

**Medizinische Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Einfluss des selektiven Androgenrezeptor-Modulators (SARM)  
BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung humaner SGBS-Prädipozyten**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr.med.)

von Stefanie Trau

geboren am 03.04.1986 in Lutherstadt Wittenberg

Betreuer: Prof. Dr. med. Hermann M. Behre

Gutachter:           1. Prof. H. M. Behre  
                          2. Prof. M. Gericke  
                          3. Frau Prof. Schagdarsurengin, Gießen

02.11.2021

28.06.2022

## Referat

Der Late-onset-Hypogonadismus (LOH) bezeichnet ein Krankheitsbild des alternden Mannes, welches durch einen Testosteronmangel unterhalb des Referenzwertes und der daraus resultierenden klinischen Symptomatik wie eine Lipidstoffwechselstörung mit nachfolgender Zunahme des viszeralen Fettgewebes gekennzeichnet ist. Die Therapie der Wahl stellt die Testosteronsubstitution dar, wobei in diesem Zusammenhang immer noch Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Prostatahypertrophie diskutiert werden. Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs) stellen eine vielversprechende Alternative dar, die neben der Linderung der klinischen Symptomatik des LOH auch die Zunahme des viszeralen Fettgewebes inhibieren können. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des SARMs BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung humaner SGBS-Präadipozyten untersucht. Humane SGBS-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentration von BMS-564929 inkubiert, wobei sich bei keiner der verwendeten Konzentrationen ein toxischer Einfluss auf die Zellen zeigte. Im Oil-Red-O Test konnte lichtmikroskopisch eine geringere Einlagerung von Triglyzeriden durch SARM Behandlung gezeigt werden, außerdem bestätigte die Absorptionsmessung eine Hemmung der adipogenen Differenzierung der SGBS-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Mittels quantitativer Real-Time-PCRs wurde die Expression Adipogenese-relevanter Gene während der adipogenen Differenzierung in humanen SGBS-Präadipozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl humane SGBS-Präadipozyten als auch ausdifferenzierte Adipozyten Androgenrezeptor exprimieren. Sowohl unter Zugabe von BMS-564929 als auch von DHT war ein signifikanter Anstieg der Expression zu verzeichnen. Die mRNA-Expression von Adiponektin, IGF-1 und PPAR $\gamma$  stieg im Verlauf der adipogenen Differenzierung an, zeigte jedoch unter Zugabe von BMS-564929 und DHT keine Veränderungen. Ebenso stieg die Leptinexpression im Verlauf der Adipogenese an, wobei sowohl unter Zugabe von BMS-564929 als auch unter DHT eine Hemmung detektiert werden konnte. Zwischen dem SARM und dem Androgen zeigte sich kein Unterschied. Die Expression von TNF- $\alpha$  stieg ebenfalls im Verlauf der Differenzierung an. Sowohl unter Zugabe von BMS-564929 als auch von DHT zeigte sich eine verringerte Expression, wobei unter Zugabe von BMS-564929 ein stärkerer Effekt verzeichnet werden konnte. Schlussfolgernd stellt BMS-564929 eine potenzielle Alternative bei der Behandlung des Krankheitsbildes der altersbedingten Testosteron-Abnahme dar.

Trau, Stefanie: Einfluss des selektiven Androgenrezeptor-Modulators (SARM) BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung humaner SGBS-Präadipozyten, Halle (Saale), Martin-Luther-Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2021

# Inhaltsverzeichnis

## Referat

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Demographische Altersentwicklung in Deutschland .....	1
1.2	Männlicher Hypogonadismus - Altershypogonadismus.....	1
1.3	Entwicklung und Funktion des Fettgewebes .....	4
1.3.1	Adipogenese .....	5
1.3.2	SGBS-Zellen – ein <i>in vitro</i> -Modell.....	8
1.3.3	Fettgewebe als sekretorisches Organ .....	9
1.4	Androgene .....	10
1.4.1	Androgen Rezeptor (AR) .....	10
1.4.2	Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs).....	11
1.4.3	BMS-564929 .....	12
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1	Reagenzien .....	14
3.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	16
3.3	Zellbiologische Methoden .....	19
3.3.1	Kultivierung und Passagierung der Zellen .....	19
3.3.2	Zellzählung mittels Countess™ Automated Cell Counter .....	20
3.3.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen .....	20
3.3.4	Adipogene Differenzierung der SGBS Zellen .....	20
3.3.5	Herstellung der Verdünnungsreihen .....	22
3.4	MTT - Proliferationsassay .....	22
3.5	Oil Red O Färbung .....	23
3.6	RNA - Analytik .....	24
3.6.1	Isolation und Konzentrationsbestimmung der RNA .....	24
3.6.2	cDNA-Synthese .....	25
3.6.3	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR .....	27
3.7	Proteinexpressionsanalysen .....	30
3.7.1	Proteinisolation .....	30
3.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
3.7.3	Probenaufbereitung und Elektrophorese .....	31
3.7.4	Western – Blot .....	32

3.8	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
4.1	<b>Effekte von BMS-564929 auf die Viabilität und Differenzierung von SGBS-Zellen</b> .....	<b>35</b>
4.1.1	Effekte von BMS-564929 auf die Viabilität der SGBS-Zellen .....	35
4.1.2	Einfluss von BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung .....	36
4.1.3	Einfluss von BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung .....	39
4.2	<b>Effekte von BMS-564929 auf die Genexpression</b> .....	<b>40</b>
4.2.1	Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression des Androgenrezeptors .....	41
4.2.2	Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von Adiponektin .....	43
4.2.3	Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von IGF-1 .....	45
4.2.4	Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$ .....	47
4.2.5	Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von Leptin .....	49
4.2.6	Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ .....	51
4.3	<b>Proteinquantifizierung mittels Western-Blot-Analyse</b> .....	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>54</b>
5.1	<b>BMS-564929</b> .....	<b>54</b>
5.2	<b>Toxizität von BMS-564929 und Einfluss auf die Proliferation</b> .....	<b>55</b>
5.3	<b>BMS-564929-abhängige Expression verschiedener Zielgene während der Adipogenese</b> .....	<b>56</b>
5.4	<b>BMS-564929 – ein Ausblick</b> .....	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b> .....	<b>71</b>
	<b>Erklärungen</b>	
	<b>Danksagung</b>	

---

**Abkürzungsverzeichnis**

AdipoQ	Adiponektin
AdipoR	Adiponektinrezeptor
AR	Androgenrezeptor
bidest.	bidestilliert
BMI	<i>body mass index</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C/EBP	CCAAT-enhancer binding Protein
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
fw	<i>forward</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
IBMX	Isobutylmethylxanthin
K	Kontrolle
LOH	Late-onset-Hypogonadismus
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung ( <i>phosphat buffered solution</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
rv	<i>reverse</i>
sec	Sekunde
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom
SGBH	Sexualbindendes-Globulin
U/min	Umdrehungen pro Minute
μl	Mikroliter
%	Prozent
°C	Grad Celsius

## **1 Einleitung**

### **1.1 Demographische Altersentwicklung in Deutschland**

Der Anteil der männlichen Bevölkerung über 65 Jahre steigt weltweit kontinuierlich. Laut statistischem Bundesamt liegt der Anteil der über 65-jährigen Männer und Frauen 2017 in Deutschland bei 21,4 %, während 1997 nur 15,8 % der deutschen Gesamtbevölkerung dieser Bevölkerungsgruppe angehörten (Destatis 2018). Der Prozess der Alterung der Bevölkerung wird in den kommenden Jahren anhalten. Die aktuelle Bevölkerungsvorausberechnung des Statistischen Bundesamtes (Variante 2-A) zeigt, dass sich der Anteil der alternden Bevölkerung (80 Jahre und älter) von 2015 bis 2050 verdoppeln wird. Bis zum Jahr 2030 wird die Zahl der über 65-Jährigen voraussichtlich einen Zuwachs von 35 % verzeichnen. Die Gruppe der über 80-Jährigen ist nicht nur in Deutschland, sondern weltweit eine der am stärksten wachsenden Bevölkerungsgruppe (Destatis 2018). Vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung müssen die damit verbundenen gesundheitlichen Folgen und Komorbiditäten beachtet werden.

### **1.2 Männlicher Hypogonadismus - Altershypogonadismus**

Laut EAU-Leitlinie beschreibt der männliche Hypogonadismus einen klinischen Zustand mit Beeinträchtigung der Gonadenfunktion sowie ein in der Folge durch den Androgenmangel verursachtes klinisches Syndrom, welches verschiedene Organfunktionen sowie die Lebensqualität negativ beeinflussen kann. Der männliche Hypogonadismus kann entsprechend der Störungen in zwei verschiedenen Kategorien klassifiziert werden. Beim primären Hypogonadismus kommt es zum Versagen der Hodenfunktion und beim sekundären Hypogonadismus zu einer Störung in der hypothalamischen-hypophysären-gonadalen Achse. Beim Altershypogonadismus handelt es sich oft um eine Mischung aus primärem und sekundärem Hypogonadismus (EAU Leitlinie 2018). In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Männern physiologischerweise ein altersabhängiger Rückgang der Androgenfreisetzung von 1-2 % pro Jahr ab dem 30. Lebensjahr zu verzeichnen ist (Kaufman and Vermeulen 2005). Die Daten belegen, dass ein erheblicher Prozentteil der Männer über 60 Jahren einen signifikant geringeren Testosteronwert im Serum, also unter den Grenzwerten junger Erwachsener (Alter 20-30 Jahre), aufweisen (Nieschlag et al. 2005). 98% des Testosterons im menschlichen Körper ist mit hoher Affinität an das Sexualbindende-

Globulin (SHBG) gebunden, ein Serumtransportprotein, dessen Konzentration im Alter zunimmt (Dunn et al. 1981). Das sich daraus ergebende klinische Syndrom ist gekennzeichnet durch sexuelle Dysfunktion, Verringerung des Hodenvolumens, Gynäkomastie, Anämie sowie einer Reduktion der Knochen- und Muskelmasse (Basaria 2014). Eine vollständige Übersicht über die möglichen klinischen Symptome eines Altershypogonadismus zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Klinische Symptome und Anzeichen, die mit einem Altershypogonadismus assoziiert sind.

<b>Symptome in Verbindung mit einem Androgenmangel</b>
- Reduziertes Hodenvolumen
- Männliche Infertilität
- Verminderte Körperbehaarung
- Gynäkomastie
- Rückgang von fettfreier Körpermasse und Muskelstärke
- Viszerales Übergewicht
- Metabolisches Syndrom
- Insulinresistent und Typ-2 Diabetes mellitus
- Rückgang der Knochenmineraldichte (Osteoporose) mit Frakturen bei geringem Trauma
- Milde Anämie
- Verminderte sexuelle Lust und sexuelle Aktivität
- Erektile Dysfunktion
- Abnahme nächtlicher Erektionen in Häufigkeit und Ausprägung
- Hitzewallungen
- Stimmungsschwankungen, Erschöpfung, Aggressivität
- Schlafstörungen
- Depression
- Verminderte kognitive Funktion

Obwohl die klinische Bedeutung des Altershypogonadismus bei erwachsenen Männern zunehmend erkannt wird, ist das Ausmaß seiner Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung noch unterschätzt (Yang et al. 2018). Von einem Testosteronmangel spricht man ab einer totalen Testosteronkonzentration unter 12,1 nmol/l und einer freien Testosteronkonzentration unter 243 pmol/l (Bhasin et al. 2011). Bei vielen der oben genannten Symptome steigt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens bei einem niedrigen Plasmatestosteronspiegel. Ein wichtiges charakteristisches Merkmal des Altershypogonadismus ist die Zunahme der viszeralen Fettmasse, assoziiert mit der Entwicklung eines metabolischen Syndroms und der damit verbundenen Komplikationen wie Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 (Zitzmann 2009). Mehrere Studien konnten zeigen, dass Androgene die adipogene Differenzierung hemmen und somit zu einer Abnahme des viszeralen Fettgewebes und der damit verbundenen kardiovaskulären Risikofaktoren führen (Behre et al. 2012). Die Testosteronsubstitutionstherapie stellt eine gesundheitsfördernde Alternative dar, ist aber mit Nebenwirkungen und Risiken verbunden. Häufig wird in diesem Zusammenhang die Induktion eines Prostatakarzinoms durch die Testosteronsubstitution diskutiert, wobei die Studienlage sehr differiert. Das Wachstum eines manifesten Prostatakarzinoms kann getriggert werden (Rolf and Nieschlag 1998, Parsons, Carter et al. 2005). Hingegen zeigen andere Studien keinen Einfluss von einer Testosterontherapie auf die Entwicklung eines Prostatakarzinoms (Stattin et al. 2004, Wiren et al. 2007). Eine weitere häufige Nebenwirkung ist die Erhöhung des Hämatokrits, welche mit einer erhöhten Viskosität und Thromboseneigung assoziiert sein kann (Holmegard et al. 2014).

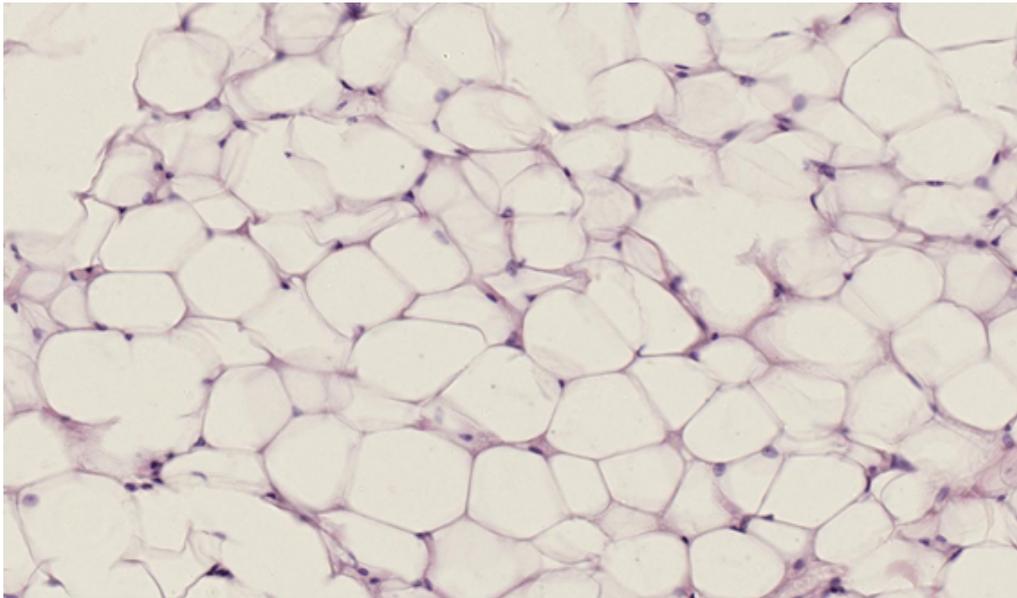
Ein Grund für das starke Interesse an der Adipozytenforschung ist die Erkenntnis, dass immer mehr Männer als auch Frauen übergewichtig sind, mit der daraus resultierenden Zunahme der Morbidität und Mortalität. Laut der DEGS1 Studie des Robert-Koch-Instituts von 2014 sind zwei Drittel der Männer (67 %) und die Hälfte der Frauen (53 %) in Deutschland übergewichtig und ein Viertel der Erwachsenen sogar adipös. Der Wandel der Lebensumstände führt in den industrialisierten Ländern durch vermehrte Nahrungsaufnahme und geringeren Energieverbrauch langfristig durch eine positive Energiebilanz zu einer Zunahme des Körperfettgewebes (Speakman 2004).

Anhand der Definition der WHO besteht bei Menschen ab einem Body Mass Index (BMI) von 30 kg/m<sup>2</sup> eine Adipositas. Wobei insgesamt 3 Schweregrade unterschieden werden. Laut Internationaler Diabetes Foundation zählt die zentrale (stammbetonte Adipositas) mit einem Taillenumfang bei Männern  $\geq 94$  cm zu den Hauptdiagnosekriterien des

metabolischen Syndroms, welches bei Vorliegen das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse, Schlaganfälle oder die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 erhöht. Longitudinale epidemiologische Studien zeigen, dass ein Testosteronmangel einen unabhängigen Faktor für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms bei Männer darstellt (Laaksonen et al. 2004). Ein wichtiger Faktor stellt in diesem Zusammenhang die exzessive Differenzierung von mesenchymalen Stammzellvorläufern zu Adipozyten und die damit verbundene Zunahme des Fettgewebes dar.

### **1.3 Entwicklung und Funktion des Fettgewebes**

Ausgehend von histologischen und morphologischen sowie biochemischen und funktionellen Merkmalen werden braunes und weißes Fettgewebe unterschieden. Braunes Fettgewebe besitzt die Fähigkeit mittels Fettsäureoxidation Wärme zu produzieren und besteht im Vergleich zum weißen Fettgewebe aus kleinen Zellen, welche durch eine Vielzahl von Mitochondrien charakterisiert sind und vermehrt bei Neugeborenen und Säuglingen vorkommt (Cinti 2001). Das weiße Fettgewebe hingegen, welches gehäuft bei Erwachsenen vorkommt, dient als Energiespeicher, der mechanischen Polsterung sowie als Wärmeisolator und wird in subkutanes und viszerales Fettgewebe unterteilt (Saely et al. 2012). Die vorliegende Arbeit bezieht sich immer auf das weiße Fettgewebe, welches im weiteren Verlauf als Fettgewebe bezeichnet wird. Fettgewebe besteht zu ca. 50 % aus Adipozyten, den Fettzellen. Der verbliebene zelluläre Anteil setzt sich aus Präadipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Blutzellen und Makrophagen zusammen. Die Anlage des Fettgewebes findet bereits in der 14. bis 24. Schwangerschaftswoche statt, wobei eine Entwicklung von Adipozyten im Rahmen der Differenzierung in jedem Alter möglich ist (Hauner et al. 2012). Die Adipozyten besitzen ein charakteristisches Erscheinungsbild (Abbildung 1). Sie sind meist von einer großen Lipidvakuole gefüllt und die übrigen Zellorganellen inklusive des Zellkerns sind meist in der Peripherie lokalisiert.

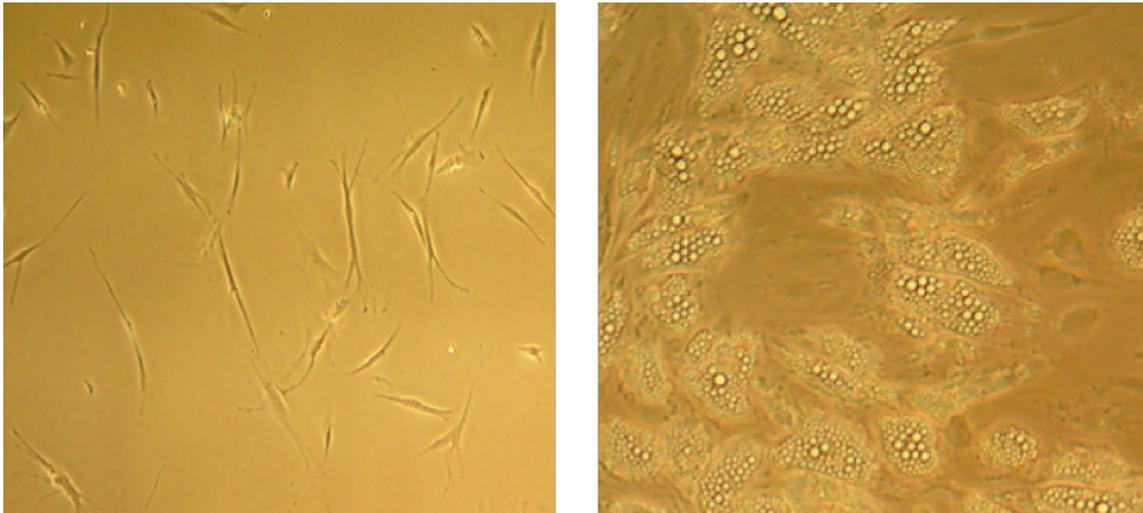


**Abbildung 1:** Typische Morphologie weißer Adipozyten mit großen zentralen Fettvakuolen. Dieser Zustand nennt sich unifokal. Das Zytoplasma umschließt als dünner Saum die Vakuole und enthält den sehr kleinen Zellkern. Dieser wird durch den Lipidvisikel an die Peripherie gedrängt, weswegen diese Zellform auch als Siegelring-Form bezeichnet wird. Quelle: [histohal.uni-halle.de](http://histohal.uni-halle.de). Präparat A54 (H).

