Shuqi et al. (2010): A deep investigation into the adipogenesis mechanism: Profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. In: *BMC genomics* 11 (1), S. 320.
- Resko, J. A.; Eik-nes, K. B. (1966): Diurnal testosterone levels in peripheral plasma of human male subjects. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 26 (5), S. 573–576.
- Ridker, P. M.; Rifai, N.; Pfeffer, M.; Sacks, F.; Lepage, S.; Braunwald, E. (2000): Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. In: *Circulation* 101 (18), S. 2149–2153.

[http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht\\_Adipositas/Adipositas\\_TAB.html](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht_Adipositas/Adipositas_TAB.html), aufgerufen am 02.02.2017, 15.30 Uhr

Rockstroh, Denise; Löffler, Dennis; Kiess, Wieland; Landgraf, Kathrin; Körner, Antje (2016): Regulation of human adipogenesis by miR125b-5p. In: *Adipocyte* 5 (3), S. 283–297.

Rodriguez, Antony; Griffiths-Jones, Sam; Ashurst, Jennifer L.; Bradley, Allan (2004): Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. In: *Genome Research* 14 (10a), S. 1902–1910.

Rosen, E. D.; Sarraf, P.; Troy, A. E.; Bradwin, G.; Moore, K.; Milstone, D. S. et al. (1999): PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. In: *Molecular cell* 4 (4), S. 611–617.

Rosen, Evan D.; Hsu, Chung-Hsin; Wang, Xinzhong; Sakai, Shuichi; Freeman, Mason W.; Gonzalez, Frank J.; Spiegelman, Bruce M. (2002): C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. In: *Genes & development* 16 (1), S. 22–26.

Rosen, Evan D.; MacDougald, Ormond A. (2006): Adipocyte differentiation from the inside out. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (12), S. 885–896.

Ross, S. E.; Hemati, N.; Longo, K. A.; Bennett, C. N.; Lucas, P. C.; Erickson, R. L.; MacDougald, O. A. (2000): Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5481), S. 950–953.

Sainz, Neira; Barrenetxe, Jaione; Moreno-Aliaga, Maria J.; Martinez, Jose Alfredo (2015): Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. In: *Metabolism: clinical and experimental* 64 (1), S. 35–46.

Sato, Hiromi; Sugai, Hana; Kurosaki, Hiroshi; Ishikawa, Momoko; Funaki, Asami; Kimura, Yuki; Ueno, Koichi (2013): The effect of sex hormones on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activity in mature adipocytes. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 36 (4), S. 564–573.

Scaravilli, Mauro; Kivinummi, Kati; Visakorpi, Tapio; Latonen, Leena (2016): Measuring the Expression of microRNAs Regulated by Androgens. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1443, S. 151–163.

Shi, Chunmei; Zhang, Min; Tong, Meiling; Yang, Lei; Pang, Lingxia; Chen, Ling et al. (2015): miR-148a is Associated with Obesity and Modulates Adipocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through Wnt Signaling. In: *Sci. Rep.* 5, S. 9930.

Shi, Xu-Bao; Xue, Lingru; Yang, Joy; Ma, Ai-Hong; Zhao, Jianjun; Xu, Ma et al. (2007): An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (50), S. 19983–19988.

Shi, Yaqin; Yang, Fang; Sun, Zijia; Zhang, Wenwen; Gu, Jun; Guan, Xiaoxiang (2017): Differential microRNA expression is associated with androgen receptor expression in breast cancer. In: *Molecular medicine reports* 15 (1), S. 29–36.

Shin, Keun Koo; Kim, Young Suk; Kim, Jee Young; Bae, Yong Chan; Jung, Jin Sup (2014): miR-137 Controls Proliferation and Differentiation of Human Adipose Tissue Stromal Cells. In: *Cell Physiol Biochem* 33 (3), S. 758–768.

Simpson, J. L.; Landey, S.; New, M.; German, J. (1975): A previously unrecognized X-linked syndrome of dysmorphia. In: *Birth defects original article series* 11 (2), S. 18–24.

Singh, J.; O'Neill, C.; Handelsman, D. J. (1995): Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. In: *Endocrinology* 136 (12), S. 5311–5321.

