

**Adipositas:**  
***In vivo* Expressionsstudien über den**  
**Adipositas Faktor *DOR***  
**und**  
**Studien zur Translationskontrolle in**  
**der frühen Adipogenese**

**Dissertation**

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
„**Doctor rerum naturalium**“  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Carolin Fromm-Dornieden**  
aus Göttingen

Göttingen 2012

Mitglieder des Betreuungsausschusses:

Referent: Prof. Dr. Burkhard Morgenstern

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig

Anleiter: Dr. Bernhard G. Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2012

***für Andre***

## I. Abstract

In this thesis, mechanisms for the onset of obesity were investigated. Expression studies were performed to analyse the obesity related factor *DOR* in an animal model and a possible effect of translational control in early adipogenesis was proofed in a cell model.

Differences in *DOR* expression were measured in diverse types of adipose and muscle tissue by qPCR. To test short term influences on *DOR* expression by nutritional factors, mice were fed different fat rich diets with 18% or 80% fat content for one week. Afterwards, *DOR* expression was compared to normal fed animals. Additionally, changes in *DOR* expression was investigated in genetically obese mice compared to control animals. For this, tissues derived from young (45 days old) and adult (100 days old) animals.

Changes in *DOR* expression of mice fed a fat rich diet were influenced by the dietary fat content, the type of investigated tissue and sex of the animals. For genetically obese mice there was also a significant influence of sex on *DOR* expression observed. But no significant differences in *DOR* expression were detected between young and older mice. *DOR* might be part of a defence mechanism against fat storage in high fat diets or obesity.

In the second part of this work changes in translational levels were investigated in early adipogenesis, 6 hours after hormonal induction, in 3T3-L1 cells. mRNAs attached to ribosomes (polysomal mRNAs) were separated from unbound mRNAs by velocity sedimentation. Pools of polysomal and unbound mRNA fractions were analyzed by microarray analysis.

After six hours of adipogenesis, 43 up-regulated and 2 down-regulated genes were identified in 3T3-L1 cells. Up-regulated genes comprised factors that act on the regulation of cell cycle, transcription or translation. The translation initiation factor *eIF4B* and various ribosomal proteins belong to the up-regulated factors. These enable modifications in translation rate via alteration of translational activity.

We conclude that a moderate reorganisation of the functionality of the ribosomal machinery and translational activity are very important steps for growth and gene expression control in the initial phase of adipogenesis.

## II. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Grundlagen zur Entstehung einer Adipositas erforscht. Dies erfolgte über Expressionsstudien des Adipositasfaktors *DOR* im Tiermodell sowie durch eine Studie zur Translationskontrolle in der frühen Adipogenese im Zellmodell.

Im ersten Teil der Arbeit wurden *in vivo* Expressionsstudien des Adipositas Faktors *DOR* mittels q-PCR durchgeführt. Dafür wurden Fett- und Muskelgewebe von fettreich gefütterten Tieren oder genetisch dicken Mäusen sowie entsprechender Kontrolltiere verwendet. Um einen Einfluss von fettreicher Nahrung auf die *DOR*-Expression zu untersuchen wurden die Tiere für eine Woche mit einer Diät gefüttert, welche einen Fettanteil von 18% oder 80% enthielt. Bei den Mäusen mit einer genetisch bedingten Adipositas wurde die *DOR*-Expression in zwei verschiedenen Altersstufen, 45 und 100 Tage nach der Geburt, gemessen. Veränderungen in der *DOR*-Expression zwischen fettreich gefütterten Mäusen und Kontrolltieren wurden durch die Höhe des Fettgehaltes der Diät, den untersuchten Gewebetyp, sowie das Geschlecht der Tiere beeinflusst. Bei den Mäusen mit genetisch bedingter Adipositas wurde ebenfalls ein Einfluss des Geschlechtes der untersuchten Tiere auf die *DOR* Expression beobachtet. Zwischen den zwei untersuchten Altersgruppen konnten keine Unterschiede in der Expression von *DOR* festgestellt werden. Möglicherweise ist *DOR* Teil eines Schutzmechanismus gegen eine vermehrte Einlagerung von Körperfett bei fettreichen Diäten.

Für den zweiten Teil der Arbeit wurden Veränderungen in der Translationsrate in 3T3-L1 Zellen in der frühen Adipogenese, 6 Stunden nach hormoneller Induktion, bestimmt. mRNAs, die nicht mit Ribosomen besetzt sind (freie RNAs) werden nicht translatiert und haben eine geringere Dichte als mRNAs, welche mit Ribosomen besetzt sind (polysomale mRNAs) und folglich translatiert werden. Die Auftrennung der mRNAs aus 3T3-L1 Zell-Lysat erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation. Durch eine anschließende Microarray-Analyse wurde die Identifikation polysomaler mRNAs ermöglicht. Es wurden 43 Gene identifiziert, deren Translationsrate in der frühen Adipogenese heraufreguliert wurde, während sie bei zwei Genen herabreguliert war. Diese alternativ regulierten mRNAs sind involviert in die Kontrolle von Zellzyklus, Transkription und Translation. Zu den heraufregulierten Faktoren gehören der Translations-Initiationsfaktor *eIF4B* und eine große Anzahl an ribosomalen Proteinen. Diese ermöglichen eine Modifikation der Translationsrate durch eine Veränderung der Translationsaktivität. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass eine moderate Änderung der Translationsrate dieser Faktoren die Effizienz und Selektivität der Proteinbiosynthese in der frühen Adipogenese reguliert und eine neue Ebene der Regulation darstellt.

### III. Manuskripte und Kongressbeiträge

#### *Manuskripte*

Fromm-Dornieden, C., Lytovchenko, O., von der Heyde, S., Behnke, N., Hogl, S., Berghoff, J., Köpper, F., Opitz, L., Renne, U., Hoeflich, A., Beissbarth, T., Brenig, B., Baumgartner, B. G. (2012): **Extrinsic and intrinsic regulation of DOR/TP53INP2 expression in mice: effects of dietary fat content, tissue type and sex in adipose and muscle tissues** (eingereicht bei Nutrition & Metabolism)

CF-D war beteiligt an der RNA-Isolation, der statistischen Auswertung und schrieb das Manuskript. OL führte die RNA-Isolation und qPCR Analysen in weißem und braunem Fettgewebe durch und schrieb Teile des Manuskriptes. SvdH und LO führten die statistische Auswertung unter der Leitung von TB durch. NB führte die RNA-Isolation und qPCR Analysen im Muskelgewebe durch. SH, JB und FK waren an den Expressions Analysen an Fett- und Muskelgewebe beteiligt. UR züchtete die Versuchstiere und isolierte das Muskel- und Fettgewebe. AH, BB und TB waren an der Entwicklung des Projektes sowie an der Überarbeitung des Manuskriptes beteiligt. BB finanzierte die Arbeit. BGB entwickelte das Projekt, leitete die praktischen Arbeiten an, koordinierte das Projekt und überarbeitete das Manuskript.