### 1.3.1 Adipogenese

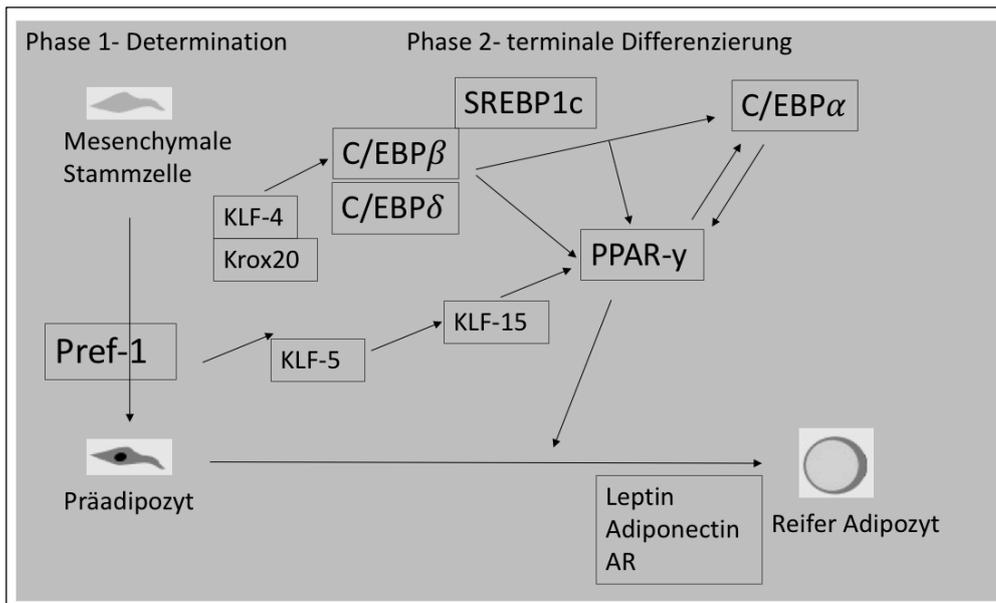
Die Adipogenese beschreibt die Fettzellendifferenzierung von der mesenchymalen Stammzelle bis hin zur reifen Fettzelle (Adipozyt, Abbildung 2). Im Rahmen der Adipogenese werden zwei Phasen unterschieden. In einer ersten Phase, der Determinierung, entstehen aus mesenchymalen Stammzellen Adipozytenvorläuferzellen, sogenannte Präadipozyten, die sich in einer zweiten terminalen Phase zu reifen Adipozyten differenzieren (Gregoire et al. 1998).

Abbildung 2 zeigt sowohl einen Präadipozyten als auch reife Adipozyten. Die mesenchymale Stammzelle ist multipotent und könnte sich prinzipiell zum Chondroblasten, Myeloblasten, Osteoblasten oder eben zum Adipoblasten entwickeln.



**Abbildung 2:** *In vitro* Adipogenese primärer humaner SGBS-Zellen. Links: Präadipozyten, Rechts: Akkumulation von Lipidtropfen nach 12 Tagen Stimulation mit D-Pantothemat, Biotin, IBMX, Insulin, humanem Apotransferin, Cortisol, Schilddrüsenhormon und Rosiglitazon.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist bekannt, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren bei der Adipogenese eine entscheidende Rolle spielen (siehe Abbildung 3). Eine besondere Bedeutung hat das lösliche Protein Pref-1 (praedipocyte factor-1), das den Status der Präadipozyten aufrechterhält und im Laufe der Differenzierung abnimmt (Hudak et al. 2014). Die terminale adipogene Differenzierung bedarf der koordinierten Aktivierung von adipozytenspezifischen Genen und der Unterdrückung anti-adipogener Faktoren. Zur folgenden terminalen Differenzierung kommt es durch Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR), eine Familie ligandenaktivierter Transkriptionsfaktoren. Zum aktuellen Zeitpunkt konnten 3 unterschiedliche Subtypen von PPAR-Rezeptoren identifiziert werden: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$  (Kliwer et al. 1994). PPAR $\gamma$  tritt in zwei Isoformen auf und spielt die entscheidende Rolle im Rahmen der Adipogenese, wobei PPAR $\gamma$ 2 als nukleärer Rezeptor zusätzliche 30 NH<sub>2</sub>-terminale Aminosäuren aufweist und fast ausschließlich in Präadipozyten und Adipozyten exprimiert wird (Werman et al. 1997). Zu Beginn der Adipogenese werden C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  aktiviert. Dabei handelt es sich um CCAAT/Enhancer Binding Proteine (C/EBP), welche für eine begrenzte Zeit exprimiert werden. Diese wiederum aktivieren über einen direkten transkriptionellen Effekt die Expression des PPAR $\gamma$ . Während des Prozesses aktiviert dieser die Expression von C/EBP $\alpha$ , wobei dieser Transkriptionsfaktor über positive Rückkopplung PPAR $\gamma$  beeinflusst, sodass beide Transkriptionsfaktoren sich gegenseitig verstärken und die Differenzierung aufrechterhalten wird (Rosen et al. 2002).



**Abbildung 3:** Molekulare Mechanismen der adipogenen Differenzierung: In einer ersten Phase der Determination entsteht aus einer mesenchymalen Stammzelle ein Präadipozyt. Dieser Status wird durch die Expression des Proteins Pref-1 (praedipocyte factor-1) aufrechterhalten. In einer zweiten Phase, der terminalen Differenzierung entsteht aus dem Präadipozyten ein reifer Adipozyt. Durch C/EBP  $\beta$  und  $\delta$  kommt es folglich zur Expression von PPAR $\gamma$  sowie C/EBP $\alpha$ . Dadurch kommt es zur Expression adipozytenspezifischer Gene und somit zur Entstehung eines reifen Adipozytens. (Modifiziert nach Rosen und MacDougald, 2006).

Zusätzlich kann die Expression von PPAR $\gamma$  durch Adipocyte Determination and Differentiation Factor (ADD) 1, auch als Sterol Element Binding Protein (SREBP) 1c bezeichnet, aktiviert werden. Jüngere Studien zeigen, dass diverse externe Faktoren die terminale Differenzierung beeinflussen können, wie zum Beispiel der Wnt-Signalweg. Wnt10b wird durch Präadipozyten sezerniert, stabilisiert  $\beta$ -Catenin und unterdrückt somit die terminale Differenzierung, wobei die genauen molekularbiologischen Mechanismen noch nicht geklärt sind (Ross et al. 2000). Eine weitere relevante Gruppe stellen die *Krüppel-like-factors* (KLF) dar, die zur großen Familie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren gehören und die Adipogenese sowohl triggern als auch hemmen können (Mori et al. 2005). Der KLF-2, welcher in einem ersten Schritt den PPAR $\gamma$ -Promotor hemmt, dann durch KLF-5 ersetzt wird aktiviert somit die PPAR $\gamma$ -Expression. Im Anschluss erfolgt die Expression von KLF-15, welcher die PPAR $\gamma$ -Expression aufrecht erhält (Mori et al. 2005). Ein weiterer bedeutender Transkriptionsfaktor ist KLF-4, welcher in den ersten 24-Stunden der Differenzierung induziert wird. Dieser aktiviert, in Kombination mit Krox20, ein weiteres Zink-Finger-Protein, C/EBP $\beta$  (Birsoy et al. 2008), wobei auch hier der genaue Pathomechanismus nicht abschließend geklärt ist.

Anhand dessen ist gut zu erkennen, dass dieses Thema auch in Zukunft großes Forschungspotenzial bietet.

### **1.3.2 SGBS-Zellen – ein *in vitro*-Modell**

Als *in vitro*-Modell für eine humane Adipogenese eignen sich zahlreiche immortalisierte Präadipozytenzelllinien. In dieser Arbeit wurden Zellen verwendet, die ursprünglich aus dem subkutanen Fettgewebe eines drei Monate alten männlichen Patienten mit Simpson - Golabi - Behmel Syndrom (SGBS) stammen und von der Arbeitsgruppe von Prof. Wabitsch (Ulm) zur Verfügung gestellt wurden. Die humanen SGBS-Präadipozyten bieten eine einzigartige Möglichkeit, Mechanismen von menschlichen Adipozyten *in vitro* zu untersuchen (Fischer-Posovszky et al. 2008). Bei dem SGBS handelt es sich um eine angeborene, X-chromosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die durch eine Mutation im Gen Glypican (GPC3) bedingt ist (DeBaun et al. 2001). Es werden 2 Subtypen unterschieden: die klassische Verlaufsform Typ I und eine letale Verlaufsform Typ II. Klinisch äußert sich das Syndrom beispielsweise durch Großwuchs, Organomegalie, vergrößerte Gesichtszüge, Veränderungen des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes sowie einer erhöhten Prädisposition zur Entwicklung von Tumoren (Tenorio et al. 2014). Die humane SGBS-Zelllinie bietet diverse Vorteile für die Untersuchung von Fragestellungen zur Regulation der Expression und Sekretion von Adipozytokinen beim Menschen. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die SGBS-Adipozyten wie primäre humane Adipozyten verhalten und weisen den Vorteil auf, dass sie unter definierten Bedingungen (siehe 3.3.) *in vitro* kultiviert und somit Einflussfaktoren auf die Adipozytokinexpression genau untersucht werden können (Wabitsch and Fischer-Posovszky 2008). Es handelt sich um eine nicht immortalisierte Zelllinie, welche eine hohe Kapazität zur adipogenen Differenzierung aufweist und erst ab der 70. Generation die Fähigkeit zur Proliferation verliert. Sie zeigen sich undifferenziert, Fibroblasten-ähnlich und nach Abschluss der Differenzierung eher rundlich mit zytoplasmatisch eingelagerten Lipidtropfen. Diese Eigenschaft spiegelt die Analogie dieser Zellen zu humanen Präadipozyten wider (Wabitsch et al. 2001).

### 1.3.3 Fettgewebe als sekretorisches Organ

Das Fettgewebe stellt neben seiner Funktion als Speicherfett auch ein eigenes endokrines Organ dar, welches eine Vielzahl von Signalmolekülen, sogenannte Adipozytokine oder auch kurz Adipokine, produziert und sezerniert. Die Zahl der neu identifizierten Adipokine nimmt stetig zu (Ferris and Crowther 2011). Sie wirken als biologisch aktive Polypeptide über parakrine, autokrine und endokrine Mechanismen.

Das wohl bekannteste Adipokin stellt Leptin (vom Griechischen „*leptos*“ – dünn) dar, welches 1994 als Proteinprodukt des *ob*-Gens identifiziert wurde (Zhang et al. 1994). Dabei handelt es sich um ein zirkulierendes ca. 16 kDa großes Protein, das vorwiegend von Adipozyten des weißen Fettgewebes sezerniert wird und seine Wirkung über einen membrangebundenen Rezeptor (Ob-Rezeptor) mit Tyrosinkinaseaktivität entfaltet. Leptin bewirkt die Modulierung diverser Proteine im Hypothalamus und so eine Hemmung der Nahrungsaufnahme und des Appetits und beeinflusst folglich auch das Gewicht (Ahima and Flier 2000). Des Weiteren spielt Leptin eine entscheidende Rolle bei der Insulinresistenz, bei der Angiogenese, bei der Immunfunktion sowie im Fettgewebe. Arbeiten konnten zeigen, dass Übergewichtige erhöhte Leptinkonzentrationen aufweisen, die aber im Hypothalamus nicht wirkungsvoll den Appetit unterdrücken, man spricht somit von einer Leptinresistenz (Wauman and Tavernier 2011).

Ein weiteres bedeutendes Adipokin stellt Adiponektin (AdipoQ) dar, ein 30 kDa großes Protein, welches fast ausschließlich von reifen Adipozyten sezerniert wird und im menschlichen Plasma in einer trimeren, einer hexameren und einer hochmolekularen Form vorliegt (Bobbert et al. 2008). Das codierende Gen ist *ADIPOQ* und ist auf Chromosom 3q27 lokalisiert und hat eine Gesamtgröße von 17 kb. AdipoQ bindet an zwei Rezeptoren, den Adiponektin-Rezeptor 1 und 2 (AdipoR1 und 2). Während AdipoR1 vermehrt auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert wird, kommt AdipoR2 vermehrt in Hepatozyten vor (Almer et al. 2011). Männer zeigen eine deutlich niedrigere Konzentration an Adiponektin im Plasma auf als Frauen (Andreasson et al. 2012). Des Weiteren korreliert Adiponektin negativ mit dem Body Mass Index (BMI), eines der Hauptkriterien des metabolischen Syndroms. Es wird angenommen, dass eine Abnahme des Adiponektins eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Adipositas induziertem Diabetes mellitus Typ 2 sowie der Entwicklung von Herz- und Kreislauferkrankungen spielt (Matsuzawa 2010). Des Weiteren wurde belegt, dass auch Interleukin-(IL-)6, Tumornekrosefaktor-(TNF)  $\alpha$  und Resistin Insulinresistenzen hervorrufen können und bei der Entwicklung des metabolischen Syndroms eine entscheidende Rolle spielen (Moller 2000, Steppan et al. 2001).

## 1.4 Androgene

Androgene stellen wichtige Hormone für die Expression des männlichen Phänotyps dar. Des Weiteren werden Androgene für die männliche Sexualfunktion, die männliche Fertilität, die Muskelbildung sowie die Knochenmineralisierung und nicht zuletzt für den Fettstoffwechsel benötigt (Nieschlag 2012). Sie gehören zu der Gruppe der Steroidhormone und leiten sich vom Cholesterin ab. Das wichtigste zirkulierende Androgen ist Testosteron, welches überwiegend in Leydig-Zellen des Hodens synthetisiert wird. Die biochemische Umwandlung von Cholesterin in Testosteron umfasst mehrere Schritte. Testosteron wird in einigen Zielgeweben durch die 5 $\alpha$ -Reduktase zu dem aktiveren Metaboliten 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron katalysiert (Russell and Wilson 1994). 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron ist biologisch aktiver und bindet stärker als Testosteron an seine Zielrezeptoren. Weitere zirkulierende Androgene sind Dehydroepiandrosteron (DHEA), Androsteron sowie Androstendion.

### 1.4.1 Androgen Rezeptor (AR)

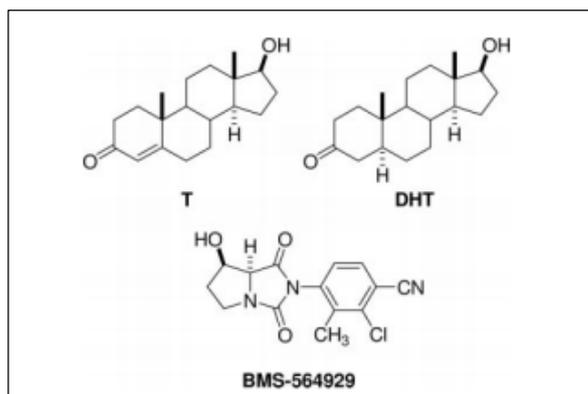
Androgenwirkungen werden durch spezielle Androgenrezeptoren (AR) in den jeweiligen Zielzellen vermittelt. Dabei handelt es sich um einen Steroidrezeptor, welcher als Transkriptionsfaktor fungiert und Mitglied der Superfamilie der nukleären Rezeptoren ist (Lu et al. 2006). Das AR-Gen ist auf dem X-Chromosom (Xq 11-12) lokalisiert. Durch die Bindung des Androgens an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors und folgend zur Abspaltung des Hitzeschockproteins und somit zu einem Transport des Rezeptordimers in den Zellkern (Jenster et al. 1991). Verschiedene Gewebe wie Prostata, Muskel, Leber, Brust oder Fett sind empfänglich für Androgeninteraktionen, wobei die AR-Wirkung von verschiedenen Co-Faktoren abhängig ist (Pelletier 2000). In verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl Testosteron als auch DHT die adipogene Differenzierung von Maus und humanen mesenchymalen Stammzellen hemmt (Singh et al. 2003, Gupta et al. 2008, Kraus et al. 2015).

### 1.4.2 Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs)

Ungeklärt ist bis jetzt, ob selektive Androgenrezeptor-Modulatoren (SARMs) im Vergleich zu Androgenen eine vergleichende Wirkung auf die adipogene Differenzierung humaner Präadipozyten besitzen. SARMs beschreiben eine neue Klasse von androgenspezifischen Substanzen, welche in ihrer Wirkung den anabolen und androgenen Steroiden ähneln. Sie binden wie Testosteron an den Androgenrezeptor, vermitteln die positiven Eigenschaften, ohne ein entsprechendes Nebenwirkungsprofil, wie zum Beispiel auf die Prostata (Chen et al. 2005). Der AR ist im gesamten menschlichen Körper weit verbreitet. An der Funktion des AR sind verschiedene Kofaktoren, wie beispielsweise Cyclin D1 beteiligt, die entweder direkt oder indirekt auf diesen wirken. Die Expression der Kofaktoren ist sehr komplex und erlaubt einen gezielten gewebespezifischen Einsatz der SARMs (Miller et al. 2011). Diese Komplexität ermöglicht einem selektiven Rezeptormodulator, je nach Gewebe und Expression von Kofaktoren, entweder als Agonist oder Antagonist zu wirken, was sich als Vorteil im Vergleich zu Testosteron darstellt (Miller et al. 2011). Als Beispiel dient die Prostata. Dort wirken einige als Antagonisten oder andere als Agonisten mit geringer Affinität zum Rezeptor für Muskulatur oder Knochen, wobei die genauen Mechanismen, die zur Gewebselektivität der SARMs führen, bisher wenig erforscht sind (von Haehling 2017). SARMs können sowohl oral als auch transdermal verabreicht werden, was die Akzeptanz im Vergleich zu anderen Applikationsformen erhöht (Krishnan et al. 2018). Sie können nicht durch die  $5\alpha$ -Reduktase zu DHT metabolisiert werden, sodass das Risiko der androgenen Wirkung verringert wird (Dalton et al. 2011). Zusätzlich werden sie durch die Aromatase nicht zu Östrogen metabolisiert, was die östrogene Wirkung verringert (Zilbermint and Dobs 2009). Die ersten Literaturangaben zu Entwicklungen steroidaler SARMs stammen aus den 1940er Jahren. Erstmals wurden diese 1999 in der Literatur dokumentiert. Seit der erstmaligen Identifikation von oral wirksamen SARMs ist die Forschung stets vorangeschritten und befindet sich weiterhin in der Entwicklung (Christiansen et al. 2020). Die präklinischen Daten sind vielversprechend, müssen aber in weiteren klinischen Studien überprüft werden (Bhasin und Jasuja 2009). Angesichts der Tatsache, dass SARMs für die Behandlung vieler chronischer Erkrankungen in Betracht gezogen werden, obwohl eine deutlich längere Exposition erforderlich ist, bietet offenbar das Fehlen nachteiliger Auswirkungen zukunftsorientiert einen deutlichen Vorteil gegenüber Androgenen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde in dieser Arbeit die Wirkung des potentielle SARM BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung humaner Präadipozyten im Zellkulturmodell getestet.

### 1.4.3 BMS-564929

Bei dem SARM BMS-564929 handelt es sich um ein Hydantoinderivat, welches von der Firma Bristol-Myers Squibb entwickelt wurde. Es ist ein oral bioverfügbares Analogon, das seine Wirkung analog zu den natürlich vorkommenden Hormonagonisten Testosteron und DHT über die Regulation des AR vermittelt, wobei es mit seiner CN-Gruppe sowie seiner Hydroxygruppe am Androgenrezeptor interagiert. Die CN-Gruppe bindet dabei genau an die gleiche Position, wie die 3-Ketogruppe von DHT. Außerdem besetzt die Hydroxylgruppe annähernd die gleiche Position wie die 17 $\beta$ -Hydroxylgruppe von DHT. Des Weiteren besitzt BMS-564929 eine sehr starke Affinität zum AR und nahezu keine zum Estrogen- bzw. Progesteronrezeptor (Ostrowski et al. 2007).



**Abbildung 4:** Strukturen der endogenen Androgen Rezeptor Liganden: Testosteron (T), Dihydrotestosteron (DHT) sowie des selektiven Androgenrezeptor-Modulators (BMS-564929) nach Ostrowski et al. 2007.

*In vivo* Studien an kastrierten Ratten zeigten, dass BMS-564929 dosisabhängig das Muskelwachstum erhöht, ohne signifikant das Prostatagewebe zu beeinflussen (Ostrowski et al. 2007).

Aufgrund der Eigenschaften dieses SARM könnte BMS-564929 zukünftig eine große therapeutische Relevanz bei der Behandlung des Krankheitsbildes der altersbedingten Testosteron-Abnahme haben.

## 2 Zielstellung

Demographische Daten zeigen, dass der Anteil der älteren Menschen an der Gesamtbevölkerung kontinuierlich zunimmt. Wie einleitend beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die Testosteronkonzentration im Serum mit zunehmendem Alter abfällt und dass ein erheblicher Anteil der über 60-jährigen einen Testosteronmangel aufweist. Dies wiederum ist unter anderem mit einem Anstieg des viszeralen Fettgewebes und dadurch mit diversen Folgeerkrankungen verbunden. Studien zeigen, dass eine Testosterontherapie bei hypogonadalen Männern zu einer Abnahme der Fettmasse und einer Zunahme der fettfreien Körpermasse führen kann. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen stellt sich die Frage, ob selektive Androgenrezeptor-Modulatoren eine vergleichbare oder sogar stärkere Wirkung haben.

Es handelt sich um eine *in vitro*-Studie. Für diese wurde die humane Präadipozytenzelllinie der Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom-Zellen (SGBS-Zellen) verwendet. Diese verfügen über ein außerordentliches Potential zur homogenen Differenzierung zu reifen Adipozyten.

Die vorliegende Arbeit dient der Beantwortung der Frage, welchen Einfluss der selektive Androgenrezeptor-Modulator BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung von humanen Präadipozyten hat.

- (1) Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Effekte unterschiedlicher Konzentrationen des SARMs sowohl auf die adipogene Differenzierung von SGBS-Zellen als auch die Zelltoxizität untersucht werden.
- (2) Anschließend soll mittels quantitativer Real-time-PCR die Expression Adipogeneserelevanter Gene (Androgenrezeptor, Adiponektin, IGF-1, PPAR $\gamma$ , Leptin und TNF $\alpha$ ) im zeitlichen Verlauf der Adipogenese unter Einfluss des SARMs detektiert und somit in ersten Experimenten untersucht werden, ob BMS-564929 vergleichbare Effekte wie Androgene auf die jeweiligen Expressionsprofile bewirken kann.
- (3) Abschließend wird die Protein-Expression von Adiponektin unter BMS-564929 untersucht.