- Singh, Rajan; Artaza, Jorge N.; Taylor, Wayne E.; Braga, Melissa; Yuan, Xin; Gonzalez-Cadavid, Nestor F.; Bhasin, Shalender (2006): Testosterone Inhibits Adipogenic Differentiation in 3T3-L1 Cells: Nuclear Translocation of Androgen Receptor Complex with  $\beta$ -Catenin and T-Cell Factor 4 May Bypass Canonical Wnt Signaling to Down-Regulate Adipogenic Transcription Factors. In: *Endocrinology* 147 (1), S. 141–154.
- Singh, Rajan; Artaza, Jorge N.; Taylor, Wayne E.; Gonzalez-Cadavid, Nestor F.; Bhasin, Shalender (2003): Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. In: *Endocrinology* 144 (11), S. 5081–5088.
- Singh, Sunit K.; Pal Bhadra, Manika; Girschick, Hermann J.; Bhadra, Utpal (2008): MicroRNAs--micro in size but macro in function. In: *The FEBS journal* 275 (20), S. 4929–4944.
- Siomi, Haruhiko; Siomi, Mikiko C. (2010): Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. In: *Molecular cell* 38 (3), S. 323–332.
- Skarn, Magne; Namlos, Heidi M.; Noordhuis, Paul; Wang, Meng-Yu; Meza-Zepeda, Leonardo A.; Myklebost, Ola (2012): Adipocyte differentiation of human bone marrow-derived stromal cells is modulated by microRNA-155, microRNA-221, and microRNA-222. In: *Stem cells and development* 21 (6), S. 873–883.
- Skurk, Thomas; Alberti-Huber, Catherine; Herder, Christian; Hauner, Hans (2007): Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92 (3), S. 1023–1033.
- Spranger, Joachim; Kroke, Anja; Mohlig, Matthias; Bergmann, Manuela M.; Ristow, Michael; Boeing, Heiner; Pfeiffer, Andreas F H (2003): Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. In: *Lancet (London, England)* 361 (9353), S. 226–228.
- Stanworth, R. D.; Kapoor, D.; Channer, K. S.; Jones, T. H. (2008): Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes. In: *European journal of endocrinology* 159 (6), S. 739–746.
- Stephens, J. M.; Pekala, P. H. (1991): Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (32), S. 21839–21845.
- Sun, Fenyong; Wang, Jiayi; Pan, Qiuhui; Yu, Yongchun; Zhang, Yue; Wan, Yang et al. (2009): Characterization of function and regulation of miR-24-1 and miR-31. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 380 (3), S. 660–665.
- Tamori, Yoshikazu; Masugi, Jiro; Nishino, Naonobu; Kasuga, Masato (2002): Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. In: *Diabetes* 51 (7), S. 2045–2055.
- Tanaka, T.; Yoshida, N.; Kishimoto, T.; Akira, S. (1997): Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. In: *The EMBO journal* 16 (24), S. 7432–7443.
- Tang, Yan-Feng; Zhang, Yong; Li, Xiao-Yu; Li, Cai; Tian, Weidong; Liu, Lei (2009): Expression of miR-31, miR-125b-5p, and miR-326 in the adipogenic differentiation process of adipose-derived stem cells. In: *OmicS : a journal of integrative biology* 13 (4), S. 331–336.
- [http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir\\_sc=miR-130-3p%2F301-3p%2F454-3p&mir\\_c=&mir\\_nc=&mir\\_vnc=&mirg=](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=miR-130-3p%2F301-3p%2F454-3p&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=), aufgerufen am 10.02.2017, 16.30 Uhr