Fromm-Dornieden, C., von der Heyde, S., Lytovchenko, O., Salinas-Riester, G., Brenig, B., Beissbarth, T., Baumgartner, B. G. (2012): **Novel polysome messages and changes in translational activity appear after induction of adipogenesis in 3T3-L1 cells** *BMC Molecular Biology* 2012, **13**:9

CF-D führte den Großteil der Experimente durch wie Zellkultur, RNA-Isolation, Erstellung der Gradienten, qPCR sowie Western Blots und schrieb das Manuskript. SvdH führte die statistischen Analysen unter der Leitung von TB durch. OL bearbeitete Zellkulturen und etablierte die Gradientenzentrifugation. GS entwickelte die Spike-In Strategie, die in diesem Projekt verwendet wurde. BB war beteiligt an der Entwicklung des Projektes und finanzierte die Arbeit. TB war beteiligt and der Planung der MA und Spike-Ins und entwickelte die Strategie zur Analyse der MA Daten. BGB entwickelte das Projekt, leitete die praktischen Arbeiten an, koordinierte das Projekt und überarbeitete das Manuskript.

## **Kongressbeiträge**

Fromm-Dornieden, C., von der Heyde, S., Opitz, L., Beißbarth, T., Salinas-Riester, G., Brenig, B., Baumgartner, B.G. **Ribosome Profiling: eine einfache und effiziente Methode zur Messung der *de novo* Protein Synthese am Beispiel der Adipogenese.** (C20) Vortragstagung der DGfZ und GfT, Kiel, 15.-16.09.2010

Fromm-Dornieden, C., von der Heyde, S., Opitz, L., Beißbarth, T., Salinas-Riester, G., Brenig, B., Baumgartner, B.G. **Steuerung der frühen Adipogenese durch Translationskontrolle.** (A23) Vortragstagung der DGfZ und GfT, Freising-Weihenstephan, 06.-07.09.2011

Fromm-Dornieden, C., Lytovchenko, O., Salinas-Riester, G., von der Heyde, S., Beißbarth, T., Brenig, B., Baumgartner, B.G. **Changes in translational activity in early adipogenesis.** (Poster) 8<sup>th</sup> Horizons in Molecular Biology International PhD Student Symposium, Göttingen, 14.-17.09.2011

## IV. Abkürzungsverzeichnis

-/-	homozygoter Träger eines defekten Allels eines Gens
°C	Grad Celsius
4EBP	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) Binding Protein
ad libitum	zu freier Verfügung
AHCY	S-Adenosylhomocysteine Hydrolase
AKT	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1, Protein Kinase B
ATP	Adenosin Triphosphat
BAG3	BCL2-Associated Athanogene 3
BAT	braunes Fettgewebe (Brown Adipose Tissue)
C/EBP $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$	CAAT/Enhancer Binding Protein alpha, beta, delta
cAMP	cyclic AMP
CDKN1c	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C (P57)
c-MYC	Cellular Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CREB	cAMP-Response Element (CRE)- Binding Protein
dDOR	DOR homolog in <i>Drosophila</i>
Dio1/2	Iodothyronine Deiodinase Type 1/2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (standardisiertes Nährmedium)
DOR	Diabetes and Obesity Regulated; Synonyme: TP53INP2 und CG11347
DU6/DU6i	Mauslinien selektiert auf hohes Körpergewicht über 70 Generationen
DUKs/DUKsi	Kontrolllinien zu DU6/DU6i
E	Effizienz der Amplifikation
EcR	Ecdyson Rezeptor
eIF4B/E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B/E
et al.	et alii (und andere)
FD	Fat Diet (fettreiche Diät mit 18% Fettanteil)
FOXO	Forkhead Box O
g	Erdbeschleunigung
GA	genetisch bedingte Adipositas
GAT	Gonadenfett (Gonadal Adipose Tissue)
GATA 2/3	GATA Binding Protein 2/3
GHRL	Ghrelin
GTP	Guanosin Triphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
HFD	High Fat Diet (hoch fettreiche Diät mit 80% Fettanteil)
HM	Herzmuskel (Heart Muscle)
HSF1	Heat Shock Factor 1



HSP90ab1	Heat Shock Protein 90 alpha (cytosolic), Class B Member 1
HSPA8	Heat Shock Protein 8
HZF	Haematopoietic Zinc-Finger
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IFIT1	Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 1
IL-6/8	Interleukin-6/8
IMPDH2	Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type 2
IR	Insulin Rezeptor
IRF6	Interferon Regulatory Factor 6
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
JAK 2	Janus Kinase 2
kDa	Kilodalton
KLF4	Krüppel-Like Factor 4
L	Lebergewebe
LEF	Lymphoid-Enhancer Factor
log	Logarithmus, logarithmisch
LPO	Lactoperoxidase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR C1 Komplex
n	Anzahl der Versuchstiere
ND	Normal Diet
ng	Nanogramm
NMNAT2	Nicotinamide Nucleotide Adenylyltransferase 2
NMRI	Name eines Inzucht-Mäusestammes
np0/6	nicht polysomale Fraktion zum Zeitpunkt 0/6
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.n.	post natum (nach der Geburt)
p0/6	polysomale Fraktion zum Zeitpunkt 0/6
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDK 1	Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLEKHN1	Pleckstrin Homology Domain Containing, Family N Member 1
PLOD3	Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 3
POLR2a	Polymerase (RNA) II (DNA directed) Polypeptide A
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma

PVDF	Polyvinylidenfluorid (opaker, teilkristalliner, thermoplastischer Fluorkunststoff)
RP	ribosomales Protein
RPL	ribosomales Protein der großen (large) Untereinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPS	ribosomales Protein der kleinen (small) Untereinheit
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskonstante)
S6K1/2	Ribosome S6 Kinase 1/2
SAT	Subkutanfett (Subcutaneous Adipose Tissue)
SCYE1	Small Inducible Cytokine Subfamily E, Member 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEMA3g	Sema Domain, Immunoglobulin Domain (Ig), Short Basic Domain, Secreted, (semaphorin) 3G
SLC25a5/30	Solute Carrier Family 25, Member 5/30
SM	Skelettmuskel (Skeletal Muscle)
SMAD 3	Tumour-Suppressor Protein 3
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SREBP1	Sterol Regulatory Element Binding Protein 1
STAT 3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
T°an	Annealing Temperatur
T0	Zeitpunkt der Probenentnahme kurz vor der hormonellen Induktion
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
T6	Zeitpunkt der Probenentnahme sechs Stunden nach der hormonellen Induktion
TBC1d22a	TBC1Domain Family, Member 22a
TCF	T Cell-Specific Transcription Factor
TH	Thyroid Hormon
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TP53INP2	Tumor Protein p53 Inducible Nuclear Protein 2
TRα1/2	Thyroid Hormon Rezeptor alpha 1/2
TRβ	Thyroid Hormon Rezeptor beta
TSC 1/2	Tuberous Sclerosis Complex 1/2
TSC22d3	TSC22 Domain Family, Member 3
UCP1	Uncoupling Protein 1
VAT	Visceralfett (Visceral Adipose Tissue)
WAT	weißes Fettgewebe (White Adipose Tissue)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
♂/♀	männlich/weiblich