Die Arbeit soll erste wegweisende Experimente für einen möglichen alternativen Einsatz von BMS-564929 in der Androgen-Substitutionstherapie und damit verbundener Behandlung von Folgeerkrankungen liefern.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Reagenzien

Apotransferrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BMS-564929	Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
CellTiter 96 <sup>®</sup> Proliferation Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Chloroform, ≥ 99 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DEPC-H <sub>2</sub> O	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dexamethason	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dihydrotestosteron (DHT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
D-Pantothensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM / Ham's F-12 (1:1)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ethanol absolut, ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (96 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco, Darmstadt, Deutschland Deutschland
Formaldehyd-Lösung 4,0 %, neutral gepuffert	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isobutylmethylxanthin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kodak Professional D19 Entwickler	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kodak Professional D19 Fixierer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MES NuPAGE™ Puffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (100 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl, 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

PBS, Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Darmstadt, Deutschland Deutschland
RDD-Puffer (DNA Digest-Buffer)	Qiagen, Leipzig, Deutschland
Rosiglitazone	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trijodthyronin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TritonX-100	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trizol <sup>®</sup> -Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
0,4 % Tryptanblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysewaage	Kern, Balingen, Deutschland
Bechergläser	Merck, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank HeraCell 240i	ThermoScientific Schwerte, Deutschland
Countess <sup>™</sup> Automated Cell Counter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Einmalhandschuhe	Sempermed, Wien, Österreich
Elektrophoresegerät	Biorad, München, Deutschland
Küvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen	Nalgene, Hereford, United Kingdom
Kryokonservierung	Nalgene, Hereford, United Kingdom
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Messzylinder	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroplattenreader	Molecular Devices, München, Deutschland
Mikroskop Eclipse T5100	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrotiterplatten (96-Well)	Greiner Bio-One™, Nürtingen, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy	Integra Bioscience, Biebertal, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Real-Time Cycler	Biorad, München, Deutschland
Rollenmischer	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurth, Deutschland
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe EcoVac	Schuett-Biotec, Göttingen, Deutschland
Vortex-Schüttler	StarLab, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Westernblotkammer	Biorad, München, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Cellstar <sup>®</sup> (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One <sup>™</sup> , Nürtingen, Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar <sup>®</sup> (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One <sup>™</sup> , Nürtingen, Deutschland
Zentrifuge 5414 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### **3.3 Zellbiologische Methoden**

In dieser Arbeit wurden Zellen verwendet, die ursprünglich aus dem subkutanen Fettgewebe eines Patienten mit Simpson - Golabi - Behmel Syndrom (SGBS) stammen und freundlicherweise von Prof. Dr. med. Martin Wabitsch (Ulm) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zelllinie ist weder immortalisiert noch transformiert, sodass sich die Lebensspanne der Zellen auf 70 Passagen beschränkt. Die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung nimmt mit zunehmender Generationszahl ab (Araki-Sasaki et al. 1995). Es erfolgte eine Kultivierung nach Standardprotokollen.

#### **3.3.1 Kultivierung und Passagierung der Zellen**

Zur Gewährleistung steriler Bedingungen wurde unter einer Laminarflow Box (Herasafe, Kendro Laboratory Products GmbH, Frankreich) gearbeitet, wobei zur Vermeidung von Kontaminationen ausschließlich sterile bzw. autoklavierte Materialien verwendet wurden. Die adhären wachsenden Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> (Cellstar®)) gezüchtet. Eine Mischung von Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und F12 Nutrient Mixture Ham (Ham's F12) diente unter Zugabe von fetalem Kälberserum (Endkonzentration 10 %), 50 µg/ml Penicillin sowie 50 µg/ml Streptomycin der Kultivierung der Zellen. Diese wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Heraeus FunctionLine, Hanau, Deutschland) inkubiert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Zur Weiterführung der Zelllinie erfolgte nach 7-10 Tagen, bei einer Konfluenz von 70 %, die Subkultivierung der Zellen. Dabei wurde das verbrauchte Medium mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen anschließend mit 10 ml PBS gespült, um Mediumrückstände und Zellreste auszuwaschen. Daraufhin erfolgte das Ablösen der Zellen mit 7 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin und 0,01 % EDTA in PBS). Es folgte eine fünfminütige Inkubationszeit im Brutschrank. Im Folgenden wurde die Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung durch Zugabe von 12 ml frischem Medium gestoppt, die darin befindlichen Zellen mittels zehnmaligem Spülen resuspendiert und in ein Greiner™-Röhrchen überführt sowie abschließend durch Zentrifugation von 5 Minuten bei 1000 U/min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels des automatischen Zellzählers Countess™.

### 3.3.2 Zellzählung mittels Countess™ Automated Cell Counter

Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer 0,4%-igen Trypanblau-Lösung gemischt. Dieser Farbstoff erlaubt die Zählung von intakten Zellen, da Zellen mit beschädigter Membran den Farbstoff aufnehmen, vitale hingegen nicht. Anschließend wurde aus diesem Gemisch eine Zellzählkammer mit 10 µl befüllt und in das Zellzählgerät eingeführt. Mittels Countess™ kann sowohl die Gesamtzellzahl als auch die lebenden und toten Zellen genau bestimmt werden. Somit konnte vor jedem Experiment eine genaue vitale Zellzahl ermittelt werden und eine definierte Menge an Zellen eingesetzt werden, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

### 3.3.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend konnte das so gewonnene Zellpellet in 1,8 ml Gefriermedium (DMEM mit 10 % FCS und 10 % DMSO) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt werden. Dann erfolgte die Lagerung für 24 Stunden bei -20 °C, im Anschluss für weitere 24 Stunden bei -80 °C und für die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen der Zellen aus der Kryokonservierung wurden die Kryoröhrchen unter Raumtemperatur erwärmt und leicht angetaut in 10 ml warmes Kultivierungsmedium überführt sowie anschließend für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in sterile Zellkulturflaschen überführt.

### 3.3.4 Adipogene Differenzierung der SGBS Zellen

SGBS Präadipozyten entwickeln sich in etwa 14 Tagen zu reifen Adipozyten. Die Differenzierung kann *in vitro* durch ein adipogenes Differenzierungsmedium erreicht werden (eine Übersicht der einzelnen Medien liefert Tabelle 2). Es enthält diverse Hormone wie Cortisol, Triiodthyronin und Cortisol, die auch *in vivo* für die Differenzierung bedeutend sind. Für die Stimulation der Adipogenese benötigen die Zellen den Transkriptionsfaktor PPARgamma, welcher durch Rosiglitazon aktiviert wird. Durch die Zugabe von Isobutylmethoxyxanthin (IBMX) und Dexamethason wird eine Erleichterung des Differenzierungsprozesses erreicht.

**Tabelle 2:** Übersicht der verwendeten Medien für die Kultivierung und Differenzierung der SGBS Zellen

Medium	Substanz	Konzentration
<b>Basalmedium</b>	DMEM/F12	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	Biotin	8 mg/l
	D-Pantothenat	4 mg/l
<b>Kultivierungsmedium</b>	DMEM/F12	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	Biotin	8 mg/l
	D-Pantothenat	4 mg/l
	FCS	500 ml
<b>Differenzierungsmedium (Tag 0-4)</b>	DMEM/F12	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	Biotin	8 mg/l
	D-Pantothenat	4 mg/l
	humanes Apotransferin	0,01 mg/ml
	Insulin	20 nM
	Hydrocortison	100 nM
	Triiodthyronin (T3)	0,2 nM
	Dexamethason	25 nM
	IBMX	500 µM
Rosiglitazon	2 µM	
<b>3FC-Medium (Tag 4-14)</b>	DMEM/F12	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	Biotin	8 mg/l
	D-Pantothenat	4 mg/l
	humanes Apotransferin	0,01 mg/ml
	Insulin	20 nM
	Hydrocortison	100 nM
	Triiodthyronin (T3)	0,2 nM

### 3.3.5 Herstellung der Verdünnungsreihen

BMS-564929 lag als Reinsubstanz in Pulverform (10 mg) vor. Dies wurde in DMSO gelöst und eine 1 mM Stocklösung hergestellt. Anschließend wurden daraus eine 100  $\mu$ M und 100 nM Stammlösung hergestellt, aliquotiert und bei 20 °C gelagert. DHT lag ebenfalls als Reinsubstanz vor und wurde in DMSO gelöst, in einer 100  $\mu$ M Stammlösung aliquotiert und bei -20 °C gelagert. In den einzelnen Versuchen wurden BMS-564929 in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Einen Überblick gibt Tabelle 3.

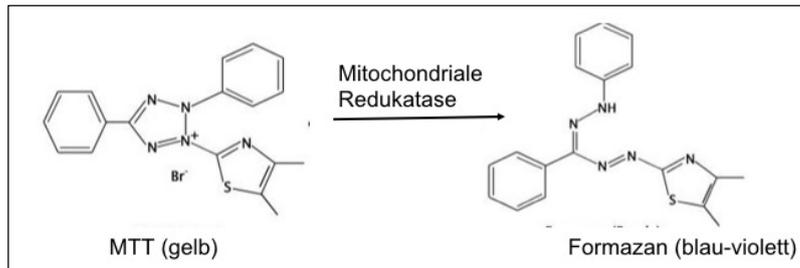
**Tabelle 3:** Übersicht über die untersuchten Konzentrationen in den jeweiligen Versuchen

Versuch	untersuchte Konzentrationen
<b>MTT / Oil Red O</b>	
BMS-564929	50 pM, 100 pM, 250 pM, 500 pM, 5 nM, 10 nM, 25nM, 50 nM
<b>RNA-Isolation/ Protein-Isolation</b>	
BMS-564929	5 nM
DHT	30 nM

### 3.4 MTT - Proliferationsassay

Mittels MTT-Test wurde untersucht, ob BMS-564929 einen toxischen Einfluss auf SGBS-Zellen hat. Der Test beruht auf der Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), einem gelben, wasserlöslichen Farbstoff, in blauviolette Formazankristalle. Der Anteil der lebenden Zellen wird durch die Bildung des blauen Farbstoffes angezeigt. Für die Durchführung des MTT-Tests erfolgte die Kultivierung und Differenzierung der Zellen in 96-Well-Platten. Die Zellen wurden in einer optimalen Zellzahl von 3350 Zellen/Well eingestreut. Nach 24 h erfolgte der Austausch des Kultivierungsmediums durch das Differenzierungsmedium mit Zugabe von BMS-564929 in unterschiedlichen Konzentrationen (50 nM, 25 nM, 10 nM, 5 nM, 500 pM, 250 pM, 100 pM, 50 pM). Nach 48 h Inkubation erfolgte die Durchführung des MTT-Proliferationsassays. Es erfolgte die Zugabe von 15  $\mu$ l MTT pro Well und eine vierstündige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden 100  $\mu$ l 20 % SDS zur Zellyse hinzugefügt und die 96-Well-Platten erneut für eine Stunde inkubiert. Die Messung

erfolgte im Multiwell-Reader bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm. Bei 570 nm wird die Extinktion des Formazans gemessen, von der die Extinktion der Nebenprodukte und Störsubstanzen bei 690 nm abgezogen wird. Dabei korreliert die gemessene Extinktion mit der Anzahl lebender Zellen.



**Abbildung 5:** Umwandlung des gelben Farbstoffes MTT durch die mitochondriale Reduktase in blaue Formazankristalle.

### 3.5 Oil Red O Färbung

Mit der Oil Red O Färbung können intrazelluläre Fettvakuolen von reifen Adipozyten dargestellt werden. Für die Durchführung der Oil Red O Färbung erfolgte die Kultivierung und Differenzierung der Zellen in 96-Well-Platten. Die Zellen wurden in einer Dichte von 3350 Zellen/Well ausgesät und 2 Tage kultiviert. Anschließend wurde mit der Differenzierung nach dem oben beschriebenen Schema begonnen. Nach Abschluss der Differenzierung am „Tag 14“ wurden die Lipideinlagerungen in den Zellen durch die Färbung mit Oil Red O sichtbar gemacht. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 %-igem Formalin für 60 Minuten bei 4 °C fixiert. Nach Entfernung der Formalinlösung erfolgte eine erneute Waschung mit PBS und folgend mit 60%-igem Isopropanol. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit der Oil Red O Lösung inkubiert. Zur Herstellung der Lösung wurden 300 mg Oil Red O in 100 ml Isopropanol aufgelöst. Dieser Stock wurde vor der Färbung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 3:2 verdünnt und gefiltert. Nach Entfernung der Färbelösung wurden die Zellen dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend fotografiert. Dann erfolgte die Zugabe von Isopropanol und die Messung der Absorption bei 490 nm.

### 3.6 RNA - Analytik

Für die Differenzierungsversuche wurden die SGBS-Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen eingestreut, kultiviert, bei 70-80% Konfluenz abtrypsiniert und pelletiert. Nachfolgend wurde das erhaltene Pellet im 5 ml Medium resuspendiert und mit einer definierten Zellzahl von 180.000 Zellen pro 25 cm<sup>2</sup> eingestreut. Die Zellzahl wurde mittels Countess™ von Invitrogen ermittelt (siehe 3.3.2).

Folgende Formel wurde für die Berechnung des Volumens für die gewünschte Zellzahl verwendet:

$$\text{Volumen } [\mu\text{l}] = 180.000 \text{ Zellen} \times \text{Gesamtzellzahl } [\mu\text{l}] / \text{gemessene Zellzahl} \times 5000 \mu\text{l}$$

Bei 70-80 %iger Konfluenz erfolgte die Abnahme des Kultivierungsmediums und die Zugabe des Differenzierungsmediums, nach vorherigem Waschen mit PBS. Dieses wurde für 4 Tage auf den Zellen belassen. An Tag 4 erfolgte der Austausch durch das 3FC-Medium. Die 14-tägige Differenzierung wurde an definierten Zeitpunkten (0d, 1d, 3d, 5d, 7d, 10d, 14d) durch abtrypsiniere gestoppt, um die RNA-Expression während der adipogenen Differenzierung zu untersuchen bzw. Proteinisolationen durchzuführen.

#### 3.6.1 Isolation und Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde im Wesentlichen nach der *Single-Step-Methode* von Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi mit Hilfe des Trizol®-Reagenzes durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion (Chomczynski and Sacchi 2006). Dabei wurde weitgehend mit RNase-freien Materialien und Lösungen gearbeitet. Die bei -20 °C gelagerten Zellen wurden aufgetaut, mit 500 µl Trizol® versetzt und in PhaseTrap -Tubes überführt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Nach 15 s kräftigem Schütteln schloss sich eine weitere fünfminütige Inkubationsphase an. Mit Ende der Inkubationszeit wurde der erste Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 13.000 U/min und 4 °C vollzogen, um eine Phasentrennung in eine wässrige und organische Phase zu erzielen. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, wurde in sterile Reaktionsgefäße transferiert und mit einem DNase-Gemisch aus 35 µl RDD-Puffer und 5 µl RNase-freier DNase für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die

Präzipitation der RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Nach erneuter zehnminütiger Inkubation bei RT schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 13.000 U/min und 4 °C an. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µl 96 %-igem eiskalten Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurden die Proben ein weiteres Mal für 5 Minuten bei 7500 U/min und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 75 %-igem eiskalten Ethanol wiederholt. Erneut erfolgte die vorsichtige und möglichst vollständige Abnahme des Überstandes. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und mit 30 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Das Pellet wurde für 10 Minuten bei 60 °C und 900 U/min im Thermoschüttler gelöst und bis zur cDNA-Synthese bei -20 °C aufbewahrt.

Die isolierte RNA wurde mittels Spektralphotometer quantifiziert. Zur Messung der RNA Konzentration wurden die Proben in einem sterilen Reaktionsgefäß mit destilliertem Wasser verdünnt und nachfolgend in eine Einmal-Messküvette (UVette<sup>®</sup>, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 260 nm und 280 nm gegen einen dest.H<sub>2</sub>O Leerwert. Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> gibt Auskunft über die Reinheit der isolierten RNA. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht 1OD = 40 ng/µl. Die Verhältnisse lagen zwischen 1,54-1,79. Dies ist typisch für die mit Trizol<sup>®</sup> präparierte RNA.

Die Berechnung der Gesamt-RNA wurde nach folgender Gleichung vorgenommen:

$$C_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

mit

$C_{\text{RNA}}$  Konzentration der Gesamt-RNA [ $\mu\text{g/ml}$ ]

$\text{OD}_{260}$  Absorption bei 260 nm Wellenlänge

40  $\mu\text{g/ml}$  Multiplikationsfaktor für RNA

### 3.6.2 cDNA-Synthese

Bei der reversen Transkription erfolgt die Umschreibung der mRNA in einen zur mRNA komplementären Strang mittels reverser Transkriptase und Oligo-dT-Primern, die an die Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren. Die Synthese von copy-Desoxyribonucleinsäure (cDNA) erfolgte mittels RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika). Eine Auskunft über die Zusammensetzung des Pre-Annealing-Mix gibt Tabelle 4. Der Ansatz wurde gemischt und in einem ersten Schritt für 5 min und 65 °C im Thermocycler (Biometra T3000,

Göttingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Master-Mix. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 5 aufgelistet. Die Synthese der cDNA erfolgte ebenfalls im Thermocycler (Biometra T3000, Göttingen, Deutschland). Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 6 aufgelistet. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt und dann bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des Pre-Annealing-Mix

Reagenzien	Volumen
RNA (1µg)	x µl
Random Hexamer Primer	1,0 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	x µl
<b>Endvolumen</b>	<b>11,0 µl</b>

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des RT-Mastermix für einen Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen
RNase-freies H <sub>2</sub> O	1,5 µl
5 x Reaction Buffer <sup>1</sup>	4,0 µl
RNase Inhibitor <sup>1</sup>	1,0 µl
dNTP Mix (10 mM)	2,0 µl
Reverse Transkriptase <sup>1</sup>	0,5 µl

<sup>1</sup> Thermo Fisher Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika)

**Tabelle 6:** Übersicht über den Ablauf der cDNA Synthese

Schritt	Dauer	Temperatur
1	10 Minuten	25 °C
2	60 Minuten	42 °C
3	10 Minuten	85 °C
4	PAUSE	4 °C

### 3.6.3 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung eines bestimmten Genabschnittes, welcher mit spezifischen Primerpaaren festgelegt wird und basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. In dieser Arbeit wurde zur Ermittlung der Genexpression eine quantitative real-time PCR im BioRAD MyiQ Cyclyer durchgeführt. Zur Vermessung der mRNA-Expression wurde der SyBrGreen Master Mix verwendet. SyBrGreen interkaliert mit Doppelstrang-DNA und fluoresziert. Die Zunahme der Fluoreszenz entspricht direkt proportional der Menge an Ziel-DNA. Der Ansatz ist Tabelle 8 zu entnehmen. Es wurde jeweils ein No-Template-Control (NTC) pipettiert und die qRT-PCR wie in Tabelle 7 dargestellt im BioRAD MyiQ Cyclyer durchgeführt. Tabelle 10 stellt die verwendeten Primer und deren Sequenzen dar. Als „house keeping gene“ wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Für jedes Primerpaar wurde die optimale Annealing-Temperatur gewählt (Tabelle 8, Schritt 3 \*). Schritte 5 – 7 dienten der Erstellung der Schmelzkurve. Damit wird die Reinheit des Amplifikates überprüft.

**Tabelle 7:** Ansatz des Master-Mix für die qRT-PCR

Reagenzien	Volumen
SyBrGreen Master Mix	7,5 µl
Wasser (RNase-frei)	5,5 µl
Forward-Primer	0,5 µl
Reverse-Primer	0,5 µl
<b>Endvolumen</b>	<b>14,0 µl</b>

**Tabelle 8:** Übersicht über den Ablauf der qRT-PCR

Schritt	Dauer	Temperatur
1	15 Minuten	95 °C
2 (40x)	20 Sekunden	95 °C
3 (40x)	30 Sekunden	60 °C
4 (40x)	30 Sekunden	72 °C
5	1 Minute	95 °C
6	1 Minute	60 °C
7 (81x)	10 Sekunden	55 °C

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit einem Housekeeping Gen (GAPDH), welches nicht reguliert ist, normalisiert. Zur Auswertung der mRNA-Expression wurde das sogenannte „delta-delta CT“ Berechnungsmodell nach Livak und Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001) verwendet. Der CT-Wert beschreibt dabei eine Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal von dem Fluoreszenzsignal des Hintergrundes signifikant abhebt.

$$\begin{aligned} \Delta CP &= CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta CP &= \Delta CP \text{ Behandlung} - \Delta CP \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta CP} \end{aligned}$$

**Abbildung 6:** Übersicht über die delta-delta CT

Dabei werden die CT-Werte der zu untersuchenden mRNA mit den CT-Werten eines Referenzgenes verglichen und relativ quantifiziert.

**Tabelle 9:** Eigenschaften und Sequenzen der verwendeten Primer. Diese wurden mittels des Programms CloneManager designt und von der jeweiligen angegebenen Firma synthetisiert.