- Tome, M.; Lopez-Romero, P.; Albo, C.; Sepulveda, J. C.; Fernandez-Gutierrez, B.; Dopazo, A. et al. (2011): miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. In: *Cell death and differentiation* 18 (6), S. 985–995.
- Tong, Qiang; Tsai, Judy; Tan, Guo; Dalgin, Gokhan; Hotamisligil, Gokhan S. (2005): Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. In: *Molecular and cellular biology* 25 (2), S. 706–715.
- Tontonoz, P.; Hu, E.; Graves, R. A.; Budavari, A. I.; Spiegelman, B. M. (1994)a: mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. In: *Genes & development* 8 (10), S. 1224–1234.
- Tontonoz, P.; Hu, E.; Spiegelman, B. M. (1994)b: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. In: *Cell* 79 (7), S. 1147–1156.
- Tsai, E. C.; Boyko, E. J.; Leonetti, D. L.; Fujimoto, W. Y. (2000): Low serum testosterone level as a predictor of increased visceral fat in Japanese-American men. In: *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 24 (4), S. 485–491.
- Tsutsumi, Akihisa; Kawamata, Tomoko; Izumi, Natsuko; Seitz, Herve; Tomari, Yukihide (2011): Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1. In: *Nature structural & molecular biology* 18 (10), S. 1153–1158.
- Valencia-Sanchez, Marco Antonio; Liu, Jidong; Hannon, Gregory J.; Parker, Roy (2006): Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. In: *Genes & development* 20 (5), S. 515–524.
- Veldhuis, J. D.; King, J. C.; Urban, R. J.; Rogol, A. D.; Evans, W. S.; Kolp, L. A.; Johnson, M. L. (1987): Operating characteristics of the male hypothalamo-pituitary-gonadal axis: pulsatile release of testosterone and follicle-stimulating hormone and their temporal coupling with luteinizing hormone. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 65 (5), S. 929–941.
- Wabitsch, M.; Blum, W. F.; Muehe, R.; Braun, M.; Hube, F.; Rascher, W. et al. (1997): Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. In: *The Journal of clinical investigation* 100 (4), S. 808–813.
- Wabitsch, M.; Brenner, R. E.; Melzner, I.; Braun, M.; Moller, P.; Heinze, E. et al. (2001): Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. In: *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 (1), S. 8–15.
- Wajchenberg, B. L.; Giannella-Neto, D.; da Silva, M E; Santos, R. F. (2002): Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 34 (11-12), S. 616–621.
- Wan, Xuechao; Huang, Wenhua; Yang, Shu; Zhang, Yalong; Zhang, Pu; Kong, Zhe et al. (2016): Androgen-induced miR-27A acted as a tumor suppressor by targeting MAP2K4 and mediated prostate cancer progression. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 79, S. 249–260.
- Wang, C.; Nieschlag, E.; Swerdloff, R.; Behre, H. M.; Hellstrom, W. J.; Gooren, L. J. et al. (2008)a: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations. In: *European journal of endocrinology* 159 (5), S. 507–514.



- Wang, Guohua; Wang, Yadong; Feng, Weixing; Wang, Xin; Yang, Jack Y.; Zhao, Yuming et al. (2008)b: Transcription factor and microRNA regulation in androgen-dependent and -independent prostate cancer cells. In: *BMC genomics* 9 Suppl 2, S. S22.
- Wang, Liang; Xu, Lei; Xu, Min; Liu, Guoqiang; Xing, Jian; Sun, Caifeng; Ding, Huifang (2015): Obesity-Associated MiR-342-3p Promotes Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells by Suppressing CtBP2 and Releasing C/EBPalpha from CtBP2 Binding. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 35 (6), S. 2285–2298.
- Wang, N. D.; Finegold, M. J.; Bradley, A.; Ou, C. N.; Abdelsayed, S. V.; Wilde, M. D. et al. (1995): Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. In: *Science (New York, N.Y.)* 269 (5227), S. 1108–1112.
- Wang, Yu-cheng; Li, Yuying; Wang, Xin-yi; Zhang, Duo; Zhang, Huihui; Wu, Qi et al. (2013): Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. In: *Diabetologia* 56 (10), S. 2275–2285.
- Watson, C. S. (1999): Signaling themes shared between peptide and steroid hormones at the plasma membrane. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 1999 (12), S. PE1.
- Weyer, C.; Funahashi, T.; Tanaka, S.; Hotta, K.; Matsuzawa, Y.; Pratley, R. E.; Tataranni, P. A. (2001): Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86 (5), S. 1930–1935.
- Wightman, B.; Burglin, T. R.; Gatto, J.; Arasu, P.; Ruvkun, G. (1991): Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. In: *Genes & development* 5 (10), S. 1813–1824.
- Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. In: *Cell* 75 (5), S. 855–862.
- Wu, Frederick C W; Tajar, Abdelouahid; Beynon, Jennifer M.; Pye, Stephen R.; Silman, Alan J.; Finn, Joseph D. et al. (2010): Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. In: *The New England journal of medicine* 363 (2), S. 123–135.
- Wu, Frederick C W; Tajar, Abdelouahid; Pye, Stephen R.; Silman, Alan J.; Finn, Joseph D.; O'Neill, Terence W. et al. (2008): Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European Male Aging Study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (7), S. 2737–2745.
- Xu, Aimin; Chan, Kok Weng; Hoo, Ruby L C; Wang, Yu; Tan, Kathryn C B; Zhang, Jialiang et al. (2005): Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (18), S. 18073–18080.
- Xu, Guangfeng; Ji, Chenbo; Shi, Chunmei; Fu, Hailong; Zhu, Lingling; Zhu, Lu et al. (2013): Modulation of hsa-miR-26b levels following adipokine stimulation. In: *Mol Biol Rep* 40 (5), S. 3577–3582.
- Xu, Lu-lian; Shi, Chun-mei; Xu, Guang-feng; Chen, Ling; Zhu, Ling-ling; Zhu, Lu et al. (2014): TNF-alpha, IL-6, and leptin increase the expression of miR-378, an adipogenesis-related microRNA in human adipocytes. In: *Cell biochemistry and biophysics* 70 (2), S. 771–776.
- Xu, X. F.; Pergola, G. de; Bjorntorp, P. (1991): Testosterone increases lipolysis and the number of beta-adrenoceptors in male rat adipocytes. In: *Endocrinology* 128 (1), S. 379–382.