## Inhalt

<b>I.</b>	<b>Abstract</b>	
<b>II.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	
<b>III.</b>	<b>Manuskripte und Kongressbeiträge</b>	
<b>IV.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Adipositas</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition und Ursachen der Adipositas	1
1.1.2	Risiken und Verbreitung der Adipositas	1
<b>1.2</b>	<b>Fett- und Muskelgewebe im Zusammenhang mit der Adipositas</b>	<b>2</b>
1.2.1	Fettgewebe	2
1.2.1.1	<i>Braunes Fettgewebe</i>	2
1.2.1.2	<i>Weißes Fettgewebe</i>	3
1.2.2	Muskelgewebe	4
1.2.3	Interaktion von Fett- und Muskelgewebe in Zusammenhang mit der Adipositas	5
1.2.4	Thyroid Hormon und Adipositas	6
1.2.5	Der Adipositasfaktor „DOR“	7
<b>1.3</b>	<b>Adipogenese im Zell-Modell</b>	<b>10</b>
1.3.1	Adipogenese in 3T3-L1 Zellen als Modell	10
1.3.2	Die Bedeutung der Transkriptionskontrolle in der Adipogenese	11
1.3.3	Die Bedeutung der Translationskontrolle in der Adipogenese	12
1.3.3.1	<i>Translationskontrolle über den PI3K Signalweg</i>	13
1.3.3.2	<i>Translationskontrolle über die Ribosomenbiogenese</i>	13
1.3.4	Erforschung der Translationskontrolle über Saccharosegradienten und Microarray-Analyse	15
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Literatur</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>Manuskript „DOR“</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Abstract</b>	<b>24</b>
2.1.1	Background	24
2.1.2	Methods	24
2.1.3	Results	24
2.1.4	Conclusions	24
<b>2.2</b>	<b>Background</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Methods</b>	<b>27</b>
2.3.1	Ethics Statement	27
2.3.2	Animals and tissues	27
2.3.3	RNA isolation and reverse transcription	29
2.3.4	Quantitative real-time PCR (qPCR)	30
2.3.5	Statistical analysis	30
<b>2.4</b>	<b>Results</b>	<b>31</b>
2.4.1	<i>DOR expression in different tissue types</i>	31
2.4.2	<i>DOR expression in models of obesity</i>	32
2.4.2.1	<i>DOR expression in FD/HFD mice</i>	32
2.4.2.2	<i>DOR expression in DU6/DU6i and DUKs/DUKsi mice</i>	35
<b>2.5</b>	<b>Discussion</b>	<b>36</b>
2.5.1	Influence of dietary fat content on <i>DOR</i> expression	37
2.5.2	Influence of tissue type on <i>DOR</i> expression	37

2.5.3	Influence of sex on <i>DOR</i> expression	38
<b>2.6</b>	<b>Conclusions</b>	<b>39</b>
<b>2.7</b>	<b>Authors' contributions</b>	<b>39</b>
<b>2.8</b>	<b>References</b>	<b>40</b>
<b>2.9</b>	<b>Additional files</b>	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b>Manuskript „Translationskontrolle“</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Abstract</b>	<b>48</b>
3.1.1	Background	48
3.1.2	Results	48
3.1.3	Conclusions	48
<b>3.2</b>	<b>Background</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Results</b>	<b>50</b>
3.3.1	Adipogenesis	50
3.3.2	Velocity sedimentation and polysome analysis	51
3.3.3	Microarray analysis	52
3.3.4	Quantitative Real Time-PCR (q-PCR)	53
3.3.5	Western Blotting	53
3.3.6	Cluster analysis	54
<b>3.4</b>	<b>Discussion</b>	<b>55</b>
<b>3.5</b>	<b>Conclusions</b>	<b>60</b>
<b>3.6</b>	<b>Methods</b>	<b>61</b>
3.6.1	Cells	61
3.6.2	Velocity sedimentation and polysome analysis	61
3.6.3	Statistics	62
3.6.4	Quantitative Real Time-PCR (q-PCR)	62
3.6.5	Western Blotting	63
<b>3.7</b>	<b>Authors' contributions</b>	<b>64</b>
<b>3.8</b>	<b>Acknowledgements</b>	<b>64</b>
<b>3.9</b>	<b>References</b>	<b>64</b>
<b>3.10</b>	<b>Additional Files</b>	<b>68</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Einflüsse auf Expressionsänderungen des Adipositas Faktors „DOR“</b>	<b>76</b>
4.1.1	Auswirkungen einer fettreichen Diät auf die <i>DOR</i> -Expression	77
4.1.2	Auswirkungen einer genetisch bedingten Adipositas auf die <i>DOR</i> -Expression	78
4.1.3	Effekte von Gewebeart und Geschlecht auf die <i>DOR</i> -Expression	79
4.1.4	Mögliche Funktionen von <i>DOR</i> im Fett- und Muskelgewebe	80
<b>4.2</b>	<b>Die Bedeutung der Translationskontrolle in der frühen Adipogenese</b>	<b>81</b>
4.2.1	Funktion der heraufregulierten Gene in der Adipogenese	82
4.2.2	Funktion der herabregulierten Gene in der Adipogenese	83
<b>4.3</b>	<b>Verknüpfung von Translationskontrolle und <i>DOR</i></b>	<b>85</b>
<b>4.4</b>	<b>Fazit</b>	<b>87</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>87</b>
<b>4.6</b>	<b>Literatur</b>	<b>88</b>
<b>5.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 *Adipositas*

### 1.1.1 Definition und Ursachen der Adipositas

Die Adipositas (Fettsucht) wird definiert als eine abnorme Zunahme des Fettgewebes im Körper. Diese entsteht durch einen Überschuss an aufgenommener Nahrungsenergie, welche in Form von Triglyceriden gespeichert wird<sup>1,2</sup>.

Ursächlich für die Entwicklung einer Adipositas ist ein Ungleichgewicht zwischen der Energieaufnahme und dem Energieverbrauch. Dies wird hervorgerufen durch eine gesteigerte Aufnahme von Nahrung mit einer hohen Energiedichte, die reich an Fett, Salz und Zucker ist, aber wenig Vitamine, Mineralstoffe und andere Mikronährstoffe beinhaltet. Zusätzlich reduziert eine verringerte körperliche Aktivität, zum Beispiel durch sitzende Tätigkeiten und motorisierte Transportmittel, den Energieverbrauch<sup>3</sup>.

Des Weiteren beeinflussen intrinsische Faktoren, wie die Ausprägung des Hunger- und Sättigungsgefühls sowie der energetische Grundumsatz, die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch. Als einflussreiche extrinsische Faktoren sind unter anderem das Angebot von Nahrung und die Möglichkeiten zur körperlichen Aktivität zu nennen<sup>2</sup>.

Die Ausprägung von Adipositas ist zu 30-70% genetisch bedingt, wobei deren Entstehung multifaktorielle Ursachen aufweist<sup>4,5</sup>. Ein wichtiger Faktor, der einen Einfluss auf die genetische Ausprägung von Populationen hat, ist die Menge an verfügbarer Nahrung. In Zeiten von Hungersnöten haben Individuen mit der genetischen Prädisposition für eine gesteigerte Einlagerung von Körperfett einen Überlebensvorteil. Dieser Vorteil führt allerdings bei einem Nahrungsüberfluss, wie er in den heutigen Industrienationen zu finden ist, zu einem vermehrten Auftreten der Adipositas<sup>6</sup>.