Gen	Vorwärtsprimer Sequenz (fw)	Rückwärtsprimer Sequenz (rv)	Firma
GAPDH	5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	Sigma-Aldrich (Steinheim)
AR	5'-CTCGAGAGCCCCAGTGAAGCATTGGAAAC-3'	5'-GCGGCCGCAGTGTGGCTGGCACAGAGTAG -3'	Eurofins Operon (Ebersberg)
IGF-1	5'-TGGATGCTCTTCAGTTCGTG-3'	5'-TGGTAGATGGGGGCTGATAC-3'	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TNF- $\alpha$	5'-CTCGAGAGCGGGCCTACAGCTTTGATCCC-3'	5'-GCGGCCGCAGGAGCAGAGGCTCAGCAATG-3'	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PPAR $\gamma$	5'-CTCGAGAGCGAGCCCAAGTTTGAGTTTGC -3'	5'-GCGGCCGCAAGGTGTCAGATTTTCCCTCA -3'	Eurofins Operon (Ebersberg)
Leptin	5'-CTCGAGAGCCCCTCAGGGATCTTGCATTC-3'	5'-GCGGCCGCAACCCTTCAAGGTCCCTTCAG -3'	Eurofins Operon (Ebersberg)
AdipoQ	5'-CTCGAGAGCTCCTGTCTTGAAGGACTAC-3'	5'-GCGGCCGCAACCTGAAGTCTCAGCTACTC-3'	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)

GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, AR: Androgen-Rezeptor, IGF-1: Insulin-like growth factor-1, TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , PPAR $\gamma$ : Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ , AdipoQ: Adiponektin

### 3.7 Proteinexpressionsanalysen

Für die Proteinexpressionsanalysen wurden die SGBS-Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen eingestreut, kultiviert und bei 70-80 % Konfluenz abtrypsinisiert und pelletiert. Nachfolgend wurde das erhaltene Pellet im 5 ml Medium resuspendiert und mit einer definierten Zellzahl von 180.000 Zellen pro 25 cm<sup>2</sup> eingestreut. Die Zellzahl wurde mittels Countess™ von Invitrogen ermittelt (siehe 3.3.2). Analog dem Differenzierungsversuch zur RNA-Analytik erfolgte die Abnahme des Kultivierungsmediums bei 70-80 %iger Konfluenz und die Zugabe des Differenzierungsmediums nach vorherigem Waschen mit PBS. Dieses wurde für 4 Tage auf den Zellen belassen. An Tag 4 erfolgte der Austausch durch das 3FC-Medium. Die 14-tägige Differenzierung wurde an definierten Zeitpunkten (3d, 5d, 7d, 10d, 14d) durch abtrypsinieren gestoppt, um die Protein-Expression während der adipogenen Differenzierung zu untersuchen bzw. Proteinisolierungen durchzuführen. Bis zur Durchführung der Proteinisolation wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

#### 3.7.1 Proteinisolation

Die Proteinisolation wurde mittels RIPA-Puffer (Tabelle 10) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen analog wie bei den in 2.5. beschriebenen RNA-Isolationsversuchen behandelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gespült, anschließend mit Trypsin abgelöst und darauffolgend für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde mit 100 µl RIPA-Puffer, welcher mit 2 µl Protease-Inhibitor versetzt wurde, resuspendiert und nachfolgend 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 U/min und 4 °C. Der so gewonnene Proteinüberstand wurde in ein neues Tube überführt und bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde verworfen.

**Tabelle 10:** Übersicht über die Zusammensetzung des RIPA-Puffers

Reagenz	Konzentration
Tris-HCL (pH 7,4)	50 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
TritonX-100	1 %
Deoxycholat	0,25 %

### 3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinmenge wurde mittels Bradford-Assay kalorimetrisch durch die Messung der Absorption an einem Spektralphotometer bestimmt. Hierzu wurde eine Verdünnung (80 % Bradford-Reagenz und 20 % Aqua bidest.) hergestellt und mit 1 µl der zu vermessenden Probe versehen. Die Bestimmung erfolgte am Eppendorf-Photometer bei 595 nm, wobei zuvor eine Standardkurve bei identischer Extinktion ermittelt wurde.

### 3.7.3 Probenaufbereitung und Elektrophorese

Eine Übersicht über die Zusammensetzung des Probenansatzes gibt Tabelle 11. Im Anschluss wurden die Proben kurz herunterzentrifugiert und für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Kammern wurden mit MES SDS Running Buffer befüllt und die Taschen gespült. Darauffolgend wurden die Proben auf das 4-12 %-iges Bis-Tris-Gradienten Gel aufgetragen. In einen der Slots wurde ein 6 µl Protein-Molekulargewichtstandard aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auftrennung für ca. eine Stunde bei 200 V und 85 mA sowie 4 °C.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des Probenansatzes für 20 µg Gesamtprotein

Reagenzien	Volumen
LDS Sample Buffer	5,0 µl
Sample Reducing Agent	2,0 µl
Wasser (RNase-frei)	X µl
Proteinprobe	X µl
<b>Endvolumen</b>	<b>22,0 µl</b>

**Tabelle 12:** Übersicht über die Zusammensetzung des MES-Laufpuffers

Reagenz	Konzentration
MES Puffer (20x)	50 ml
Aqua bidest.	950 ml

### 3.7.4 Western – Blot

Mittels Western-Blot ist eine Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches möglich. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung von Antikörpern, die sich spezifisch an antigene Epitope des Zielproteins, welches sich auf einer Nitrozellulosemembran befindet, binden. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine mit Methanol aktivierte PVDF- Membran durch einen Elektrobplot überführt. Dies erfolgte mittels Transferpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 13) bei 200 V und 300 mA für 1,5 Stunden. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Dazu wurde die Membran für eine Stunde bei RT in einer Magermilchsuspension aus 10 % Magermilchpulver und TBS-T (Zusammensetzung siehe Tabelle 14) inkubiert.

**Tabelle 13:** Übersicht über die Zusammensetzung des Transferpuffers

Reagenz	Konzentration
Transferpuffer (20x)	50 ml
MeOH	100 ml
Auqua bidest.	850 ml

**Tabelle 14:** Übersicht über die Zusammensetzung TBS-T

Reagenz	Konzentration
TBS	50 ml
TWEEN 20	500 µl
Auqua bidest.	450 ml

Danach erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung bei 4 °C über Nacht in einer 10 %igen Magermilchpulverlösung. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 20 min mit TBS-T (Tabelle 15) gewaschen. Darauf wurde die Membran in ein neues Greiner Röhrchen überführt und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in einer 10 %igen Magermilchpulverlösung für 1 h bei RT inkubiert. Hiernach vollzog sich ein zweiter dreimaliger Waschschrift für je 20 min mit TBS-T, zur Entfernung überschüssiger freier Antikörper. Die Proteinbanden des gesuchten Proteins wurden dann mittels ECL-Lösung, welche unmittelbar davor frisch hergestellt wurde, auf einem fotoempfindlichen Film detektiert. Hierfür wurde die Membran in einer Dunkelkammer bei Rotlicht in einer Lösung aus Peroxide Solution und Lumonol Enhancer Solution (1:1 Verdünnung) inkubiert. Durch den aufgetragenen Größenmarker konnten das entsprechende Molekulargewicht des Proteins detektiert werden.

**Tabelle 15:** Übersicht über den verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Species	Verdünnung
Primär: Adiponektin Firma Abcam	Mouse	1:2500 in 3 % Abcam BSA/TBST
Sekundär:	Goat anti mouse	

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit der Software Microsoft EXCEL für Windows durchgeführt. Das vorliegende Datenmaterial wurde aus Zellen gewonnen, die aus einer gemeinsamen SGBS-Zelllinie und somit aus einer Grundgesamtheit stammen. Somit wurde bei der Datenverteilung von einer Normalverteilung ausgegangen und der T-Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgelegt ( $p < 0,05$ ). Bei  $p < 0,1$  wurde der Unterschied als tendenziell bezeichnet. Signifikante Unterschiede sind generell durch unterschiedliche Hochbuchstaben oder Sternchen gekennzeichnet. Die Darstellungen in den Ergebnisdiagrammen zeigen die jeweiligen Mittelwerte und die Standardabweichungen der Einzelwerte, wobei n die Anzahl der Messwerte angibt.

## **4 Ergebnisse**

Die Masse des Fettgewebes wird sowohl durch die Anzahl als auch durch die Differenzierung, durch eine Veränderung des Volumens der Adipozyten aufgrund von Triglyzerideinlagerungen reguliert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von BMS-564929 und von DHT auf die adipogene Differenzierung untersucht. Zu diesem Zweck wurden humane Präadipozyten eines Patienten mit Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS-Zellen) in einem 14-tägigen Kultivierungsschema zu reifen Adipozyten differenziert.

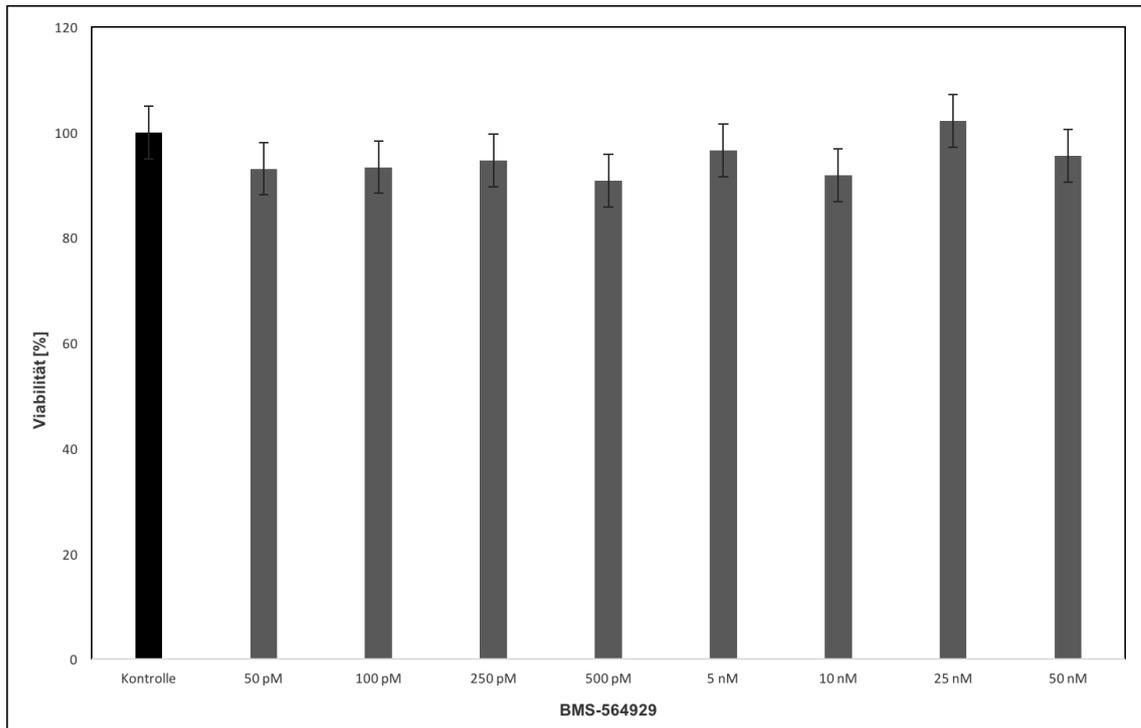
### **4.1 Effekte von BMS-564929 auf die Viabilität und Differenzierung von SGBS-Zellen**

Zu Beginn der Arbeiten sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die Stimulation der SGBS-Zellen mit BMS-564929 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Viabilität und die adipogene Differenzierung dieser Zellen hat.

#### **4.1.1 Effekte von BMS-564929 auf die Viabilität der SGBS-Zellen**

In einem ersten Experiment wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen mit Hilfe des MTT-Tests analysiert. Der Test beruht auf der Reduktion von MTT, einem gelben, wasserlöslichen Farbstoff, in blau-violette Formazankristalle. Der Anteil der lebenden Zellen wird durch die Bildung des blauen Farbstoffes angezeigt und kann mittels Extinktionsmessung verifiziert werden, wobei die gemessene Extinktion mit der Anzahl der lebenden Zellen korreliert.

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse des MTT-Tests. Dargestellt ist der Anteil der lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 %), in welcher die Zellen nur mit dem für den SARM verwendeten Lösungsmittel DMSO behandelt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass der verwendete SARM BMS-564929 in Bezug auf die Kontrolle in allen verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten toxischen Einfluss auf die SGBS-Zellen ausübt. Auch in der höchsten verwendeten Konzentration des SARMS (50 nM) konnten 95% lebende Zellen detektiert werden, bei 50 pM waren 93 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vital.



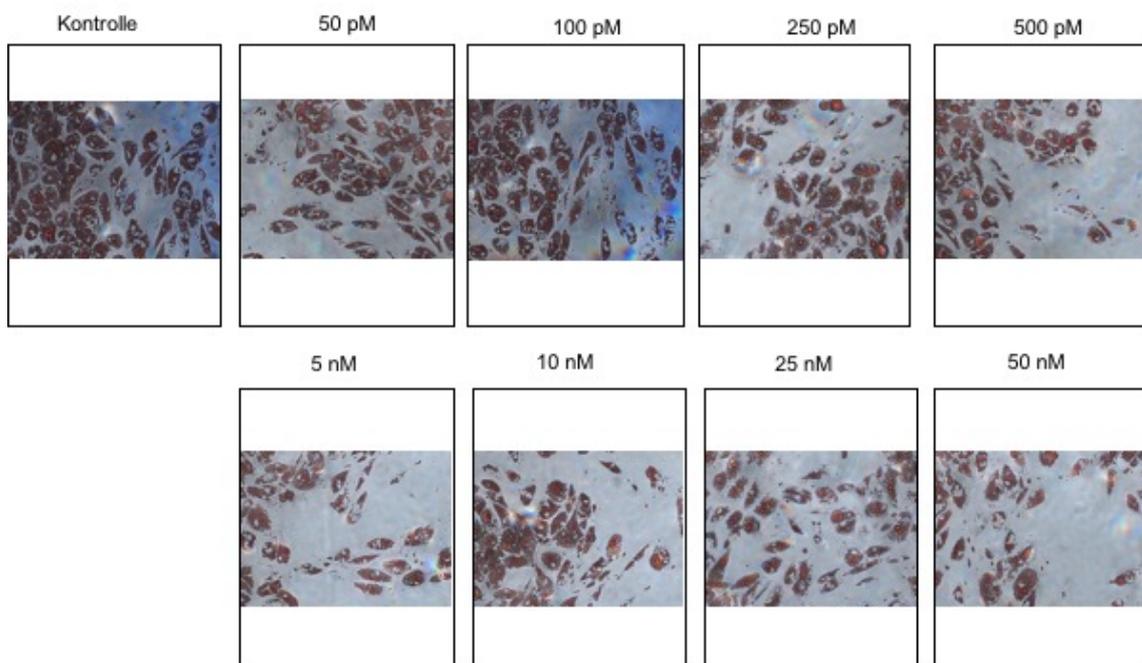
**Abbildung 7:** Einfluss von BMS-564929 auf die Viabilität der SGBS-Zellen. SGBS-Prädipozyten wurden in serumfreien Differenzierungsmedium mit aufsteigenden Konzentrationen von BMS-564929 beziehungsweise DMSO als Lösungsmittel (Kontrolle) inkubiert. Dargestellt ist die Viabilität in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p < 0,05$  im zweiseitig ungepaarten Student's t-Test).

Zusammenfassend zeigen die Experimente keine signifikante Viabilitätsminderung durch BMS-564929 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### 4.1.2 Einfluss von BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung

In einer weiteren experimentellen Untersuchung wurde der Einfluss von BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung untersucht. Dazu wurden die SGBS-Zellen während des Differenzierungsprozesses durch Zugabe von BMS-564929 in unterschiedlichen Konzentrationen (50 pM, 100 pM, 250 pM, 500 pM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM) behandelt und nach Abschluss der Differenzierung an „Tag 14“ mit Oil Red O gefärbt und fotografisch festgehalten. Nach Extraktion mit 100 % Isopropanol erfolgte die quantitative Messung der Absorption bei 490 nm.

Abbildung 8 zeigt repräsentative Oil Red O-Färbungen der mit BMS-564929 inkubierten Zellen nach 14 Tagen Differenzierung, im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle. Durch die Oil Red O-Färbung werden die Triglyzeride in den SGBS-Zellen rot angefärbt. Es zeigen sich in der DMSO-Kontrolle deutlich mehr angefärbte Lipidtröpfchen als in den mit BMS-564929 behandelten Zellen. Es lässt sich erkennen, dass mit steigender Konzentration des SARMs weniger Lipidtröpfchen angefärbt werden. Somit konnte schon lichtmikroskopisch eine Hemmung der adipogenen Differenzierung durch BMS-564929 angenommen werden, mit einer Tendenz zur stärkeren Inhibition der Adipogenese bei zunehmender SARM-Konzentration.

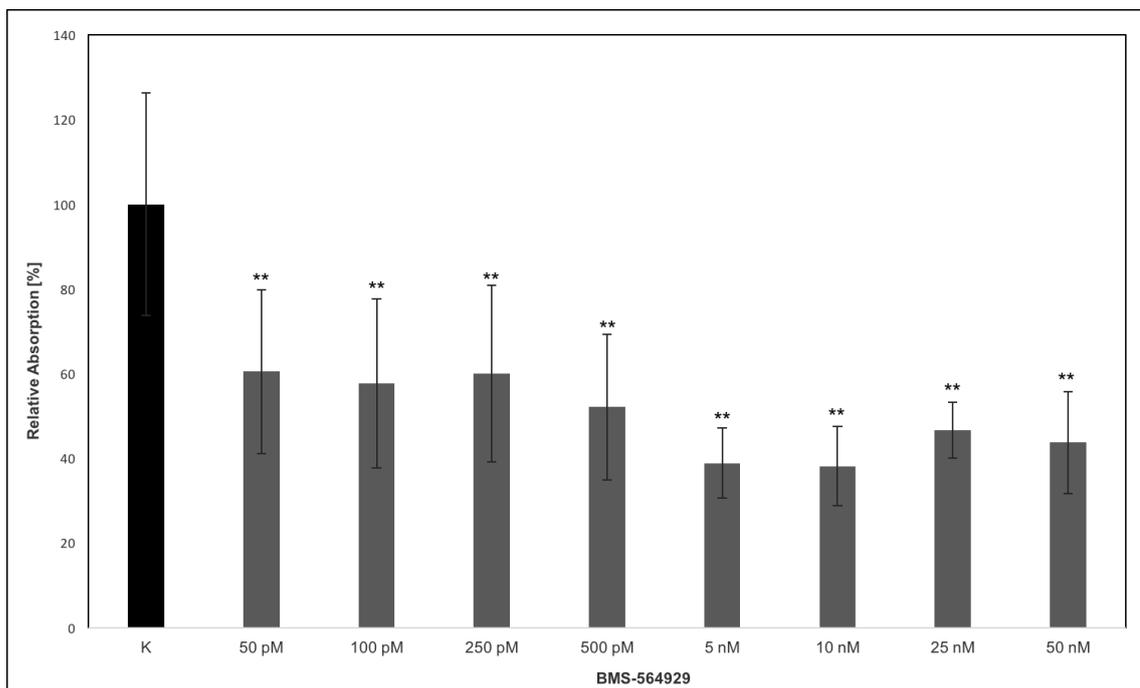


**Abbildung 8:** Photographische Dokumentation der angefärbten SGBS-Zellen. SGBS Präadipozyten wurden in serumfreiem Differenzierungsmedium mit aufsteigenden Konzentrationen von BMS-564929 beziehungsweise DMSO als Lösungsmittel (Kontrolle) inkubiert. Nach Abschluss der Differenzierung am „Tag 14“ wurden die Lipideinlagerungen in den Zellen durch die Färbung mit Oil Red O sichtbar gemacht und exemplarisch lichtmikroskopisch fotografisch dargestellt (Vergrößerung 40X).

In einem weiteren Schritt erfolgte nach Extraktion mit 100 % Isopropanol die quantitative Messung der Absorption bei 490 nm.

Abbildung 9 zeigt die relative Absorption, der mit BMS-564929 behandelten Zellen, bezogen auf die DMSO Kontrolle (100 %) in Prozent. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (N=6, n=3). Insgesamt konnte, wie schon lichtmikroskopisch sichtbar, eine signifikante Hemmung der adipogenen Differenzierung in allen eingesetzten Konzentrationen detektiert werden ( $p < 0,01$ , siehe Abbildung 9), wobei die

Inhibition der Adipogenese dosisabhängig erfolgte. SGBS-Zellen, die mit 50 nM BMS-564929 behandelt wurden wiesen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine relative Absorption von 43 % und im Vergleich zu mit 50 pM inkubierten Zellen von 27 % auf. Der größte Unterschied bestand mit 38 % bei der mit 10 nM und 5 nM BMS-564929 behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Auch in der mit 50 pM behandelten Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied von 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zusammenfassend zeigte sich unter Zugabe von BMS-564929 in allen eingesetzten Konzentrationen nach 14 Tagen eine signifikant geringere relative Absorption nach Oil Red O Färbung im Vergleich zur Kontrolle.