- Yang, Lei; Shi, Chun-mei; Chen, Ling; Pang, Ling-xia; Xu, Guang-feng; Gu, Nan et al. (2015): The biological effects of hsa-miR-1908 in human adipocytes. In: *Molecular biology reports* 42 (5), S. 927–935.
- Yang, Zhuo; Bian, Chunjing; Zhou, Hong; Huang, Shan; Wang, Shihua; Liao, Lianming; Zhao, Robert Chunhua (2011): MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID-1. In: *Stem cells and development* 20 (2), S. 259–267.
- Yates, Luke A.; Norbury, Chris J.; Gilbert, Robert J C (2013): The long and short of microRNA. In: *Cell* 153 (3), S. 516–519.
- Zaragosi, Laure-Emmanuelle; Wdziekonski, Brigitte; Brigand, Kevin; Villageois, Phi; Mari, Bernard; Waldmann, Rainer et al. (2011): Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. In: *Genome Biol* 12 (7), S. R64.
- Zhang, B.; Berger, J.; Hu, E.; Szalkowski, D.; White-Carrington, S.; Spiegelman, B. M.; Moller, D. E. (1996): Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 10 (11), S. 1457–1466.
- Zhang, Xi-Mei; Guo, Lin; Huang, Xiang; Li, Qiu-Ming; Chi, Mei-Hua (2016): 4-Hydroxynonenal Regulates TNF-alpha Gene Transcription Indirectly via ETS1 and microRNA-29b in Human Adipocytes Induced From Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. In: *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 299 (8), S. 1145–1152.
- Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In: *Nature* 372 (6505), S. 425–432.
- Zhu, Y.; Qi, C.; Korenberg, J. R.; Chen, X. N.; Noya, D.; Rao, M. S.; Reddy, J. K. (1995): Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (17), S. 7921–7925.
- Zimmet, Paul; Magliano, Dianna; Matsuzawa, Yuji; Alberti, George; Shaw, Jonathan (2005): The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. In: *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 12 (6), S. 295–300.