Auch epigenetische Prozesse, wie posttranslationale Acetylierung der Histone sowie Unterschiede in der Methylierung von DNA Sequenzen, beeinflussen die Genexpression. Treten diese epigenetisch bedingten Veränderungen in wichtigen Organen des Energiestoffwechsels auf, welche die Glukose-Homöostase und die Insulin-Sensibilität regulieren, ermöglichen sie die Entstehung einer Adipositas<sup>7</sup>.

### 1.1.2 Risiken und Verbreitung der Adipositas

Die Adipositas ist der Hauptrisikofaktor für eine Reihe von schweren Erkrankungen wie Bluthochdruck, Schlafapnoe, Arthritis, koronare Herzerkrankungen, verminderte Glukosetoleranz, Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 und Fettstoffwechselstörungen<sup>8,9</sup>.

Die Prävalenz für die Adipositas hat in den letzten Jahren zugenommen. So waren bereits 2008 weltweit etwa 1,5 Milliarden Erwachsene (über 20 Jahre) übergewichtig. Von diesen

waren 200 Millionen Männer und fast 300 Millionen Frauen adipös. Im Jahr 2010 waren nahezu 43 Millionen Kinder unter fünf Jahren übergewichtig<sup>3</sup>.

Alle Stoffwechselwege, die zur verstärkten Einlagerung von Triglyceriden in die Fettzellen und zur übermäßigen Expansion des Fettgewebes führen, müssen zuerst entschlüsselt werden, um eine Adipositas wirksam behandeln zu können.

Hierfür ist die Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen bei der Entstehung der Adipogenese unerlässlich. Dies erfolgt zum einen über die genaue Kenntnis der Regulation einzelner Adipositasfaktoren, wie zum Beispiel des *DOR*-Gens (Diabetes and Obesity Regulated). Zum anderen ist ein allgemeines Verständnis der Transkriptions- und Translationskontrolle in der Adipogenese wichtig.

Ebenfalls ist es notwendig weitere Organsysteme, wie das Muskelgewebe, die in den Energiestoffwechsel involviert sind, in diese Untersuchungen mit einzubeziehen.

## **1.2 Fett- und Muskelgewebe im Zusammenhang mit der Adipositas**

### **1.2.1 Fettgewebe**

Das Körperfett der Säugetiere wird in braunes und weißes Fettgewebe unterteilt. Der Aufbau und die Funktion der Adipozyten dieser Fettgewebe sind sehr unterschiedlich und werden in den folgenden Abschnitten kurz dargestellt.

#### **1.2.1.1 Braunes Fettgewebe**

Die Adipozyten des braunen Fettgewebes sind plurivakuolär, das bedeutet sie enthalten viele kleine Vakuolen mit Triglyceriden. Zudem besitzen sie eine Vielzahl an Mitochondrien, welche ursächlich für die braune Färbung der Zellen sind (Abbildung 1.1)<sup>10</sup>. Das braune Fettgewebe ist spezifisch für Säugetiere, wobei ein größerer Anteil bei Neugeborenen vorhanden ist<sup>11</sup>. Neuere Studien (zusammengefasst in<sup>12,13</sup>) beschrieben, dass nahezu alle jungen Erwachsenen aktives braunes Fettgewebe besitzen, dieses aber mit zunehmendem Alter reduziert wird. Im Vergleich zu weißem Fettgewebe ist der Anteil an braunem Fettgewebe im Körper sehr viel geringer<sup>10</sup>.

Die Stoffwechselaktivität des braunen Fettgewebes ist umgekehrt proportional zu dem prozentualen Anteil am gesamten Körperfett und seine Hauptaufgabe besteht in der Thermogenese<sup>13,14</sup>. Die Funktion der Mitochondrien wird im braunen Fettgewebe durch die Expression des Gens *UCP1* (Uncoupling Protein 1) reguliert. Das UCP1 Protein entkoppelt die Oxidation von Fettsäuren von der ATP (Adenosin Triphosphat) Synthese, wodurch Wärme generiert wird. Die Adipositas und weitere Faktoren wie die

Umgebungstemperatur, die Ernährung, Leptin und Kortikosteroide beeinflussen die Funktion des UCP1<sup>14</sup>.

Nedergaard und Cannon (2010) beschrieben einen schützenden Effekt des braunen Fettgewebes gegen die Adipositas<sup>12</sup>. Die Fähigkeit der braunen Adipozyten zur Thermogenese kann der ernährungsinduzierten Adipositas vorbeugen<sup>10</sup>.

Eine Untersuchung des braunen Fettgewebes in Bezug zu Adipositas assoziierten Genen ermöglicht neue Einblicke in die Regulation des Körpergewichtes<sup>12</sup>.

### **1.2.1.2 Weißes Fettgewebe**

Bei den weißen Adipozyten handelt es sich um große, univakuoläre, mit Triglyceriden gefüllte Zellen (Abbildung 1.1).

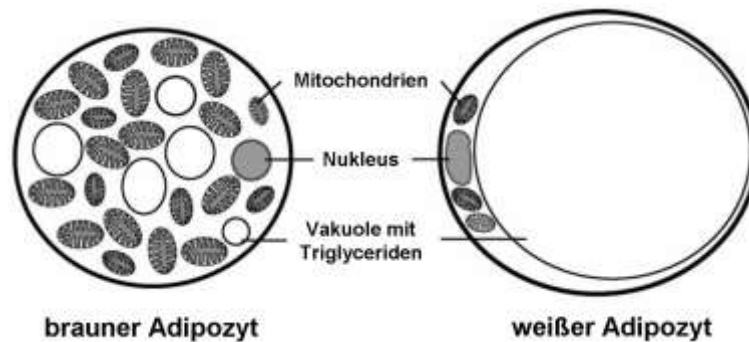
Das weiße Fettgewebe reguliert den Energiehaushalt, indem es freie Fettsäuren speichert und bei einem Energiemangelzustand wieder dem Stoffwechsel zuführt. Es dient ebenfalls der Wärmeisolation des Körpers sowie als druckelastisches Polster der inneren Organe und der Gelenke<sup>15</sup>. Des Weiteren ist das weiße Fettgewebe ein wichtiges endokrines Organ, welches unterschiedliche Zytokine (Adipokine, siehe unten) freisetzt, die den Energiestoffwechsel regulieren<sup>9</sup>.

In Bezug auf die jeweilige Positionierung im Körper, wird das weiße Fettgewebe unterteilt in Viszeralfett, Subkutanfett und Gonadenfett. Im Gegensatz zum Subkutanfett ist das Viszeralfett direkt an das Pfortadersystem angeschlossen<sup>15</sup>. Eine Adipositas des androiden Typs, die durch übermäßige Mengen an Visceralfett gekennzeichnet ist, wird mit einem erhöhten Risiko für eine Insulinresistenz und andere kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert<sup>11</sup>.