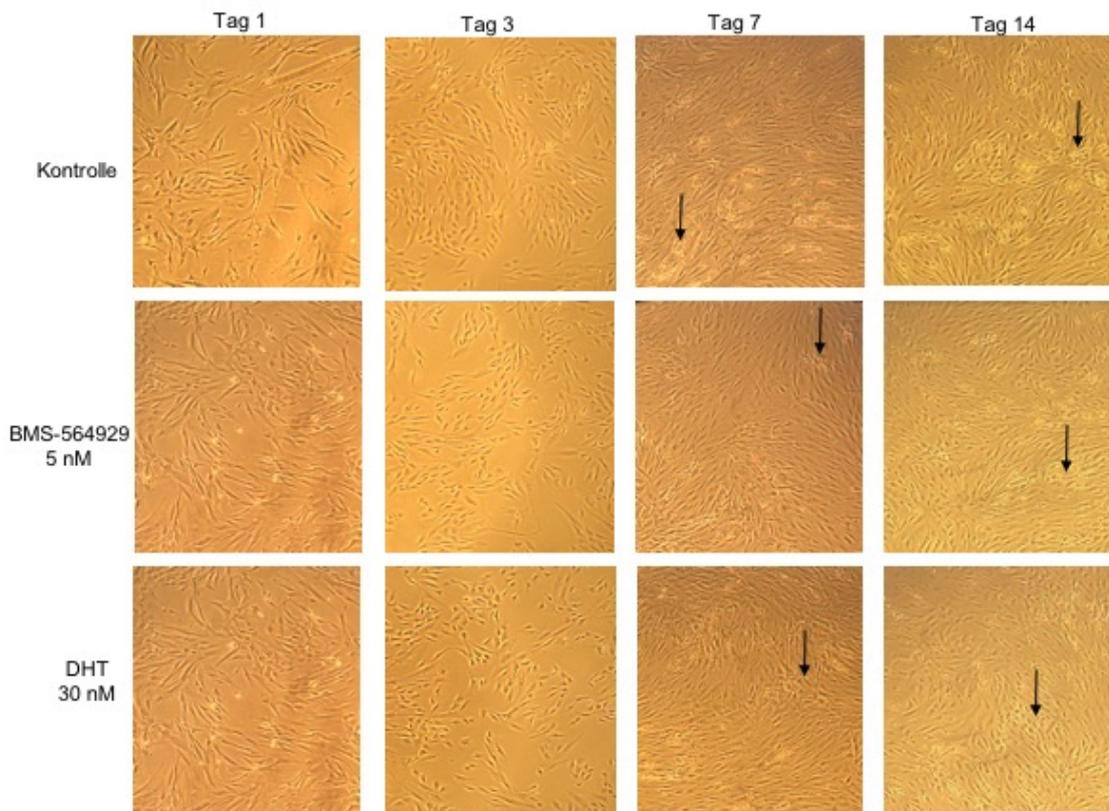


**Abbildung 9:** Einfluss von BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung der SGBS-Zellen.

SGBS Präadipozyten wurden in serumfreiem Differenzierungsmedium 14 Tage mit aufsteigenden Konzentrationen von BMS-564929 beziehungsweise DMSO als Lösungsmittel (Kontrolle) inkubiert. Dargestellt ist die relative Absorption in Prozent, nach Oil Red O Färbung, bezogen auf die Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt ( $N=6$ ,  $n=3$ ,  $** p < 0,01$ ) im zweiseitig ungepaarten Student's t-Test.

#### 4.1.3 Einfluss von BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung

Abbildung 10 zeigt repräsentativ den zeitlichen Verlauf der Differenzierung der mit 5 nM BMS-564929 sowie 30 nM DHT inkubierten Zellen im Verlauf der adipogenen Differenzierung im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle. Hier zeigt sich lichtmikroskopisch eine deutlich geringere Anzahl an ausgebildeten Fettvakuolen sowohl unter BMS-564929 als auch unter DHT Behandlung an Tag 7 und an Tag 14 im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle.



**Abbildung 10:** Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die adipogene Differenzierung. Lichtmikroskopische Darstellung der SGBS-Zellen (Vergrößerung 40x) im zeitlichen Verlauf der adipogenen Differenzierung Tag 1, 3, 7 und 14. Reihe 1 entspricht der DMSO-Kontrolle, Reihe 2 die Zellen unter Zugabe von 5 nM BMS-564929 und Reihe 3 unter Zugabe von 30 nM DHT. Die Pfeile markieren exemplarisch die Fettvakuolen der reifen Adipozyten.

## 4.2 Effekte von BMS-564929 auf die Genexpression

In diesem Teil der Arbeit wurde die Genexpression einiger ausgewählter Gene unter BMS-564929 und Dihydrotestosteron analysiert. Hierzu wurden die SGBS-Prädipozyten unter Verwendung der Differenzierungsmedien zur adipogenen Differenzierung angeregt und zusätzlich mit 5 nM BMS-564929 (SARM) oder 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) behandelt. Die 14-tägige Differenzierung wurde an definierten Zeitpunkten (Tag 1, Tag 3, Tag 7, Tag 10 und Tag 14) gestoppt und die mRNA-Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung vermessen.

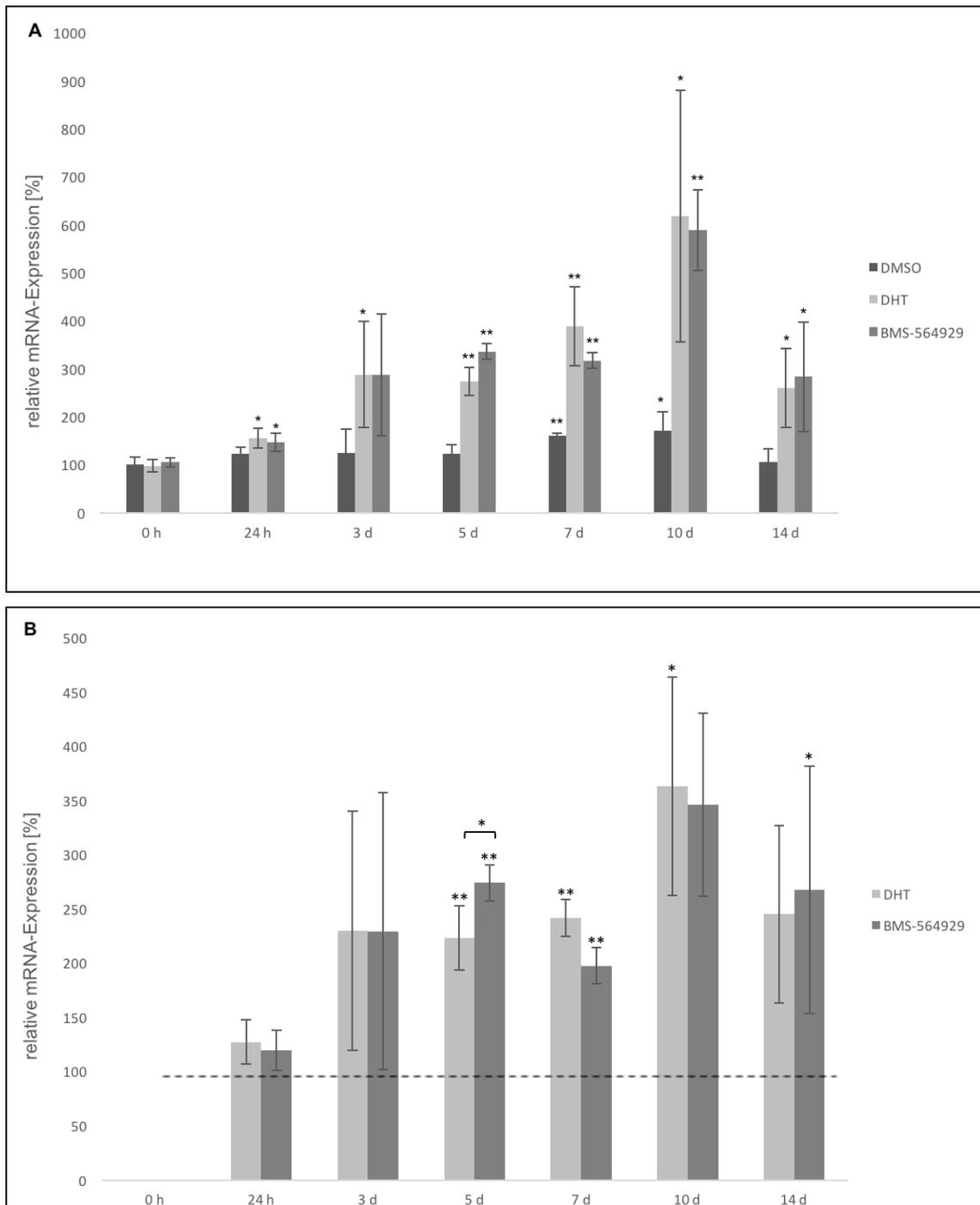
Es wurden die unten aufgeführten Gene von BMS-564929 sowie DHT-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen an Tag 0, 1, 5, 7, 10 und 14 vermessen.

- Androgenrezeptor
- Adiponektin
- IGF-1
- PPAR $\gamma$
- Leptin
- TNF- $\alpha$

#### 4.2.1 Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression des Androgenrezeptors

Abbildung 11 A und B zeigen die relative mRNA-Expression von Androgenrezeptor im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung der SGBS-Zellen. Es zeigt sich, dass bereits SGBS-Prädipozyten AR exprimieren, wobei die mRNA-Expression im Verlauf der Differenzierung in der Kontrolle weitestgehend konstant blieb (125 % an Tag 3 und 106 % an Tag 14). In Abbildung A wurde Tag 0 der DMSO-Kontrolle 100 Prozent gesetzt und alle anderen Tage (DMSO, DHT und BMS-564929) darauf bezogen, sodass die Veränderungen während der Adipogenese beurteilt werden konnten. Dabei zeigt sich, dass sowohl unter der Zugabe von DHT als auch von BMS-564929 ab 24 Stunden Differenzierung die mRNA-Expression des AR signifikant im Vergleich zur Kontrolle Tag 0 ansteigt. Die maximale Expression konnte an Tag 10 detektiert werden (DHT 618 %,  $p=0,02$ ; BMS-564929 589 %,  $p=0,0005$ ), wobei an Tag 14, wie in Abbildung A sichtbar, die relative mRNA-Expression unter Einfluss von DHT und BMS-564929 wieder abnahm.

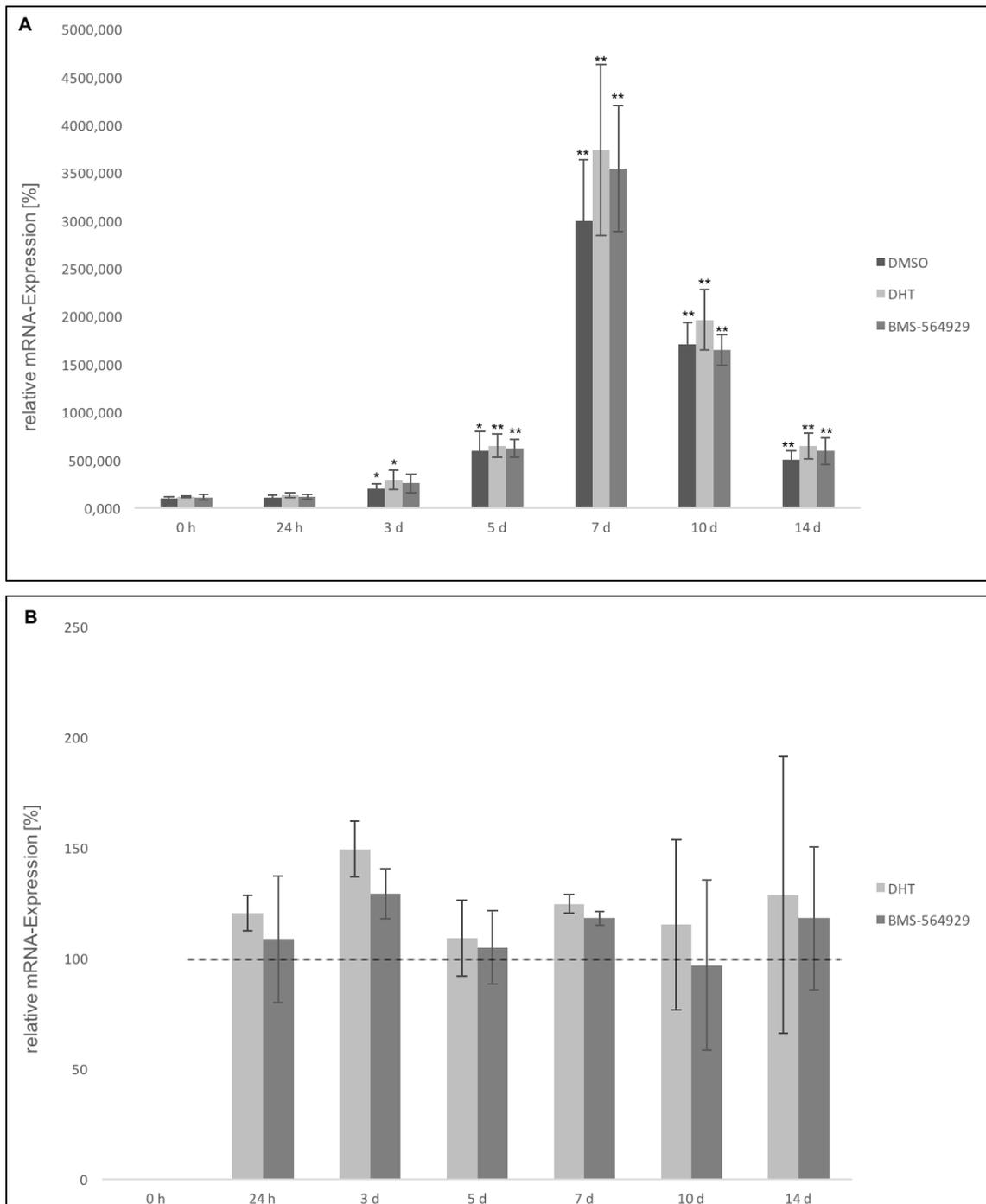
Abbildung B stellt die mRNA-Expression des AR unter Einfluss von DHT und BMS-564929 bezogen auf die Kontrolle (=100 %) zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Ab Tag 5 der adipogenen Differenzierung zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Expression unter Zugabe von DHT (223 %,  $p=0,0001$ ) als auch von BMS-564929 (274 %,  $p=0,0001$ ). Des Weiteren besteht an diesem Tag eine statistisch signifikante höhere Expression unter Zugabe von BMS-564929 im Vergleich zu DHT ( $p=0,03$ ). Die maximale Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wird an Tag 10 erreicht (DHT 362 %, BMS-564929 346 %). Im weiteren Verlauf konnte kein Unterschied zwischen DHT und BMS-564929 detektiert werden.



**Abbildung 11:** Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression des Androgenrezeptors. Dargestellt ist die mRNA-Expression von Androgenrezeptor der SGBS-Zellen im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung unter Zugabe von 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) sowie 5 nM BMS-564929 (SARM). Als Kontrolle dienten DMSO behandelte Zellen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte, bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle von Tag 0 in Abbildung A und bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle des jeweiligen Tages in Abbildung B. Die Auswertung erfolgte nach dem sogenannten „delta-delta CT“ Berechnungsmodell nach Livak und Schmittgen, wobei GAPDH als Referenzgen diente. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ) im zweiseitig gepaarten Student's t-Test.

#### **4.2.2 Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von Adiponektin**

Des Weiteren wurde der Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA Expression von Adiponektin im Laufe der Differenzierung untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Adiponektin zu Beginn der adipogenen Differenzierung nur sehr gering exprimiert wird und ein Anstieg der mRNA-Expression im Verlauf der 14-tägigen adipogenen Differenzierung der SGBS-Zellen zu verzeichnen ist, wobei sich eine maximale, ca. 30-fach höhere, Expression an Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle an Tag 0 zeigte (DMSO-Kontrolle 3001 %,  $p=0,001$ ; DHT 3738 %,  $p=0,002$ ; BMS-564929 3544 %,  $p=0,0008$ ). Im weiteren Verlauf der adipogenen Differenzierung konnte, wie in Abbildung A ersichtlich, eine Abnahme der Expression verzeichnet werden, dennoch aber immer noch signifikant erhöht, im Vergleich zur Kontrolle an Tag 0. Wie in Abbildung B sichtbar, konnte sowohl unter Zugabe von DHT als auch unter Zugabe von BMS-564929 kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression von Adiponektin im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle detektiert werden.

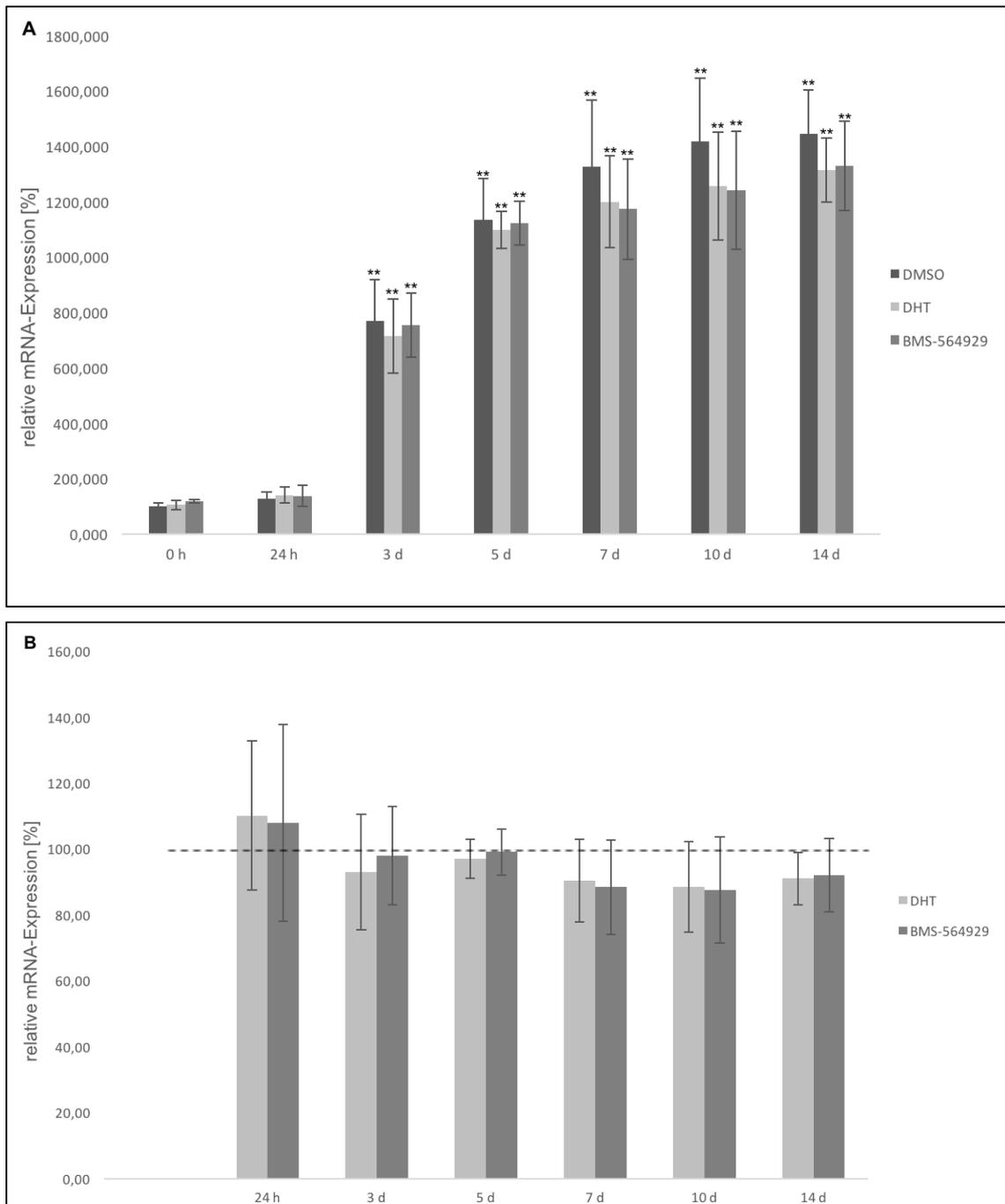


**Abbildung 12:** Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von Adiponektin.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von Adiponektin der SGBS-Zellen im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung unter Zugabe von 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) sowie 5 nM BMS-564929 (SARM). Als Kontrolle dienten DMSO behandelte Zellen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte, bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle von Tag 0 in Abbildung A und bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle des jeweiligen Tages in Abbildung B. Die Auswertung erfolgte nach dem sogenannten „delta-delta CT“ Berechnungsmodell nach Livak und Schmittgen, wobei GAPDH als Referenzgen diente. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt im zweiseitig ungepaarten Student's t-Test.

#### 4.2.3 Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von IGF-1

In Abbildung 13 A und B ist die mRNA-Expression von IGF-1 unter Einfluss von DHT sowie BMS-564929 dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass bereits humane SGBS-Präadipozyten IGF-1 exprimieren und die Expression am dritten Tag der adipogenen Differenzierung signifikant um das 7,6-fache ( $p=0,001$ ) zur Kontrolle Tag 0 ansteigt und im weiteren Verlauf bis Tag 14 der Differenzierung auf hohem Niveau erhalten bleibt. Abbildung B zeigt die mRNA-Expression unter Einfluss von DHT und BMS-564929 bezogen auf die DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages. Es zeichnet sich eine geringere IGF-1 Expression unter Einfluss der beiden Substanzen ab, allerdings ohne Signifikanz. An Tag 14 zeigte sich unter Einfluss des SARMs eine Expression von 92 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (100 %).