## Thesen

1. Der Late-onset-Hypogonadismus ist ein Krankheitsbild des alterenden Mannes, welches durch eine Abnahme der Serum-Testosteronkonzentration unter 12,1 nmol/l und damit verbundenen Symptomen einhergeht.
2. Zu den prognoserelevantesten Symptomen des Late-onset-Hypogonadismus zählt die Zunahme des viszeralen Fettgewebes und damit einhergehende Folgeerscheinungen wie das metabolische Syndrom, Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen.
3. Es sind zahlreiche microRNAs bekannt, die die adipogene Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle bis hin zum reifen Adipozyten regulieren, unter anderem auch das microRNA-Cluster-130/301.
4. Das microRNA-Cluster-130/301 wird während der adipogenen Differenzierung in SGBS-Zellen Androgen-abhängig exprimiert.
5. Die microRNA-130a hemmt über eine Bindung im 3'UTR der mRNA die Expression der Adipogenese-assoziierten Gene Androgenrezeptor, Adiponektin und TNF- $\alpha$ . Eine Punktmutation im Bereich der Bindesequenz der microRNA innerhalb der mRNA der Zielgene verhindert die posttranskriptionelle Regulation durch die microRNA.
6. Der Androgenrezeptor wird sowohl von humanen Präadipozyten als auch von reifen humanen Fettzellen exprimiert. Unter Androgensubstitution steigt die Expression während der adipogenen Differenzierung sogar an.
7. Adiponektin, TNF- $\alpha$  und PPAR- $\gamma$  werden im Verlauf der Adipogenese humaner SGBS-Präadipozyten verstärkt exprimiert. Eine verringerte Expression während der adipogenen Differenzierung unter Androgenzugabe konnte nicht abschließend bestätigt werden.

### **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Dresden, den 20.08.2017

---

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Dresden, den 20.08.2017

---

## Curriculum vitae

**Name:** Carina Wenzel  
**Anschrift:** Schlüterstraße 24, 01277 Dresden  
**Geburtsdatum und –ort:** 16.07.1990 in Suhl  
**Familienstand:** ledig

### Schulbildung

---

**09/01-07/09** Hennebergisches Gymnasium „Georg Ernst“ Schleusingen/Thüringen (Abiturnote: 1,5)  
**09/97-07/01** Grundschule „Gerhardt Hauptmann“ Schleusingen/Thüringen

### Studium

---

**10/09-12/16** Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
**12/16** Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)  
**10/15** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)  
**09/11** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)

### Tätigkeit

---

**ab 04/17** Assistenzärztin am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden

### Promotion

---

**12/15** Teilnahme am 6. DVR-Kongress in Hamburg mit Posterpräsentation, Auszeichnung mit dem Posterpreis  
**09/14** Teilnahme an der 26. DGA-Jahrestagung in Gießen mit Präsentation  
**04/13-03/14** Forschungsprojekt des Promotionskollegs der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
**12/13** Teilnahme am 2. Doktorandenkongress in Halle (Saale) mit Präsentation der Forschungsarbeit

- 12/13** Teilnahme am 5. DVR-Kongress in Münster mit Posterpräsentation
- seit 09/13** Dissertation am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie des Universitätsklinikums Halle (Saale)
- seit 04/13** Mitglied im Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Dresden, den 20.08.2017

---

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Zeit der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertationsschrift unterstützt haben.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann M. Behre möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte. Desweiteren möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an der Thematik dieser Arbeit bedanken.

Für die stets gute Zusammenarbeit sowie die Unterstützung bei der Durchführung dieses Projektes möchte ich mich bei allen Beteiligten des Promotionskollegs der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und insbesondere bei meinem Ko-Betreuer Prof. Dr. med. Dirk Vordermark bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Thomas Greither, Herrn Dipl. Biol. Matthias Kraus und Frau Dr. Sindy Pelka, die mich stets bei Problemen unterstützt haben und immer zu ausführlichen und aufschlussreichen Diskussionen bereit waren. Sie haben die Arbeitsatmosphäre im Labor stets angenehm gestaltet und mich zum selbstständigen wissenschaftlichen Denken und Arbeiten angeleitet und angeregt.

Herrn Prof. Dr. Martin Wabitsch des Universitätsklinikums Ulm danke ich für die Bereitstellung der SGBS-Zellen.

Frau Dr. Darmer möchte ich für ihre herzliche Art und die Hilfsbereitschaft bei den durchgeführten Sequenzanalysen danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Biochem. Maria Giebler, nicht nur als Ansprechpartnerin für alle fachlichen Fragen, sondern vor allem als liebgewonnene Freundin.

Mein herzlichster Dank geht an meinen Freund Benjamin Tschirschwitz, der mir in allen Lebenslagen liebevoll zur Seite steht, an meine Eltern und meinen Bruder Stephan, die mich stets unterstützt haben und an all meine Freunde, die immer ein offenes Ohr für mich haben. Ohne ihre motivierenden Worte wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.