Das weiße Fettgewebe besteht, zusätzlich zu den Adipozyten, aus Präadipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Nervenzellen<sup>15</sup>. Das Vorhandensein von Präadipozyten ist unerlässlich für die Expansion des Fettgewebes, wenn die bereits vorhandenen weißen Adipozyten ein kritisches Maß an Ausdehnung (Hypertrophie) erreicht haben. Aus den Präadipozyten reifen Adipozyten, welche zusätzlich vorhandene Triglyceride einlagern können (Hyperplasie)<sup>1</sup>.

Das Vorhandensein von großen Adipozyten definiert einen pathologischen Phänotyp des Fettgewebes. Die Ursache liegt in einer erhöhten Konzentration von Lipiden im Serum. Die Blutfette werden umgehend in den Adipozyten eingelagert und dies führt zu einer vermehrten Adipogenese. Im Fettgewebe mit sehr großen Adipozyten ist die Angiogenese gestört. Dies führt zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff in diesen Gewebsabschnitten. Dadurch werden wiederum entzündliche und apoptotische Prozesse stimuliert, welche die Insulinresistenz des Gewebes erhöhen und Veränderungen im Expressionsprofil von Adipokinen zur Folge haben<sup>16</sup>.

Bei einer Adipositas sind proinflammatorische Adipokine wie Leptin, TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha), IL-6 (Interleukin-6) sowie IL-8 erhöht exprimiert und tragen zur Entstehung von Adipositas bedingten pathophysiologischen Fehlfunktionen bei. Dagegen sind die Serumspiegel des Adiponektins bei adipösen Personen gesenkt, und die antiinflammatorische Wirkung des Adiponektins ist limitiert (zusammengefasst in<sup>9,17</sup>).



**Abbildung 1.1:** Schematischer Aufbau der unterschiedlichen Fettzelltypen (verändert nach<sup>14</sup>). Die Fettzellen des braunen Fettgewebes (links) enthalten viele Mitochondrien und mehrere kleine Lipidvakuolen. Die Adipozyten des weißen Fettgewebes (rechts) bestehen hauptsächlich aus einer großen, mit Triglyceriden gefüllten Vakuole und besitzen nur vereinzelte Mitochondrien.

### 1.2.2 Muskelgewebe

Neben dem Fettgewebe spielt die Skelettmuskulatur, mit einem Anteil von 35-50% an der Gesamtmasse des Körpers, eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel. Es ist das bedeutendste Gewebe für den Verbrauch von Glukose und Fettsäuren im Körper<sup>18,19</sup>.

Das Muskelgewebe wird unter morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten in die glatte und die quer gestreifte Muskulatur gegliedert, wobei letztere nochmals in die Skelett- und die Herzmuskulatur unterteilt wird. Die glatte Muskulatur wird vom vegetativen Nervensystem gesteuert, ihre Kontraktion erfolgt langsam, unwillkürlich und ausdauernd. Sie dient der Aufrechterhaltung eines Muskeltonus wobei nur sehr wenig Energie aufgebracht werden muss, wie es in Gefäßwänden oder dem Gastrointestinaltrakt erforderlich ist<sup>20</sup>.

Die Muskelzellen des Herzens werden ebenfalls vom vegetativen Nervensystem gesteuert, sind aber quergestreift und reich an Mitochondrien. Der Ursprung der Querstreifung liegt in der speziellen Anordnung von Aktin- und Myosinfilamenten, welche gemeinsam die Myofibrillen bilden. Bei einer Kontraktion des Muskels schieben sich die Aktin- und Myosinfilamente teleskopartig ineinander<sup>20</sup>.

Die ebenfalls quer gestreiften Fasern des Skelettmuskels werden anhand von Morphologie und Stoffwechsel in zwei Typen unterteilt. Der langsame Typ (Typ I-Fasern) besteht aus Fasern mit geringer Kontraktionsgeschwindigkeit, vielen Mitochondrien und Enzymen des oxidativen Energiestoffwechsels. Diese Muskelfasern ermöglichen eine ausdauernde Bewegung mit einer geringen Kraftentwicklung. Dagegen ist die



Kontraktionsgeschwindigkeit der Fasern des schnellen Typs (Typ II-Fasern) erhöht und dem glykolytischen Stoffwechsel zugeordnet, so dass diese Fasern eine hohe, aber nur kurz andauernde, Kraftentwicklung ermöglichen<sup>21</sup>. Der beschriebene Aufbau des Skelettmuskels ist zum größten Teil genetisch bedingt<sup>18</sup>.

### **1.2.3 Interaktion von Fett- und Muskelgewebe in Zusammenhang mit der Adipositas**

In einem gesunden Stoffwechsel besteht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Muskel- und Fettmasse im Körper. Das Wachstum beider Gewebe wird durch Zytokine aus Fett- und Muskelzellen reziprok reguliert<sup>22</sup>.

Der Skelettmuskel ist, ausgehend von der Masse, das größte Gewebe, welches für >80% des Insulin-stimulierten Verbrauchs von Glukose verantwortlich ist<sup>23,24</sup>. Stark erhöhte Fettmengen resultieren in schweren Störungen des Stoffwechsels wie zum Beispiel der Insulinresistenz im Skelettmuskel<sup>25</sup>.

Die Entwicklung des fetalen Skelettmuskels ist von essentieller Bedeutung, da nach der Geburt die Anzahl der Muskelfasern nicht mehr zunimmt. Die Skelettmuskelzellen entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen, die sich auch in Fettzellen differenzieren können. So kann eine Adipositas in der Schwangerschaft zu einer Entzündungsreaktion in den fetalen Geweben führen. Dadurch wird die Entwicklung der Skelettmuskelzellen aus mesenchymalen Stammzellen zugunsten der Ausbildung von Adipozyten vermindert<sup>19,23</sup>.

Die vom weißen Fettgewebe gebildeten Adipokine Leptin und Adiponektin haben einen akuten und einen chronischen Effekt auf den Stoffwechsel des Muskels. Sie fördern die Oxidation der Fettsäuren und verringern die Einlagerung von Fetten. Dies führt zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität. Dyck *et al.* (2006) postulierten die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung des Skelettmuskels gegenüber diesen Adipokinen während der Entstehung einer Adipositas<sup>23</sup>.

Neben den Adipozyten sezernieren auch Skelettmuskelzellen Zytokine. Diese werden als Myokine bezeichnet und spielen in der Kommunikation zwischen Muskel- und Fettgewebe eine wichtige Rolle. Sell *et al.* (2006) beschrieben einen möglichen Einfluss der Myokine auf das Verhältnis von Muskel- zu Fettmasse sowie auf die Insulinsensitivität. Zum Beispiel ist die Konzentration von IL-6 im Skelettmuskel während und nach der Bewegung stark erhöht. IL-6 weist einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität des Muskels auf und scheint eine Rolle in der Bereitstellung von Energie während der Muskelbewegung zu spielen, da es im Fettgewebe die Lipolyse aktiviert<sup>25</sup>. In einer aktuellen Studie zeigten Boström *et al.* (2012) die Funktionen von Irisin, einem neu entdeckten Myokin, welches durch Muskelbewegung induziert wird. Bereits ein gering erhöhter Irisinspiegel im Blut ist

ursächlich für einen gesteigerten Energieverbrauch und einen Schutz vor der, Adipositas induzierten, Insulinresistenz<sup>26</sup>.