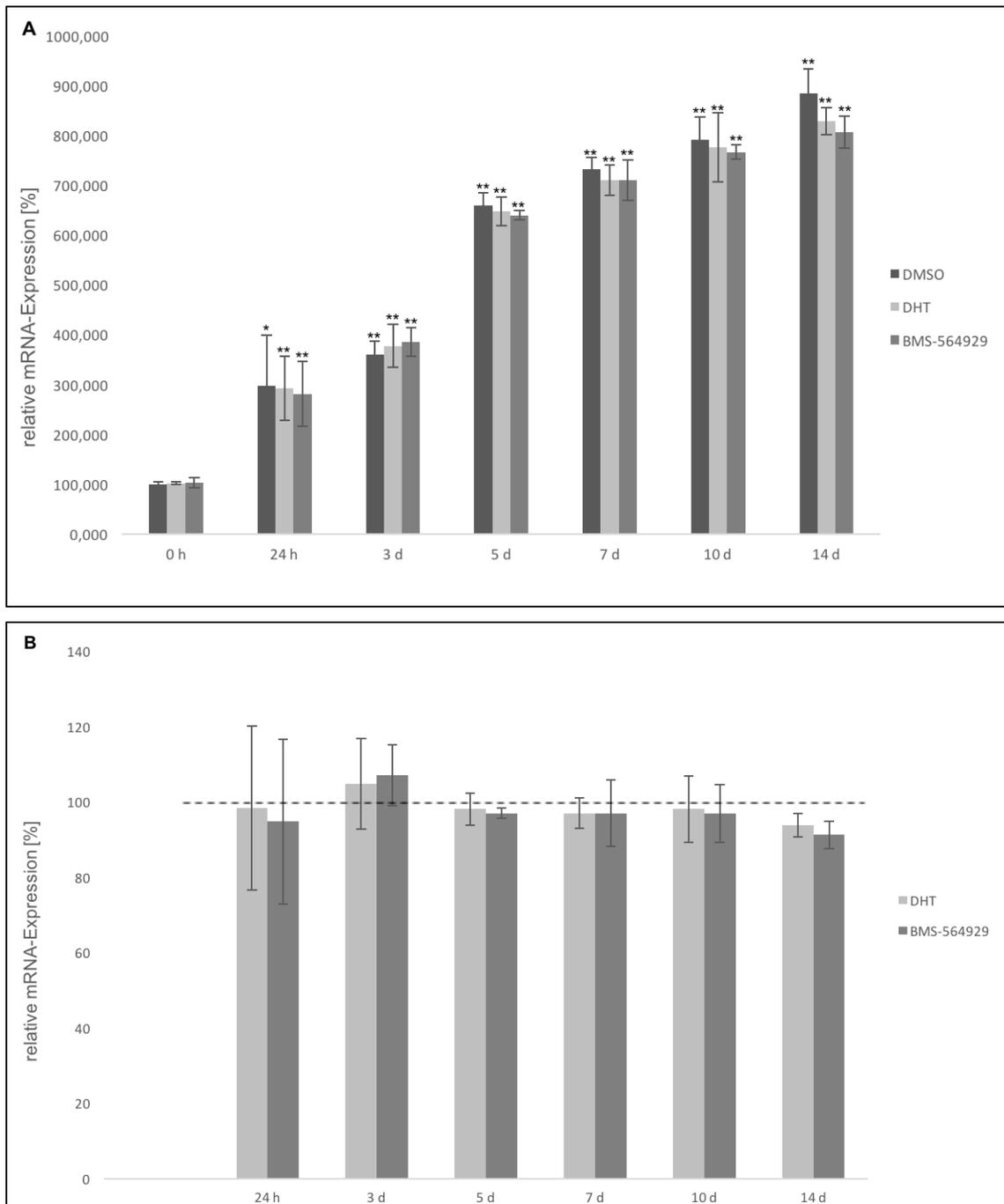


**Abbildung 13:** Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von IGF-1.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von IGF-1 der SGBS-Zellen im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung unter Zugabe von 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) sowie 5 nM BMS-564929 (SARM). Als Kontrolle dienten DMSO behandelte Zellen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte, bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle von Tag 0 in Abbildung A und bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle des jeweiligen Tages in Abbildung B. Die Auswertung erfolgte nach dem sogenannten „delta-delta CT“ Berechnungsmodell nach Livak und Schmittgen, wobei GAPDH als Referenzgen diente. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ) im zweiseitig ungepaarten Student's t-Test.

#### **4.2.4 Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$**

Bezogen auf die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  konnte festgestellt werden, dass humane SGBS-Prädipozyten PPAR $\gamma$  exprimieren und bereits nach 24 Stunden ein signifikanter Anstieg um 197 % ( $p=0,02$ ) im Vergleich zur Kontrolle Tag 0 zu verzeichnen ist. Insgesamt, wie in Abbildung A dargestellt, steigt die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung, im Vergleich zur 100 % Kontrolle an Tag 0, um das 8,8-fache an (d 14 DMSO-Kontrolle: 883 %,  $p=0,0001$ ). Jedoch zeigt die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  keine Veränderungen unter Zugabe von DHT oder BMS-564929 (Abbildung B).

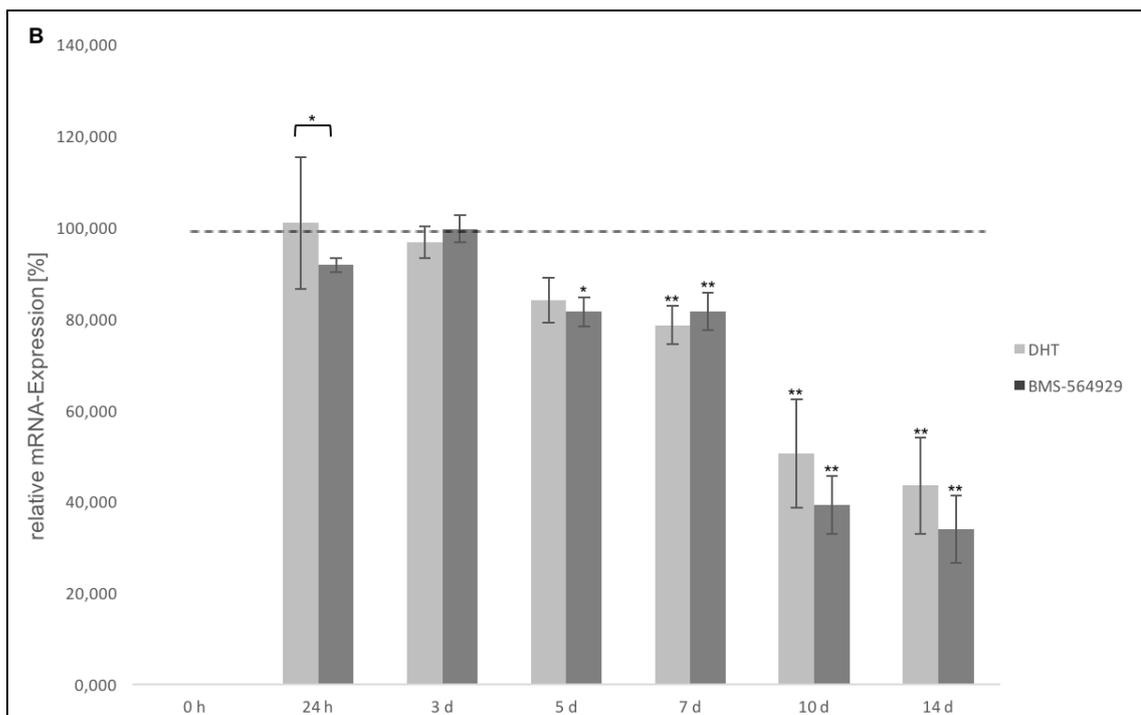
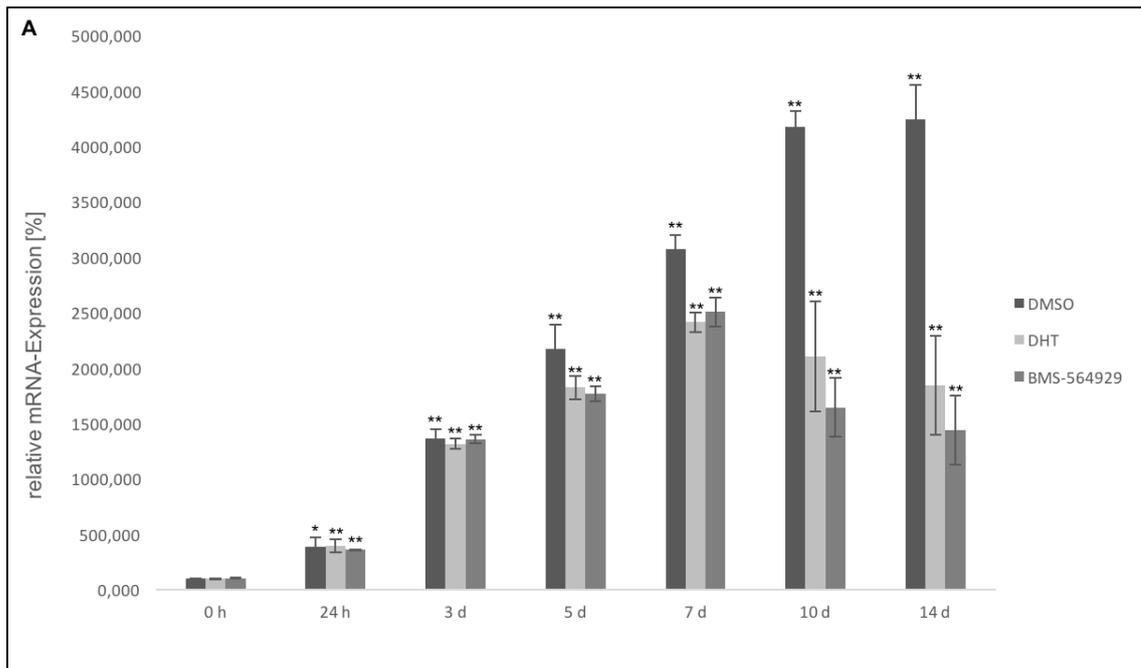


**Abbildung 14:** Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$ .

Dargestellt ist die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  der SGBS-Zellen im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung unter Zugabe von 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) sowie 5 nM BMS-564929 (SARM). Als Kontrolle dienten DMSO behandelte Zellen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte, bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle von Tag 0 in Abbildung A und bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle des jeweiligen Tages in Abbildung B. Die Auswertung erfolgte nach dem sogenannten „delta-delta CT“ Berechnungsmodell nach Livak und Schmittgen, wobei GAPDH als Referenzgen diente. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ) im zweiseitig ungepaarten Student's t-Test.

#### 4.2.5 Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von Leptin

Ferner wurde die mRNA-Expression von Leptin im Verlauf der adipogenen Differenzierung und unter Einfluss von DHT und BMS-564929 untersucht. Generell konnte, wie in Abbildung A dargestellt, gezeigt werden, dass es von Präadipozyten nur sehr gering exprimiert wird und im Laufe der adipogenen Differenzierung zu einer 40-fachen Steigerung der mRNA-Expression von Leptin kommt (Tag 14 DMSO-Kontrolle: 4240 %,  $p=0,00002$ ), wobei schon nach 24 Stunden eine signifikante Steigerung zu verzeichnen ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl DHT als auch BMS-564929 die Expression von Leptin signifikant hemmt. Abbildung B zeigt die mRNA-Expression in Prozent, bezogen auf die DMSO-Kontrolle an dem Tag. An Tag 5 der adipogenen Differenzierung der SGBS-Zellen konnte eine reduzierte Leptin Expression unter Zugabe von BMS-564929 von 81,5 % ( $p=0,03$ ) im Vergleich zur 100 % DMSO-Kontrolle verzeichnet werden. Zusätzlich zeigte sich mit fortschreitender Adipogenese der mit DHT oder BMS-564929 inkubierten SGBS-Zellen auch eine stärkere Abnahme der mRNA-Expression von Leptin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (=100 %), wobei eine maximale Hemmung an Tag 14 detektiert werden konnte (DHT: 43,4 %,  $p=0,001$ ; BMS: 33,9 %,  $p=0,003$ ). Die Ergebnisse deuten zwar auf eine stärkere Abnahme der Expression unter Zugabe von BMS-564929 im Vergleich zu DHT hin, diese waren allerdings nicht signifikant.

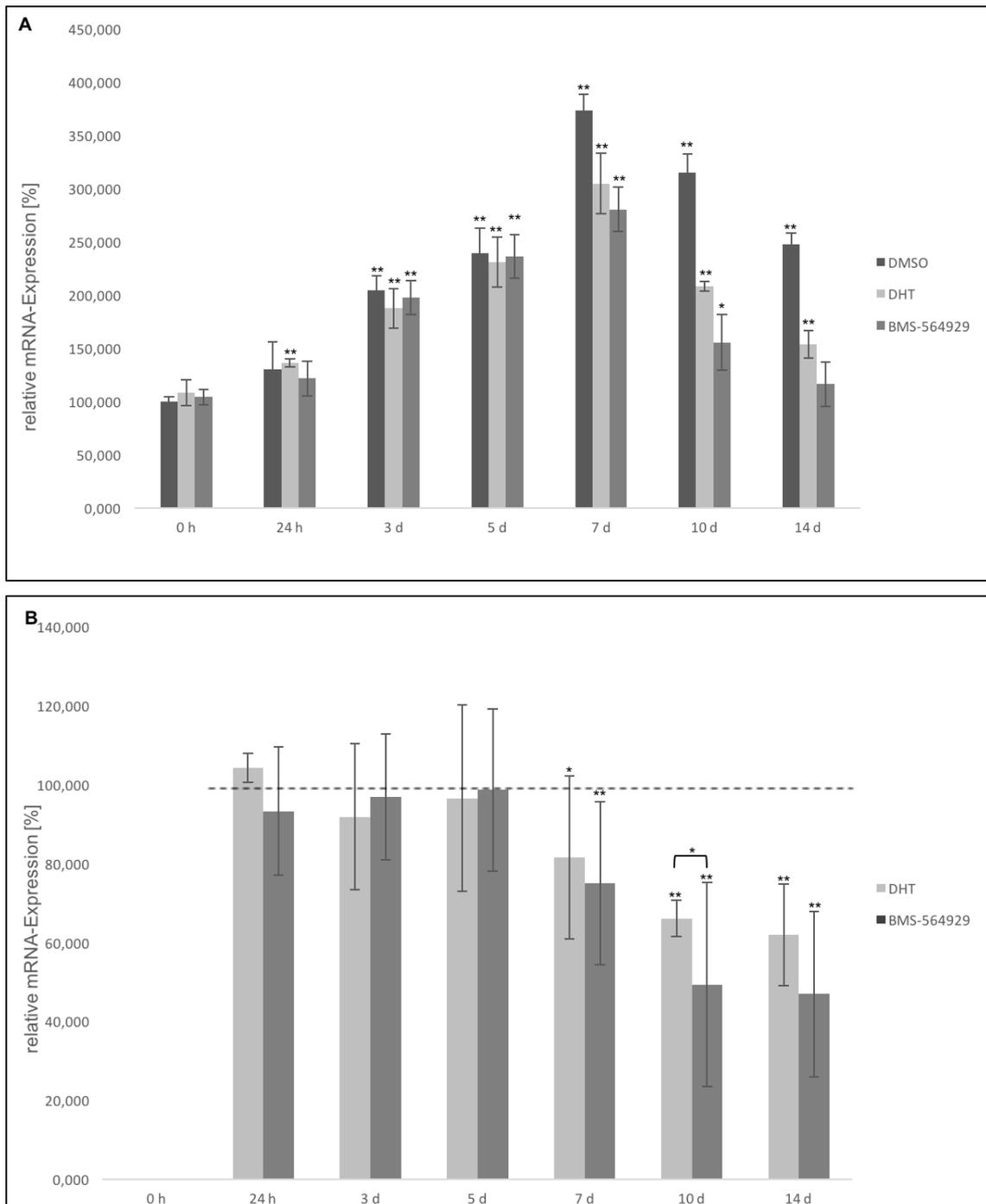


**Abbildung 15:** Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von Leptin.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von Leptin der SGBS-Zellen im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung unter Zugabe von 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) sowie 5 nM BMS-564929 (SARM). Als Kontrolle dienten DMSO behandelte Zellen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte, bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle von Tag 0 in Abbildung A und bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle des jeweiligen Tages in Abbildung B. Die Auswertung erfolgte nach dem sogenannten „delta-delta CT“ Berechnungsmodell nach Livak und Schmittgen, wobei GAPDH als Referenzgen diente. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ) im zweiseitig ungepaarten Student's t-Test.

#### 4.2.6 Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$

Außerdem wurde der Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  im Verlauf der adipogenen Differenzierung von SGBS-Zellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass schon Präadipozyten TNF- $\alpha$  exprimieren und die mRNA-Expression ab Tag 3 der Differenzierung signifikant zur DMSO-Kontrolle Tag 0 (100 %) ansteigt (d3: DMSO: 204 %,  $p=0,0002$ ; DHT: 187 %,  $p=0,001$ ; BMS-564929: 197 %,  $p=0,0005$ ). Es konnte eine maximale Expression an Tag 7 der DMSO-Reihe an Tag 7 (373 %,  $p=0,0007$ ) im Vergleich zu Tag 0 detektiert werden, wobei dann im weiteren Verlauf ein Rückgang der mRNA-Expression zu verzeichnen war (dargestellt in Abbildung 14 A). Abbildung 14 B zeigt die relative mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  unter Zugabe von DHT bzw. BMS-564929 bezogen auf 100 % DMSO-Kontrolle des jeweiligen Tages während der adipogenen Differenzierung. Ab Tag 7 konnte eine Hemmung der Expression sowohl durch Zugabe von DHT als auch von BMS-564929 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle von Tag 7 festgestellt werden (d7: DHT: 83 %,  $p=0,02$ ; BMS-564929: 75 %,  $p=0,003$ ). Außerdem zeigte sich an Tag 10 eine 1,3-fach stärkere Hemmung der Expression unter Zugabe von BMS-564929 im Vergleich zu DHT. ( $p=0,02$ ).

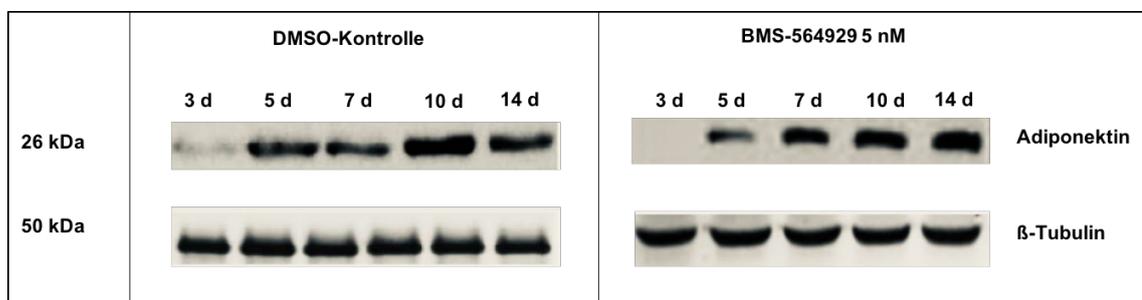


**Abbildung 16:** Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ .

Dargestellt ist die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  der SGBS-Zellen im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung unter Zugabe von 30 nM Dihydrotestosteron (DHT) sowie 5 nM BMS-564929 (SARM). Als Kontrolle dienten DMSO behandelte Zellen. Bei den dargestellten Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte, bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle von Tag 0 in Abbildung A und bezogen auf die 100 Prozent Kontrolle des jeweiligen Tages in Abbildung B. Die Auswertung erfolgte nach dem sogenannten „delta-delta CT“ Berechnungsmodell nach Livak und Schmittgen, wobei GAPDH als Referenzgen diente. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt (\*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ ) im zweiseitig ungepaarten Student's t-Test.

### 4.3 Proteinquantifizierung mittels Western-Blot-Analyse

Adiponektin wurde mittels Western-Blot-Analyse auf Proteinebene quantifiziert, um die posttranskriptionelle Genregulation zu untersuchen. Während der 14-tägigen Differenzierung wurden die Zellen mit 30 nM DHT oder 5nM BMS-564929 behandelt und die Adipogenese an den definierten Zeitpunkten gestoppt und die Proteinexpression vermessen. Bei der Proteinexpression von Adiponektin ist zu erkennen, dass diese im Verlauf der Adipogenese ansteigt. Es zeigte sich keine Veränderung unter Zugabe von BMS-564929 (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Proteinexpression von Adiponektin in humanen SGBS-Zellen im Verlauf der adipogenen Differenzierung unter Zugabe von DMSO (Kontrolle) sowie unter Zugabe von 5 nM BMS-564929. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

## 5 Diskussion

Mit zunehmendem Alter des Mannes kommt es zu einer Abnahme des Testosteronspiegels, was das klinische Syndrom des Late-onset Hypogonadismus bedingt. Es ist bekannt, dass niedrige Plasmatestosteronlevel mit einem metabolischen Syndrom, assoziiert mit der Zunahme des viszeralen Fettgewebes, sowie erhöhtem Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen und einem erhöhten Mortalitätsrisiko einhergehen (Zitzmann 2009). Ernährungsumstellung und körperliche Bewegung sind essenziell für die Regulierung von Stoffwechselfvorgängen. Doch bisher stellt eine Androgensubstitutionstherapie bei älteren Männern mit Testosteronmangel die einzige kausale Behandlungsoption dar. Diese verbessert nachweislich die körperliche Leistungsfähigkeit und verringert das Risiko einer Rehospitalisierung (Baillargeon et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Androgene die adipogene Differenzierung hemmen und somit zu einer Abnahme des viszeralen Fettgewebes führen, wobei die molekularen Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind (Behre et al. 2012). BMS-564929 bezeichnet einen experimentell hergestellten selektiven Androgenrezeptor-Modulator (SARM), der von Bristol-Myer-Squibb entwickelt wurde und als mögliche therapeutische Option in der Behandlung des Altershypogonadismus in Betracht gezogen werden kann.

### 5.1 BMS-564929

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte unterschiedlicher Konzentrationen des SARMs BMS-564929 auf die Zelltoxizität und die adipogene Differenzierung zu untersuchen. Untersuchungen zum Einfluss dieses SARMs standen bisher nur selten im Zentrum der Forschung. Wie einleitend berichtet, werden die ersten Entwicklungen im Jahre 1940 detektiert. Es folgen strukturelle Modifikationen, veränderte Potenzen und Bindungsfähigkeiten. Diese SARMs werden erstmals 1999 in der Literatur erwähnt (Negro-Vilar 1999). Die Arbeitsgruppe postuliert einen AR-Liganden mit hoher Spezifität für den AR, mit einer oralen Bioverfügbarkeit und idealerweise einer einmal täglichen Einnahme. Außerdem sollte er ein entsprechendes pharmakokinetisches Profil vorweisen sowie gewebsselektiv sein. In den letzten Jahren wurde immer wieder versucht, einen SARM zu finden, der physisch wünschenswerte Eigenschaften vermittelt, aber geringe Nebenwirkungen aufweist und zusätzlich noch anabole Effekte, wie zum Beispiel auf den Knochenstoffwechsel oder die Muskelmasse, ausübt (Narayanan et al. 2008).