#### 1.2.4 Thyroid Hormon und Adipositas

Der Energiestoffwechsel des Fett- und Muskelgewebes unterliegt einer komplexen Regulation, an der das Schilddrüsenhormon (Thyroid Hormon, TH) beteiligt ist<sup>27,28</sup>.

In verschiedenen Stoffwechselprozessen weist TH eine Vielzahl von Funktionen auf, unter anderem ist es ein wichtiger physiologischer Regulator des Energiehaushaltes im ganzen Körper<sup>29</sup>.

So induziert TH die Biogenese der Mitochondrien durch die Regulation der mitochondrialen Genexpression, wobei gewebespezifische oxidative Phosphorylierungen gefördert werden<sup>30</sup>.

Im Fettgewebe reguliert TH viele verschiedene Aspekte des Fettstoffwechsels, wie zum Beispiel Lipogenese, Lipolyse und die Thermogenese (zusammengefasst in<sup>31</sup>).

Dabei reguliert TH die Expression von Adiponektin auf der translationalen Ebene<sup>32</sup>.

In der Schilddrüse wird zunächst die inaktive Form des TH, T<sub>4</sub> (Thyroxin), gebildet. T<sub>4</sub> wird durch die Enzyme Dio<sub>1</sub> (Iodothyronine Deiodinase Type 1) und 2 in die aktive Form des TH, T<sub>3</sub> (Triiodthyronin), konvertiert<sup>33</sup>. T<sub>3</sub> hat einen direkten Effekt auf die Transkription und die Stabilisierung der *UCP1* mRNA in braunen Adipozyten (zusammengefasst in<sup>13</sup>).

Im Muskel ist T<sub>3</sub> in den Übergang der neonatalen in die adulte Isoform des Myosins involviert. Außerdem kann es die metabolischen und kontraktilen Eigenschaften der adulten Muskelfasern beeinflussen (zusammengefasst in<sup>34</sup>).

Die biologischen Funktionen von T<sub>3</sub> werden durch die Schilddrüsenhormon-Rezeptoren (TRs), TR $\alpha$  und TR $\beta$ , transkriptional reguliert<sup>35</sup>. TR $\alpha$  regelt die Thermogenese im braunen Fettgewebe<sup>36</sup> und die Zusammensetzung der Fasertypen im Skelettmuskel<sup>37</sup>, während TR $\beta$  den Beginn des Cholesterinstoffwechsels einleitet<sup>27</sup>. TR $\alpha$ 1 ist die vorherrschende Isoform in weißem und braunem Fettgewebe<sup>27</sup> sowie im Skelettmuskel<sup>37</sup>.

Mishra *et al.* (2010) zeigten, dass bei der Differenzierung von murinen Präadipozyten zu adulten Adipozyten ein Ausschalten von TR $\alpha$ 1 die Adipogenese stört. Dies geschieht über die Inhibition der Expression von *PPAR $\gamma$*  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma) und *C/EBP $\alpha$*  (CAAT/Enhancer Binding Protein alpha)<sup>38</sup>.

TR Knockout-Mäuse [TR $\alpha$ 1(-/-)TR $\beta$ (-/-)], weisen eine herabgesetzte Körpertemperatur und einen reduzierten Grundumsatz auf<sup>39</sup>. Zudem wurde bei diesen Mäusen ein vermindertes Wachstum, eine verzögerte Entwicklung des Skeletts einhergehend mit einer erhöhten Menge an Körperfett beobachtet<sup>40</sup>. In diesem Zusammenhang beschrieben Kindblom *et al.* (2005) einen Anstieg in der Expression von Adipozyten spezifischen Genen. Mutationen

im Gen *TR $\alpha$*  führen bei männlichen Mäusen zu visceraler Adipositas, einem hohen Leptinspiegel und einer Vervierfachung des Körperfettes. Des Weiteren resultieren diese Mutationen in erhöhten Grundspiegeln von Glukose und Insulin, sowie einer verminderten Lipolyse<sup>41</sup>.

TH agiert auch auf einer nicht genomischen Ebene, indem es zum Beispiel im Zytoplasma den PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) Signalweg über die TRs aktiviert<sup>35,42</sup>. In dieser Arbeit wird allerdings vorrangig der genomische Aspekt von TH behandelt.

### 1.2.5 Der Adipositasfaktor „DOR“

Fang *et al.* (2011) beschrieben einen wichtigen Einfluss von Kofaktoren auf TRs im Zusammenhang mit Adipositas<sup>43</sup>.

Ein Koaktivator von *TR $\alpha$ 1* ist DOR (Diabetes and Obesity Regulated), es bindet *TR $\alpha$ 1* und erhöht dessen Transkriptionsaktivität. Das Protein DOR befindet sich im Nukleus und interagiert mit verschiedenen nuklearen Hormon Rezeptoren wie PPAR $\gamma$  und dem Glukokortikoid Rezeptor<sup>28</sup>. Es gibt bereits mehrere Studien zu den unterschiedlichen Funktionen von DOR, die in diesem Kapitel und in Abbildung 1.2 dargestellt werden.

Im humanen Skelettmuskel ist bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 das Gen *DOR* herab reguliert, woraus sich dessen Name ableitet<sup>28</sup>. In der Literatur sind die Synonyme TP53INP2 (Tumor Protein p53 Inducible Nuclear Protein 2) für das murine DOR<sup>44–46</sup> und CG11347 für das *Drosophila* DOR homolog<sup>47,48</sup> zu finden.

*DOR* wurde von Bennetts *et al.* (2007) als ein Gen dargestellt, das in die Entwicklung von Nervenzellen involviert ist<sup>46</sup>. Das humane *DOR* ist auf Chromosom 20 im Bereich 20q11.22 lokalisiert. Dieser Genlocus ist mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert<sup>28</sup>.

Francis *et al.* (2010) zeigten, dass das DOR homolog in *Drosophila* (dDOR) als Koaktivator des EcR (Ecdyson Rezeptor) agiert, welcher in der Metamorphose benötigt wird. Hierbei bindet dDOR an EcR und ermöglicht dessen maximale Transkriptionsaktivität. In Abwesenheit von dDOR weisen viele Tiere Phänotypen auf, die den Funktionsverlust von Ecdyson darstellen, wie Ausstülpungen der Tracheen, Degradierung der Speicheldrüsen und das Absterben im Puppenstadium. Außerdem war bei Fliegen, in denen das *DOR*-Gen ausgeschaltet war, der Anteil an Körperfett reduziert. Die *dDOR* Expression wird durch den Insulinsignalweg über FOXO (Forkhead Box O) inhibiert<sup>49</sup>.

DOR reguliert die Ausbildung des Autophagosoms und die Degradierung von Proteinen, sowohl in Zellen der *Drosophila* als auch in Säugerzellen. Bei der Aktivierung der Autophagie und bei Zellstress ändert das Protein DOR seine Lokalisation vom Nukleus

zum Zytoplasma und in die Autophagosomen. Dadurch wird die Bildung dieser Zell-Organellen gefördert und die Protein-Degradation in Säugerzellen reguliert<sup>47,48,50</sup>.