Unsere Entscheidung den SARM BMS-564929 für experimentellen Untersuchungen zu verwenden, beruht auf einer Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass BMS-564929 dosisabhängig in *in vitro* Studien an kastrierten Ratten das Muskelwachstum erhöht, ohne signifikant das Prostatawachstum zu beeinflussen. Die Arbeit zeigt, dass BMS-564929 eine ED50 von 0,0009 mg/kg im Musculus levator ani und eine ED50 von 0,14 mg/kg in der Prostata aufweist und somit im Muskel 160-fach selektiver als in der Prostata ist, im Gegensatz zu Testosteron, welches mit einer ED50 von 0,21 mg/kg im Musculus levator ani und eine ED50 von 0,42 mg/kg in der Prostata nur eine 2-fach höhere Selektivität aufwies (Ostrowski et al. 2007). Somit konnte eine Gewebselektivität vermutet werden. Hinsichtlich dieser Eigenschaften rückte BMS-564929 in das Blickfeld unserer Forschung und sollte in Bezug auf das Verhalten während der adipogenen Differenzierung erstmals charakterisiert werden, um zukünftig eine große therapeutische Relevanz bei der Behandlung des Krankheitsbildes der altersbedingten Testosteron-Abnahme aufzuweisen, wobei gerade die Zunahme des viszeralen Fettgewebes mit erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten einhergeht und die Substitution von Androgenen die bisher einzige kausale Behandlungsmöglichkeit darstellt (Pye et al. 2014).

Bei dem SARM BMS-564929 handelt es sich um ein Hydantoinderivat, welches mit seiner CN-Gruppe und Hydroxylgruppe am Androgenrezeptor interagiert. Die CN-Gruppe befindet sich an gleicher Position wie die 3-Ketogruppe und die Hydroxylgruppe an der 17 $\beta$ -Hydroxylgruppe, sodass ähnliche Eigenschaften wie DHT postuliert werden konnten.

## 5.2 Toxizität von BMS-564929 und Einfluss auf die Proliferation

Experimentelle Arbeiten zum Einfluss von BMS-564929 auf die Proliferation von humanen SGBS-Prädipozyten standen bisher noch nicht im Zentrum der Forschung. Bei den verwendeten Zellkulturen handelt es sich um ein etabliertes Modellsystem für humane Prädipozyten und Adipozyten, wobei sich die Zellen funktionell und biochemisch wie humane, primäre Fettzellen verhalten. Der Differenzierungsprozess ist durch Standardprotokolle vorgeschrieben, sodass von einem geeigneten Zellkulturmodell ausgegangen werden konnte.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der verwendete SARM keinen toxischen Einfluss auf die verwendeten SGBS Zellen ausübt. In allen verwendeten Konzentrationen zeigte BMS-564929 keine Verminderung der Viabilität der Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Diese experimentelle Arbeit war essenziell für den weiteren Versuchsablauf, da eine mögliche Toxizität weitere experimentelle

Untersuchungen deutlich eingeschränkt, wenn nicht sogar ausgeschlossen hätte. Vergleichbare Untersuchungen sind in der Literatur nicht zu finden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BMS-564929 signifikant die adipogene Differenzierung, quantifiziert mit dem Oil Red O Test, in allen eingesetzten Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle hemmt. Eine Inhibition der Adipogenese konnte dosisabhängig detektiert werden. Zum aktuellen Zeitpunkt existieren keine vergleichbaren Daten in der Literatur. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von DHT [30 nM] auf die Lipidakkumulation mit dem Oil Red O Test bereits untersucht. Dort zeigte sich unter Zugabe von DHT ebenfalls eine signifikante, dosisabhängige Inhibition der adipogenen Differenzierung (Kraus et al. 2015), sodass zu diesem Zeitpunkt der Arbeit von DHT ähnlichen Effekten von BMS-565929 ausgegangen wurde und weitere experimentelle Untersuchungen auf den Einfluss der Adipogenese geplant wurden.

### **5.3 BMS-564929-abhängige Expression verschiedener Zielgene während der Adipogenese**

In einem weiteren Schritt wurde die Expression verschiedener Gene während der adipogenen Differenzierung unter Einfluss von DHT und BMS-564929 untersucht. BMS-564929 wirkt als selektiver Androgenrezeptor-Modulator, welcher wie Testosteron seine Wirkung über den Androgenrezeptor vermittelt. Deshalb wurde in einer ersten Untersuchung die Wirkung von BMS-564929 auf die Genexpression von AR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass schon humane SGBS-Prädipozyten AR exprimieren, die Expression während der 14-tägigen Differenzierung konstant bleibt und unter Zugabe von DHT und BMS-564929 signifikant zur Kontrolle ansteigt. Horenburg und Kollegen zeigten, ähnlich zu den Ergebnissen in dieser Arbeit, eine konstante mRNA-Expression des AR in humanen SGBS-Zellen (Horenburg et al. 2008). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass diese Zelllinie ein geeignetes *in vitro* Modell darstellt, um den Einfluss von BMS-564929 auf die Genexpression verschiedener Adipokine zu untersuchen. Auch andere Arbeiten zeigen, dass AR sowohl in Prädipozyten als auch in ausdifferenzierten Adipozyten exprimiert wird und das Ausmaß vom entsprechenden anatomischen Ursprung abhängig ist, wobei die Expression von Prädipozyten im viszeralen Fettgewebe höher als im subkutanen Fettgewebe ist (Dieudonne et al. 1998). Um die Wirkung von BMS-564929 auf den Androgenrezeptor zu bestätigen, könnte man in weiterfolgenden Untersuchungen den Androgenrezeptor vor Zugabe mit Androgenrezeptorblockern (beispielsweise Flutamid) behandeln. Weiterhin ist zu erwähnen, dass in dieser Arbeit der Wirkung von BMS-564929 nicht auf Proteinebene untersucht wurde. Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorangegangenen Untersuchungen

zeigen, dass humane SGBS-Zellen von Beginn der Differenzierung eine Proteinexpression von AR aufweisen und eine weites gehende konstante Expression während der Adipogenese zeigt. Weiterhin wurde dabei ein Teil der zur Adipogenese angeregten SGBS-Zellen mit 30 nM DHT behandelt. Darunter steigt die Expression von AR auf Proteinebene an. In weiteren Untersuchungen könnte dies auch unter Zugabe von BMS-564929 untersucht werden.

Den Hauptsyntheseort für Adiponektin stellen ausdifferenzierte Adipozyten dar. Aus früheren Untersuchungen weiß man, dass Präadipozyten kein Adiponektin exprimieren und die Expression während der Adipogenese zunimmt. Dies konnte auch in dieser Arbeit anhand der SGBS-Zellen gezeigt werden. Obwohl Adiponektin ausschließlich in reifen Adipozyten exprimiert wird, zeigen sich bei Adipositas verminderte Spiegel. Dies scheint darauf zurückzuführen, dass es vermehrt im subkutanen Fettgewebe vorkommt und nicht im viszeralen Fettgewebe und somit eine Verminderung mit der Entstehung adipositasassoziierter Erkrankungen assoziiert sein könnte (Maeda et al. 2002). In den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sowohl BMS-564929 als auch DHT die mRNA-Expression von Adiponektin im Verlauf der Adipogenese nicht beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen denen einer anderen, in der gezeigt werden konnte, dass sowohl Testosteron als auch DHT keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von Adiponektin an Tag 2 und Tag 5 ausüben (Horenburg et al. 2008). In dieser Arbeit zeigt sich ein Maximum der Expression an Tag 7. In der Literatur ist beschrieben, dass Frauen höhere Plasmakonzentrationen aufweisen als Männer, wobei zu vermuten ist, dass Androgene dazu entscheidend beitragen (Nishizawa et al. 2002). Genaue Mechanismen sind aktuell noch Gegenstand der Forschung und konnten bisher nicht abschließend identifiziert werden.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl DHT als auch BMS-564929 die mRNA-Expression von Insulin-like growth factor (IGF-1 oder Somatomedin C) herunterreguliert. Dabei handelt es sich um ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches eine hohe Sequenzhomologie zu Insulin zeigt und dadurch in der Lage ist, mit geringerer Affinität an den Insulinrezeptor zu binden. Es wird sowohl in der Leber als auch in Adipozyten synthetisiert (Peter et al. 1993). Sowohl in dieser Arbeit als auch in einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl SGBS-Präadipozyten als auch Adipozyten IGF-1 exprimieren und die Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung ansteigt (Fischer-Posovszky et al. 2004). Studien haben gezeigt, dass IGF-1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für das Wachstum der Präadipozyten als auch bei der weiteren Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt. Studien an Nagetieren

zeigen, dass im Fettgewebe lokal IGF-1 synthetisiert wird und dies dort physiologisch aktiv ist (Vikman et al. 1991). Interessanterweise scheint die mitogene Aktivität von IGF-1 und die Auswirkungen von Androgenen auf die Expression von IGF-1 stark vom untersuchten Gewebe abzuhängen. Es konnte gezeigt werden, dass in humanen Skelettmuskelzellen *in vitro* unter Zugabe von Testosteron die mRNA-Expression von IGF-1 ansteigt. Auch *in vivo* induziert Androgensubstitution eine Zunahme der Muskelmasse und der Proteinsynthese, wobei eine Interaktion von lokalem IGF-1 und AR postuliert wird (Sculthorpe et al. 2012). Hingegen konnten Dieudonne und Kollegen, ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, an einer Rattenzelllinie zeigen, dass durch Zugabe von DHT die mRNA-Expression von IGF-1 deutlich herunterreguliert wird (Dieudonne et al. 2000). Außerdem ist bekannt, dass durch Apoptose der Adipozyten ein wesentlicher Beitrag zur Regulierung der Fettgewebssmasse erreicht werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass sogenannte Todesrezeptoren, wie CD 95 oder TNF-Rezeptor 1, welche den programmierten Zelltod einleiten, in Fettzellen exprimiert werden und IGF-1 humane Präadipozyten und ausdifferenzierte Adipozyten vor ligandenaktivierter Induktion der Apoptose schützt (Fischer-Posovszky et al. 2004). Aufgrund der Ergebnisse könnte postuliert werden, dass durch die Herunterregulation der mRNA-Expression von IGF-1 ein Einfluss auf die apoptotischen Zellsignalkaskaden ausgeübt wird und es somit durch BMS-564929 zu Beeinflussung der Differenzierung der SGBS-Zellen kommt. Dies könnte einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten darstellen.

Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose sowie kardiovaskulären Erkrankungen (Berger et al. 2005). Es handelt sich um Transkriptionsfaktoren, die sowohl durch Fettsäuren oder Eicosanoide aktiviert werden. Der Subtyp PPAR $\gamma$  besteht aus den Isotypen PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2, wobei letzterer fast ausschließlich auf Präadipozyten und Adipozyten exprimiert wird und als Masterregulator der Adipogenese gut untersucht ist (Werman et al. 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ab Tag 1 der adipogenen Differenzierung die mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  signifikant zunimmt und im Verlauf der Adipogenese auf hohem Niveau aufrechterhalten wird. An Tag 14 konnte eine signifikante Expressionssteigerung auf das 8,8-Fache im Vergleich zu Tag 0 detektiert werden (DMSO-Kontrolle Tag 0: 100 %, Tag 14: 883 %). Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur. PPAR $\gamma$  wird als Marker für eine erfolgreiche adipogene Differenzierung angesehen, wobei nur durch eine gesteigerte Expression die Adipogenese erst induziert und dann aufrecht erhalten werden kann (Tamori et al. 2002) Die Arbeitsgruppe von Lahnalampi und Kollegen zeigte

ebenfalls eine kontinuierliche hohe Expression von PPAR $\gamma$  im Verlauf der adipogenen Differenzierung von SGBS-Zellen (Lahnalampi et al. 2010). Außerdem wurde der Einfluss von DHT und BMS-564929 auf die PPAR $\gamma$ -Expression untersucht, wobei sich in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied darstellte. Allerdings konnte ein hemmender Effekt von Androgenen, insbesondere von DHT, in einigen Arbeiten detektiert werden (Gupta et al. 2008). Sato und Kollegen konnten ebenfalls in Maus 3T3-L1 Präadipozyten einen hemmenden Effekt durch DHT im Verlauf der Adipogenese verzeichnen, wobei dieser Effekt nur in höheren DHT-Konzentrationen und am Ende der Differenzierung nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Ergebnisse stellen die verschiedenen Zellsysteme dar. Untersuchungen zu BMS-564929 auf die PPAR $\gamma$ -mRNA-Expression sind in der Literatur nicht zu finden.

Schon lange ist bekannt, dass das Adipokin Leptin, welches von Adipozyten sezerniert wird, eine entscheidende Rolle im Fettgewebismetabolismus spielt. Die Sekretion steht in engem Zusammenhang mit der Menge und Verteilung des Fettgewebes. In Studien stellte sich heraus, dass Leptinspiegel durch Steroidhormone reguliert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl unter Zugabe von DHT als auch von BMS-564929 die mRNA-Expression von Leptin während der adipogenen Differenzierung von humanen SGBS-Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrolle gehemmt wird. Es zeichnete sich ebenfalls eine stärkere Inhibition durch BMS-564929 als durch DHT ab, welche allerdings nicht signifikant war. Man weiß, dass während der Pubertät die Leptinspiegel bei Frauen ansteigen wohingegen sie bei Männern abfallen (Ahmed et al. 1999). Jenks und Kollegen zeigten ebenfalls, dass unter Zugabe von DHT die Expression von Leptin in 3T3-L1 Adipozyten signifikant gehemmt wurde (Jenks et al. 2017). Es ist bekannt, dass hohe Leptinspiegel mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 einhergehen (Kaczmarek et al. 2017) und dass die Testosteronsupplementation die Spiegel reduzieren und somit zu einer Reduktion der Fettmasse beitragen kann (Machinal-Quelin et al. 2002). In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Enobarsam, ein Ostarin, welche zu der Gruppe der SARMs gehört, sowohl die Leptin als auch die Adiponektin mRNA-Expression in Rattenadipozyten signifikant herunterreguliert (Leciejewska et al. 2019). SARMs, insbesondere BMS-564929, scheinen anhand der Ergebnisse eine vielversprechende Alternative zur Behandlung des Androgenmangels darzustellen.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die mRNA-Expression von Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  von humanen SGBS-Zellen unter Einfluss von BMS-564929 untersucht. Dies bezeichnet ein proinflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von Makrophagen

ausgeschüttet wird, aber auch von Fettgewebe sezerniert und als Schlüsselregulator der Fettgewebsmasse bezeichnet wird, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind (Coppack 2001). Die wichtigste Aktivität stellt die Regulation verschiedener Immunzellen dar, allerdings hat es ebenso Einfluss auf die Zelldifferenzierung, Apoptose, Proliferation und Ausschüttung anderer Zytokine. Es ist bekannt, dass mit zunehmender Fettmasse vermehrt TNF- $\alpha$  sezerniert wird (Cawthorn and Sethi 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression während der adipogenen Differenzierung von humanen SGBS-Zellen zunimmt und die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  unter Zugabe von DHT und BMS-564929 herunterreguliert wird. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Testosteron maßgeblich für die Regulation von Entzündungsprozessen verantwortlich ist. Diese Arbeit zeigt, dass die Zugabe von BMS-564929 einen inhibierenden Effekt auf die mRNA-Expression des inflammatorischen Adipozytokins TNF- $\alpha$  ausüben kann. Ein möglicher molekulargenetischer Mechanismus der Fettgewebsinflammation scheint über die Aktivierung von intrazellulären Stresskinasen, unter anderem durch NF- $\kappa$ B, ausgelöst zu werden, was wiederum zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 führt (Skurk et al. 2007). Es ist bekannt, dass auch bei der Entstehung der Atherosklerose der Inflammation eine bedeutende Rolle zugesprochen wird. Es könnte postuliert werden, dass BMS-564929 antiatherosklerotische Eigenschaften durch Reduktion der Inflammation zugesprochen werden können. Dazu könnte man sich in Anschlussarbeiten die mRNA-Expression von IL-6, eines weiteren inflammatorischen Adipozytokins unter Zugabe vom BMS-564929 ansehen. Inwieweit sich BMS-564929 auf die Inflammation des Fettgewebes auswirkt, könnte somit ein weiterer interessanter Forschungsschwerpunkt darstellen.

#### **5.4 BMS-564929 – ein Ausblick**

Es lässt sich sagen, dass der Einfluss von BMS-564929 auf die Adipozytenfunktion bisher selten untersucht und zum aktuellen Zeitpunkt auch wenig verstanden ist, wohingegen die Regulierung des Fettstoffwechsels durch Steroidhormone bekannt ist. Somit wurde in dieser Arbeit die Wirkung des synthetischen Androgenrezeptor-Agonisten BMS-564929 auf die Funktion von humanen SGBS-Zellen untersucht. Anhand der Literaturrecherche scheinen die präklinischen Daten potenzieller SARMs vielversprechend. Allerdings befinden sich die Wirksamkeitsstudien am Beginn. Weitere Forschungsarbeiten sind notwendig, um die molekularen Grundlagen der Gewebselektivität zu eruieren. Kontrovers ist zu diskutieren, dass in Phase I und Phase II Studien von SARMs der ersten Generation eine signifikante Reduktion von HDL-

Cholesterin und eine vorübergehende Erhöhung der Transaminasen (AST und ALT) bei der oralen Applikation gezeigt haben. Inwieweit alternative Applikationsformen, zum Beispiel transdermal oder intramuskulär hepatotoxisch sind wurde bisher nicht getestet. Die orale Verabreichung stellt einen wesentlichen Vorteil der SARMs gegenüber Testosteron dar. Bei transdermalen Testosteronapplikationen können schwere Hautirritationen auftreten und Injektionen können mit erheblichen Konzentrationsschwankungen verbunden sein, welche wiederum zu einem höheren Nebenwirkungspotenzial führen können, was vermieden werden soll. Ein weiteres Problem zeichnet sich im Zulassungsweg ab. Dieser ist für anabole Therapien nicht eindeutig festgelegt. Beispielsweise wurden die anfänglichen Bestrebungen der Firma GTx Inc.<sup>®</sup>, eine Zulassung für den SARM „Enobosarm“ zur Therapie der Sarkopenie zu erhalten, aufgegeben, obwohl sich ein gutes Nebenwirkungs- und Wirkungsprofil herauskristallisierte (Garber 2016). Hingegen konzentrieren sich gegenwärtige Studien eher auf den Einsatz bei onkologischen Patienten zur Behandlung von Tumorkachexie, wo die Langzeitfolgen bei der Zulassung nicht so von Bedeutung zu sein scheinen (Dalton 2017). Dies zeigt exemplarisch ein Beispiel für die Schwierigkeit der Etablierung von SARMs. Zum aktuellen Zeitpunkt der Forschung gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine mögliche Zulassung von BMS-564929 zur klinischen Anwendung. Dies zeigt, dass noch weitere experimentelle Arbeiten notwendig sind, um die molekularen Grundlagen und Mechanismen aufzudecken und mögliche Vor- und Nachteile von BMS-564929 aufzudecken. Mit dieser Arbeit konnte eine mögliche Grundlage für weitere Forschungsarbeiten geschaffen werden. In weiteren Untersuchungen könnte die mRNA-Expressionsprofile der miRNA 375 und ADIPOR2 unter Zugabe von BMS-564929 zu verschiedenen Zeitpunkten der adipogenen Differenzierung untersucht werden. Sowohl in der Literatur als auch in unserer eigenen Forschungsgruppe konnte die Suppression der miR-375 sowie eine erhöhte Expression des Adiponectin-Rezeptors-2 durch Androgene bereits nachgewiesen werden. Die verminderte Expression des Adiponectin-Rezeptors 2 im Fettgewebe steht im engen Zusammenhang mit einer sich entwickelnden Insulinresistenz. Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, lässt es vermuten, dass BMS-564929 vergleichbare Effekte auf die jeweiligen Expressionsprofile bewirken könnte.

## 6 Zusammenfassung

Der Late-onset Hypogonadismus bezeichnet ein Krankheitsbild des alternden Mannes, welches durch einen Testosteronmangel unterhalb des Referenzwertes gekennzeichnet ist und über eine Störung des Lipidstoffwechsels zu einer Zunahme des viszeralen Fettgewebes führt und damit das Risiko für Folgeerkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2 oder kardiovaskuläre Komplikationen, erhöht. Die Substitution von Testosteron stellt die Therapie der Wahl dar, ist aber mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von BMS-564929, einen selektiven Androgenrezeptor-Modulator, welcher oral verfügbar ist und mit hoher Affinität an den Androgenrezeptor bindet, auf die adipogene Differenzierung humaner SGBS-Prädipozyten untersucht werden. Im ersten Schritt wurde mittels MTT-Proliferationsassay festgestellt, dass der verwendete SARM keinen toxischen Einfluss auf die Zellen ausübt. Anschließend wurden mittels Oil Red O Färbung die Fettvakuolen nach 14-tägiger Differenzierung angefärbt, lichtmikroskopisch dargestellt und dann vermessen. Es zeigte sich, dass BMS-564929 in allen eingesetzten Konzentrationen die adipogene Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle hemmt. Mittels quantitativer Real-time PCR wurden Adipogenese relevante Gene unter Einfluss von BMS-564929 vermessen. Dabei zeigte sich, dass sowohl SGBS-Prädipozyten als auch reife Fettzellen Androgenrezeptor exprimieren und die Expression im Verlauf der Adipogenese unter Einfluss von BMS-564929 ansteigt. Die Expression von Adiponektin, PPAR $\gamma$  und IGF-1 stieg im Verlauf an, blieb aber unter Einfluss des SARMS unverändert. Auch die Expression von Leptin stieg im Verlauf der 14-tägigen Differenzierung an. Hier konnte allerdings eine Hemmung unter Einfluss von BMS-564929 detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ . Abschließend lässt sich sagen, dass der Einfluss von BMS-564929 auf die Adipozytenfunktion bisher selten untersucht und zum aktuellen Zeitpunkt wenig verstanden ist. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der verwendete SARM keinen toxischen Einfluss auf die SGBS-Zellen ausübt und ähnlich wie DHT deren adipogene Differenzierung hemmt und einen potenten Regulator des Fettgewebstoffwechsels darstellt. Generell stellen die SARMS, insbesondere BMS-564929, eine Gruppe von vielversprechenden Substanzen dar, die potenziell therapeutisch zur Behandlung des Androgenmangels eingesetzt werden könnten und mit einem geringen Nebenwirkungsprofil vergesellschaftet sind, wobei für die genauen molekularen Mechanismen noch weitergehende Untersuchungen notwendig sind.

## 7 Literaturverzeichnis

Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Leptin." Annu Rev Physiol **62**: 413-437.

Ahmed, M. L., K. K. Ong, D. J. Morrell, L. Cox, N. Drayer, L. Perry, M. A. Preece and D. B. Dunger (1999). "Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition." J Clin Endocrinol Metab **84**(3): 899-905.

Almer, G., M. Saba-Lepek, S. Haj-Yahya, E. Rohde, D. Strunk, E. Frohlich, R. Prassl and H. Mangge (2011). "Globular domain of adiponectin: promising target molecule for detection of atherosclerotic lesions." Biologics **5**: 95-105.

Andreasson, A. N., A. L. Unden, S. Elofsson and K. Brismar (2012). "Leptin and adiponectin: distribution and associations with cardiovascular risk factors in men and women of the general population." Am J Hum Biol **24**(5): 595-601.

Araki-Sasaki, K., Y. Ohashi, T. Sasabe, K. Hayashi, H. Watanabe, Y. Tano and H. Handa (1995). "An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(3): 614-621.

Baillargeon, J., R. R. Deer, Y. F. Kuo, D. Zhang, J. S. Goodwin and E. Volpi (2016). "Androgen Therapy and Rehospitalization in Older Men With Testosterone Deficiency." Mayo Clin Proc **91**(5): 587-595.

Basaria, S. (2014). "Male hypogonadism." Lancet **383**(9924): 1250-1263.

Behre, H. M., T. L. Tammela, S. Arver, J. R. Tolra, V. Bonifacio, M. Lamche, J. Kelly, F. Hiemeyer, T. European Testogel Study, E. J. Giltay and L. J. Gooren (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." Aging Male **15**(4): 198-207.

Berger, J. P., T. E. Akiyama and P. T. Meinke (2005). "PPARs: therapeutic targets for metabolic disease." Trends Pharmacol Sci **26**(5): 244-251.

Bhasin, S., M. Pencina, G. K. Jasuja, T. G. Travison, A. Coviello, E. Orwoll, P. Y. Wang, C. Nielson, F. Wu, A. Tajar, F. Labrie, H. Vesper, A. Zhang, J. Ulloor, R. Singh, R. D'Agostino and R. S. Vasani (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." J Clin Endocrinol Metab **96**(8): 2430-2439.

Birsoy, K., Z. Chen and J. Friedman (2008). "Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4." Cell Metab **7**(4): 339-347.

Bobbert, P., S. Antoniak, H. P. Schultheiss and U. Rauch (2008). "Globular adiponectin but not full-length adiponectin induces increased procoagulability in human endothelial cells." J Mol Cell Cardiol **44**(2): 388-394.

Cawthorn, W. P. and J. K. Sethi (2008). "TNF-alpha and adipocyte biology." FEBS Lett **582**(1): 117-131.

Chen, J., J. Kim and J. T. Dalton (2005). "Discovery and therapeutic promise of selective androgen receptor modulators." Mol Interv **5**(3): 173-188.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." Nat Protoc **1**(2): 581-585.

Christiansen, A. R., L. I. Lipshultz, J. M. Hotelling and A. W. Pastuszak (2020). "Selective androgen receptor modulators: the future of androgen therapy?" Transl Androl Urol **9**(Suppl 2): S135-S148.

Cinti, S. (2001). "The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues." Proc Nutr Soc **60**(3): 319-328.

Coppack, S. W. (2001). "Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue." Proc Nutr Soc **60**(3): 349-356.

Dalton, J. T. (2017). "The long and winding road for selective androgen receptor modulators." Br J Clin Pharmacol **83**(10): 2131-2133.

Dalton, J. T., K. G. Barnette, C. E. Bohl, M. L. Hancock, D. Rodriguez, S. T. Dodson, R. A. Morton and M. S. Steiner (2011). "The selective androgen receptor modulator GTX-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial." J Cachexia Sarcopenia Muscle **2**(3): 153-161.

---

DeBaun, M. R., J. Ess and S. Saunders (2001). "Simpson Golabi Behmel syndrome: progress toward understanding the molecular basis for overgrowth, malformation, and cancer predisposition." Mol Genet Metab **72**(4): 279-286.

Destatis, S. B. D. (2018). "Vgl. Ergebnisse der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des Statistischen Bundesamts Deutschland sowie Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung."

Dieudonne, M. N., R. Pecquery, A. Boumediene, M. C. Leneveu and Y. Giudicelli (1998). "Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids." Am J Physiol **274**(6): C1645-1652.

Dieudonne, M. N., R. Pecquery, M. C. Leneveu and Y. Giudicelli (2000). "Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2." Endocrinology **141**(2): 649-656.

Dunn, J. F., B. C. Nisula and D. Rodbard (1981). "Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma." J Clin Endocrinol Metab **53**(1): 58-68.

Ferris, W. F. and N. J. Crowther (2011). "Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue." Cardiovasc J Afr **22**(3): 147-154.

Fischer-Posovszky, P., F. S. Newell, M. Wabitsch and H. E. Tornqvist (2008). "Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology." Obes Facts **1**(4): 184-189.

Fischer-Posovszky, P., H. Tornqvist, K. M. Debatin and M. Wabitsch (2004). "Inhibition of death-receptor mediated apoptosis in human adipocytes by the insulin-like growth factor I (IGF-I)/IGF-I receptor autocrine circuit." Endocrinology **145**(4): 1849-1859.

Garber, K. (2016). "No longer going to waste." Nat Biotechnol **34**(5): 458-461.

Gregoire, F. M., C. M. Smas and H. S. Sul (1998). "Understanding adipocyte differentiation." Physiol Rev **78**(3): 783-809.

Gupta, V., S. Bhasin, W. Guo, R. Singh, R. Miki, P. Chauhan, K. Choong, T. Tchkonja, N. K. Lebrasseur, J. N. Flanagan, J. A. Hamilton, J. C. Viereck, N. S. Narula, J. L. Kirkland and R. Jasuja (2008). "Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes." Mol Cell Endocrinol **296**(1-2): 32-40.

Hauner, H., D. Much, C. Vollhardt, S. Brunner, D. Schmid, E. M. Sedlmeier, E. Heimberg, T. Schuster, A. Zimmermann, K. T. Schneider, B. L. Bader and U. Amann-Gassner (2012). "Effect of reducing the n-6:n-3 long-chain PUFA ratio during pregnancy and lactation on infant adipose tissue growth within the first year of life: an open-label randomized controlled trial." Am J Clin Nutr **95**(2): 383-394.

---

Holmegard, H. N., B. G. Nordestgaard, P. Schnohr, A. Tybjaerg-Hansen and M. Benn (2014). "Endogenous sex hormones and risk of venous thromboembolism in women and men." J Thromb Haemost **12**(3): 297-305.

Horenburg, S., P. Fischer-Posovszky, K. M. Debatin and M. Wabitsch (2008). "Influence of sex hormones on adiponectin expression in human adipocytes." Horm Metab Res **40**(11): 779-786.

Hudak, C. S., O. Gulyaeva, Y. Wang, S. M. Park, L. Lee, C. Kang and H. S. Sul (2014). "Pref-1 marks very early mesenchymal precursors required for adipose tissue development and expansion." Cell Rep **8**(3): 678-687.

Jenks, M. Z., H. E. Fairfield, E. C. Johnson, R. F. Morrison and G. K. Muday (2017). "Sex Steroid Hormones Regulate Leptin Transcript Accumulation and Protein Secretion in 3T3-L1 Cells." Sci Rep **7**(1): 8232.

Jenster, G., H. A. van der Korput, C. van Vroonhoven, T. H. van der Kwast, J. Trapman and A. O. Brinkmann (1991). "Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization." Mol Endocrinol **5**(10): 1396-1404.

Kaczmarek, P., M. Skrzypski, E. Pruszyńska-Oszmerek, M. Sassek, P. A. Kolodziejcki, M. Billert, D. Szczepankiewicz, T. Wojciechowicz, P. Maechler, K. W. Nowak and M. Z. Strowski (2017). "Chronic orexin-A (hypocretin-1) treatment of type 2 diabetic rats improves glucose control and beta-cell functions." J Physiol Pharmacol **68**(5): 669-681.

Kaufman, J. M. and A. Vermeulen (2005). "The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications." Endocr Rev **26**(6): 833-876.

Kliwer, S. A., B. M. Forman, B. Blumberg, E. S. Ong, U. Borgmeyer, D. J. Mangelsdorf, K. Umesonu and R. M. Evans (1994). "Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7355-7359.

Kraus, M., T. Greither, C. Wenzel, D. Brauer-Hartmann, M. Wabitsch and H. M. Behre (2015). "Inhibition of adipogenic differentiation of human SGBS preadipocytes by androgen-regulated microRNA miR-375." Mol Cell Endocrinol **414**: 177-185.

Krishnan, V., N. J. Patel, J. G. Mackrell, S. A. Sweetana, H. Bullock, Y. L. Ma, T. H. Waterhouse, B. C. Yaden, J. Henck, Q. Q. Zeng, K. Gavardinas, P. Jadhav, A. Saeed, P. Garcia-Losada, D. A. Robins and C. T. Benson (2018). "Development of a selective androgen receptor modulator for transdermal use in hypogonadal patients." Andrology **6**(3): 455-464.

Laaksonen, D. E., L. Niskanen, K. Punnonen, K. Nyysönen, T. P. Tuomainen, V. P. Valkonen, R. Salonen and J. T. Salonen (2004). "Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men." Diabetes Care **27**(5): 1036-1041.

---

Lahnalampi, M., M. Heinaniemi, L. Sinkkonen, M. Wabitsch and C. Carlberg (2010). "Time-resolved expression profiling of the nuclear receptor superfamily in human adipogenesis." PLoS One **5**(9): e12991.

Leciejska, N., E. Pruszynska-Oszmalek, J. Bien, L. Nogowski and P. A. Kolodziejcki (2019). "Effect of ostarine (enobosarm/GTX024), a selective androgen receptor modulator, on adipocyte metabolism in Wistar rats." J Physiol Pharmacol **70**(4).

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lu, Wardell, Burnstein, Defranco, Fuller, Giguere, Hochberg, McKay, Renoir, Weigel, Wilson, McDonnell and Cidlowski (2006). "International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 782-797.

Machinal-Quelin, F., M. N. Dieudonne, R. Pecquery, M. C. Leneuve and Y. Giudicelli (2002). "Direct in vitro effects of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue." Endocrine **18**(2): 179-184.

Maeda, N., I. Shimomura, K. Kishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, H. Nagaretani, N. Furuyama, H. Kondo, M. Takahashi, Y. Arita, R. Komuro, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Tochino, K. Okutomi, M. Horie, S. Takeda, T. Aoyama, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (2002). "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." Nat Med **8**(7): 731-737.

Matsuzawa, Y. (2010). "Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(2): 131-141.

Miller, C. P., M. Shomali, C. R. Lyttle, L. S. O'Dea, H. Herendeen, K. Gallacher, D. Paquin, D. R. Compton, B. Sahoo, S. A. Kerrigan, M. S. Burge, M. Nickels, J. L. Green, J. A. Katzenellenbogen, A. Tchesnokov and G. Hattersley (2011). "Design, Synthesis, and Preclinical Characterization of the Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) RAD140." ACS Med Chem Lett **2**(2): 124-129.

Moller, D. E. (2000). "Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." Trends Endocrinol Metab **11**(6): 212-217.

Mori, T., H. Sakaue, H. Iguchi, H. Gomi, Y. Okada, Y. Takashima, K. Nakamura, T. Nakamura, T. Yamauchi, N. Kubota, T. Kadowaki, Y. Matsuki, W. Ogawa, R. Hiramatsu and M. Kasuga (2005). "Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis." J Biol Chem **280**(13): 12867-12875.

Narayanan, R., M. L. Mohler, C. E. Bohl, D. D. Miller and J. T. Dalton (2008). "Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development." Nucl Recept Signal **6**: e010.

---

Negro-Vilar, A. (1999). "Selective androgen receptor modulators (SARMs): a novel approach to androgen therapy for the new millennium." J Clin Endocrinol Metab **84**(10): 3459-3462.

Nieschlag, B. (2012). Testosterone: Action, Deficiency, Substitution.

Nieschlag, E., R. Swerdloff, H. M. Behre, L. J. Gooren, J. M. Kaufman, J. J. Legros, B. Lunenfeld, J. E. Morley, C. Schulman, C. Wang, W. Weidner, F. C. Wu, A. International Society of, M. International Society for the Study of the Aging and U. European Association of (2005). "Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. ISA, ISSAM, and EAU recommendations." Eur Urol **48**(1): 1-4.

Nishizawa, H., I. Shimomura, K. Kishida, N. Maeda, H. Kuriyama, H. Nagaretani, M. Matsuda, H. Kondo, N. Furuyama, S. Kihara, T. Nakamura, Y. Tochino, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (2002). "Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein." Diabetes **51**(9): 2734-2741.

Ostrowski, J., J. E. Kuhns, J. A. Lupisella, M. C. Manfredi, B. C. Beehler, S. R. Krystek, Jr., Y. Bi, C. Sun, R. Seethala, R. Golla, P. G. Sleph, A. Fura, Y. An, K. F. Kish, J. S. Sack, K. A. Mookhtiar, G. J. Grover and L. G. Hamann (2007). "Pharmacological and x-ray structural characterization of a novel selective androgen receptor modulator: potent hyperanabolic stimulation of skeletal muscle with hypostimulation of prostate in rats." Endocrinology **148**(1): 4-12.

Pelletier, G. (2000). "Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues." Histol Histopathol **15**(4): 1261-1270.

Peter, M. A., K. H. Winterhalter, M. Boni-Schnetzler, E. R. Froesch and J. Zapf (1993). "Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue." Endocrinology **133**(6): 2624-2631.

Pye, S. R., I. T. Huhtaniemi, J. D. Finn, D. M. Lee, T. W. O'Neill, A. Tajar, G. Bartfai, S. Boonen, F. F. Casanueva, G. Forti, A. Giwercman, T. S. Han, K. Kula, M. E. Lean, N. Pendleton, M. Punab, M. K. Rutter, D. Vanderschueren, F. C. Wu and E. S. Group (2014). "Late-onset hypogonadism and mortality in aging men." J Clin Endocrinol Metab **99**(4): 1357-1366.

Rolf, C. and E. Nieschlag (1998). "Potential adverse effects of long-term testosterone therapy." Baillieres Clin Endocrinol Metab **12**(3): 521-534.

Rosen, E. D., C. H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez and B. M. Spiegelman (2002). "C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway." Genes Dev **16**(1): 22-26.

Ross, S. E., N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson and O. A. MacDougald (2000). "Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling." Science **289**(5481): 950-953.

---

Russell, D. W. and J. D. Wilson (1994). "Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes." Annu Rev Biochem **63**: 25-61.

Sculthorpe, N., A. M. Solomon, A. C. Sinanan, P. M. Bouloux, F. Grace and M. P. Lewis (2012). "Androgens affect myogenesis in vitro and increase local IGF-1 expression." Med Sci Sports Exerc **44**(4): 610-615.

Singh, R., J. N. Artaza, W. E. Taylor, N. F. Gonzalez-Cadavid and S. Bhasin (2003). "Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway." Endocrinology **144**(11): 5081-5088.

Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder and H. Hauner (2007). "Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 1023-1033.

Speakman, J. R. (2004). "Obesity: the integrated roles of environment and genetics." J Nutr **134**(8 Suppl): 2090S-2105S.

Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima and M. A. Lazar (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." Nature **409**(6818): 307-312.

Tamori, Y., J. Masugi, N. Nishino and M. Kasuga (2002). "Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes." Diabetes **51**(7): 2045-2055.

Tenorio, J., P. Arias, V. Martinez-Glez, F. Santos, S. Garcia-Minaur, J. Nevado and P. Lapunzina (2014). "Simpson-Golabi-Behmel syndrome types I and II." Orphanet J Rare Dis **9**: 138.

Vikman, K., J. Isgaard and S. Eden (1991). "Growth hormone regulation of insulin-like growth factor-I mRNA in rat adipose tissue and isolated rat adipocytes." J Endocrinol **131**(1): 139-145.

von Haehling, S. (2017). Pharmakologische Therapie der Kachexie. Kachexie bei Tumorerkrankungen, Springer: 114-132.

Wabitsch, M., R. E. Brenner, I. Melzner, M. Braun, P. Moller, E. Heinze, K. M. Debatin and H. Hauner (2001). "Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation." Int J Obes Relat Metab Disord **25**(1): 8-15.

Wabitsch, M. and P. Fischer-Posovszky (2008). "Grundlagen der Fettgewebeforschung und Adipozytokine." Gynäkologische Endokrinologie **6**(1): 6-13.

Wauman, J. and J. Tavernier (2011). "Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 2771-2793.

---

Werman, A., A. Hollenberg, G. Solanes, C. Bjorbaek, A. J. Vidal-Puig and J. S. Flier (1997). "Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin." J Biol Chem **272**(32): 20230-20235.

Wirth, A. H., Hans (2013). Adipositas, Springer, Berlin, Heidelberg.

Yang, Q. T., K. S. Wu, Z. J. Li, W. C. Li, L. Lu, H. Q. Wu, Y. Y. Zhuang and X. X. Sui (2018). "Risk factors for late-onset hypogonadism." Andrologia **50**(6): e13016.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.

Zilbermint, M. F. and A. S. Dobs (2009). "Nonsteroidal selective androgen receptor modulator Ostarine in cancer cachexia." Future Oncol **5**(8): 1211-1220.

Zitzmann, M. (2009). "Testosterone deficiency, insulin resistance and the metabolic syndrome." Nat Rev Endocrinol **5**(12): 673-681.

---

## 8 Thesen

1. Der Altershypogonadismus bezeichnet eine Erkrankung des älteren Mannes mit Symptomen des Testosteronmangels sowie potenziell schädliche Auswirkungen auf diverse Organsysteme und einer Testosteronkonzentration unterhalb des Referenzbereiches.
2. Humane SGBS-Zellen besitzen eine über Generationen stabile Differenzierungsfähigkeit und stellen ein anerkanntes *in vitro* System zur Untersuchung von Eigenschaften humaner Adipozyten dar.
3. Der selektive Androgenrezeptor-Modulator BMS-564929, oral verfügbar und mit starker Affinität zum Androgenrezeptor, hat in den eingesetzten Konzentrationen (50 pM, 100 pM, 250 pM, 500 pM, 5 nM, 10 nM, 25nM, 50 nM) keinen Einfluss auf die Viabilität von humanen SGBS-Zellen und hemmt in allen eingesetzten Konzentrationen signifikant die adipogene Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle.
4. Humane SGBS-Präadipozyten und differenzierte, reife Fettzellen exprimieren Androgenrezeptor, wobei durch die Zugabe sowohl von BMS-564929 als auch von DHT die Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung signifikant ansteigt.
5. Adiponektin, IGF-1 und PPAR $\gamma$  werden im Verlauf der adipogenen Differenzierung von humanen SGBS-Zellen vermehrt exprimiert. Es konnte hingegen keine vermehrte Expression dieser Gene bei Zugabe von BMS-564929 unter adipogenen Differenzierungsbedingungen beobachtet werden.
6. Die Expression von Leptin steigt im Verlauf der Adipogenese humaner SGBS-Zellen signifikant an. Nicht nur DHT, sondern auch BMS-564929 hemmt die Expression von Leptin, wobei zwischen beiden kein signifikanter Unterschied verzeichnet wird.
7. TNF- $\alpha$  wird im Verlauf der Adipogenese humaner SGBS-Zellen verstärkt exprimiert. Sowohl DHT als auch BMS-564929 hemmen die Expression im Verlauf der adipogenen Differenzierung, wobei an Tag 10 BMS-564929 die Expression stärker hemmt als DHT.
8. BMS-564929 scheint durch eine Hemmung der Differenzierung des Fettgewebes eine ähnlich vorteilhafte Wirkung wie DHT zu haben.

---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 17.10.2021

Stefanie Trau

---

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Diese Arbeit habe ich im Rahmen meines ersten Dissertationsversuches geschrieben. Ich habe diese Arbeit ausschließlich an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg als Dissertationsschrift eingereicht.

Halle/Saale, den 17.10.2021

Stefanie Trau

---

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Behre für die Idee und auch für die Mittel, dass ich meine Arbeit im Universitätsklinikum Halle im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie durchführen konnte, bedanken.

Außerdem möchte ich Dr. Greither danken, dass ich so herzlich in seine Forschungsgruppe aufgenommen wurde und mir dort die Möglichkeiten geboten wurden diese Arbeit umzusetzen.

Weiterhin danke ich ihm im besonderen Maße für die sehr gute und motivierende Betreuung, die vielfältige Hilfe bei den großen und kleinen Laborproblemen.

Ein weiter Dank gilt den Doktoranden und Doktoren der anderen Forschungsabteilungen, die mir alle Laborgeräte zur Verfügung gestellt haben.

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

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten und mich immer wieder motiviert und in jeglicher Beziehung unterstützt haben.