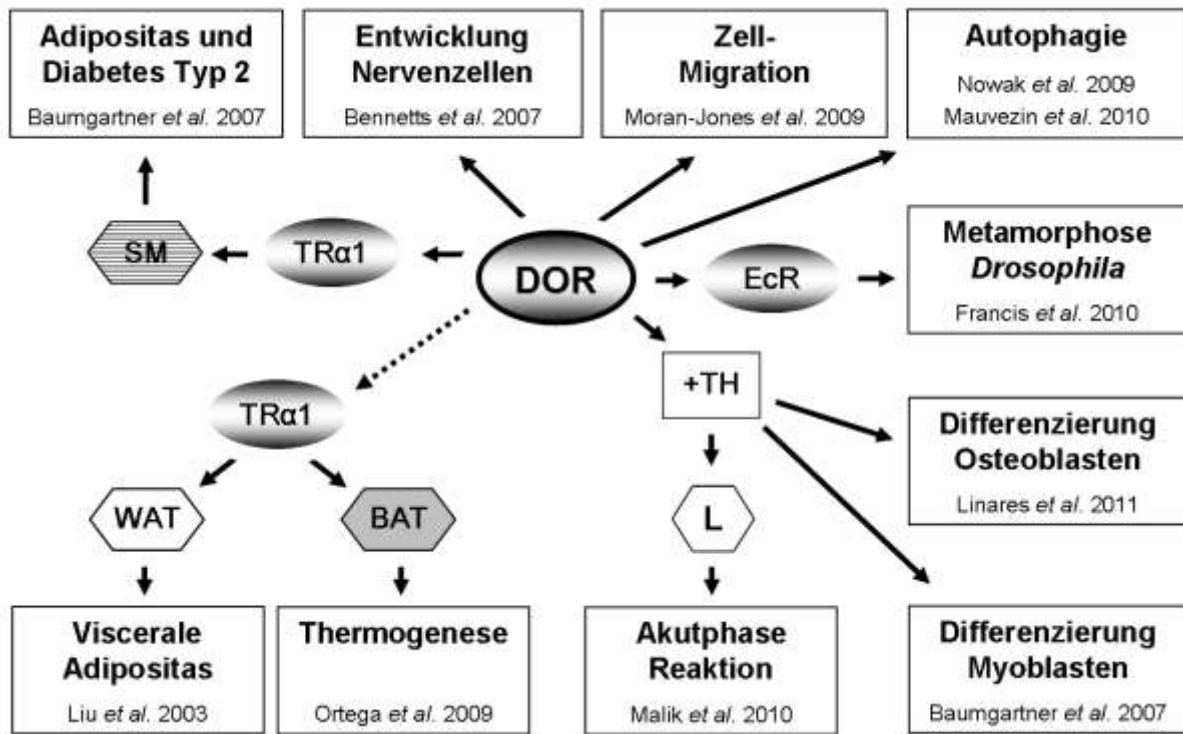
In Leberzellen von Ratten ist *DOR* stark exprimiert und wird unter der Akut-Phase-Reaktion herabreguliert. Malik *et al.* (2010) vermuten, dass dies auf verringerte Serumspiegel von TH und die Aktivität von Akut-Phase-Mediatoren zurückzuführen ist<sup>44</sup>.

*DOR* spielt zusätzlich eine wichtige Rolle in der TH gesteuerten Differenzierung von Osteoblasten. Hierbei agiert *DOR* als ein stimulierender Mediator von TH Effekten. Die Expression von *DOR* ist während der Differenzierung von Osteoblasten hoch reguliert<sup>45</sup>. Eine erhöhte *DOR*-Expression konnte ebenfalls während der Differenzierung von Myoblasten festgestellt werden<sup>28</sup>. Außerdem ist in der Promotorregion des humanen *DOR* der SNP (Single Nucleotide Polymorphism) *DOR 1* lokalisiert, welcher bei Männern mit der Osteokalzin Plasmakonzentration assoziiert ist<sup>45</sup>.

Das Ausschalten des Gens *DOR* in Myoblasten mit Hilfe von siRNA führt zu Veränderungen in der Differenzierung dieser Zellen und einer Modifizierung der Expressionshöhe von TH kontrollierten Genen<sup>28</sup>.

Obwohl *DOR* in vorangegangenen Publikationen bereits mit Adipositas assoziiert wurde, gibt es bisher keine Studien über den alleinigen Einfluss einer genetisch bedingten Adipositas auf die *DOR*-Expression. Ebenfalls gibt es noch keine Arbeiten dazu, wie sich eine veränderte Nährstoffzufuhr auf die Expression von *DOR* auswirkt.

Eine Änderung der Expression von *DOR* in metabolisch aktiven Geweben, sollte den Bezug auf eine Beteiligung an der Entstehung einer Adipositas ermöglichen.



**Abbildung 1.2:** Übersicht der bisher beschriebenen und vermuteten (unterbrochener Pfeil) Funktionen von DOR/TP53INP2/CG11347 in der Literatur<sup>28,44-53</sup>. Die Studien von Baumgartner *et al.* 2007<sup>28</sup>, Malik *et al.* 2010<sup>44</sup> und Linares *et al.* 2011<sup>45</sup> wurden unter Zugabe von TH durchgeführt. Abkürzungen: SM, Skelettmuskel; TRα1, Thyroid Hormone Receptor alpha 1; EcR, Ecdysone Receptor; TH, Thyroid Hormon; WAT, weißes Fettgewebe; BAT, braunes Fettgewebe; L, Lebergewebe.

### 1.3 Adipogenese im Zell-Modell

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben ist für die Expansion des Fettgewebes die Reifung von Präadipozyten zu adulten Adipozyten unerlässlich<sup>1</sup>.

Während des Zellzyklus, bei Stressreaktionen und der Embryogenese ist, neben der Regulation der Transkription, die Steuerung der Translation von zentraler Bedeutung<sup>54,55</sup>.

Für die Untersuchung von Adipozyten bedarf es eines repräsentativen Zellmodells.

#### 1.3.1 Adipogenese in 3T3-L1 Zellen als Modell

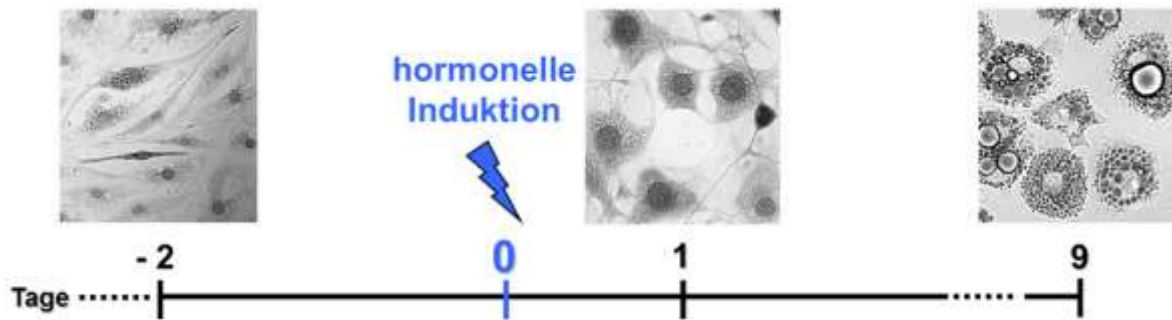
Die murine 3T3-L1 Linie<sup>56</sup> ist eine etablierte Zelllinie in der Adipositasforschung. Die Präadipozyten wurden aus Embryonen der Maus gewonnen und anschließend aufgrund ihrer Fähigkeit, zytoplasmatische Triglyceride einzulagern, selektiert. Erfolgreiche *in vivo* Re-Implantationsstudien machen sie zu einem etablierten Modell der Präadipozyten Differenzierung<sup>38,57-59</sup>.

Undifferenzierte 3T3-L1 Zellen weisen die Morphologie von Fibroblasten auf. Die Adipogenese wird durch Kontaktinhibition und die Zugabe von Hormonen induziert. Zu den verwendeten Hormonen zählen Insulin, das Glukokortikoid Dexamethason und IBMX (Isobotylmethylxanthin), eine Substanz welche den intrazellulären cAMP (cyclic AMP) Spiegel erhöht (zusammengefasst in<sup>60</sup>).

Nach der hormonellen Induktion treten die Präadipozyten erneut in den Zellzyklus ein und durchlaufen etwa zwei Zellteilungen<sup>61</sup>. In dieser frühen Phase der Adipogenese, ab vier Stunden nach der hormonellen Induktion, werden spezifische Transkriptionsfaktoren exprimiert, welche die Einleitung der terminalen Adipogenese ermöglichen<sup>57,61</sup>.

In der terminalen Phase der Differenzierung werden die spezifischen Gene für die Adipogenese wie *C/EBP $\alpha$*  und *PPAR $\gamma$*  exprimiert (zusammengefasst in<sup>62</sup>). Drei Tage nach der hormonellen Induktion werden kleine eingelagerte Triglyceridtropfen sichtbar, welche in den darauf folgenden Tagen an Größe zunehmen<sup>60</sup>.

Bereits zu Beginn der Adipogenese verändert sich der Phänotyp der 3T3-L1 Zellen. Die zunächst Fibroblasten-ähnliche Morphologie der Präadipozyten entwickelt sich bereits einen Tag nach der hormonellen Induktion in eine rundliche Zellform<sup>63</sup> (Abbildung 1.3). Da dies eine Anpassung des Proteoms erfordert<sup>64</sup>, ist eine zeitgleiche Veränderung der Translationsrate beteiligter Gene zu erwarten.



**Abbildung 1.3:** Zeitlicher Verlauf der Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen 3T3-L1 Präadipozyten (Tag -2) zu runden Adipozyten mit Lipidtropfen (Tag 9) durch hormonelle Induktion. 3T3-L1 Zellen von Tag -2 und Tag 1 der Adipogenese wurden mit *Coomassie blue*, die Zellen von Tag 9 mit *Oil Red O* gefärbt (40fache Vergrößerung).

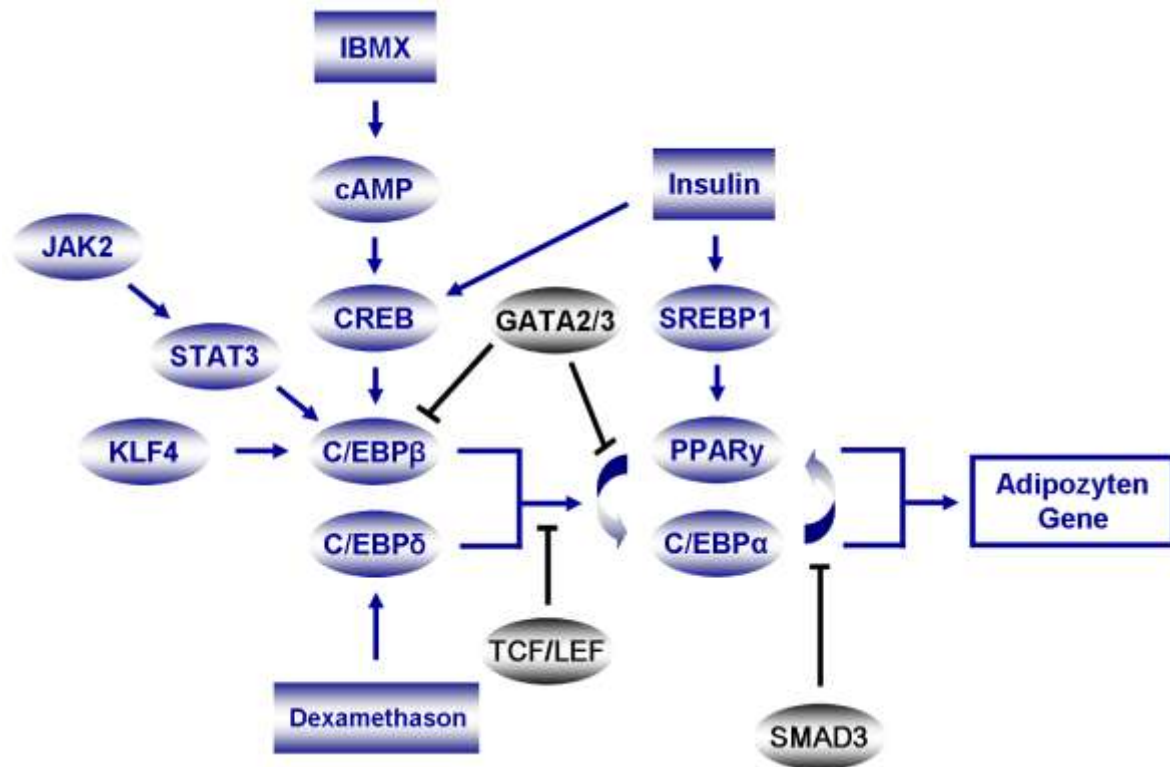
### 1.3.2 Die Bedeutung der Transkriptionskontrolle in der Adipogenese

Nach der hormonellen Induktion wird die Adipogenese von einem Komplex aus mehreren Transkriptionsfaktoren reguliert. Zunächst wird der intrazelluläre cAMP Spiegel durch IBMX erhöht (Abbildung 1.4). Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des CREB (cAMP-Response Element (CRE)-Binding Protein)<sup>64</sup>. CREB ist ein direkter Aktivator des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  (CAAT/Enhancer Binding Protein beta) in der frühen Adipogenese. Die Transkription von C/EBP $\beta$  wird zusätzlich von der JAK2- (Janus Kinase 2)/STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) Kaskade sowie von KLF4 (Krüppel-Like Factor 4) induziert (zusammengefasst in<sup>65</sup>). Durch Dexamethason wird der Transkriptionsfaktor C/EBP $\delta$  aktiviert (zusammengefasst in<sup>64,61</sup>).

C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  wiederum induzieren die Transkription der Hauptfaktoren der terminalen Adipogenese, C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$ . Durch eine positive Rückkopplung verstärken diese gegenseitig ihre Expression. Die gesteigerte Expression von C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$  führt schließlich zur Aktivierung der Transkription von Adipozyten spezifischen Genen. Obwohl die alleinige Präsenz von PPAR $\gamma$  für die Induktion der Expression vieler Adipogenese Gene ausreicht, ist C/EBP $\alpha$  notwendig um die Insulin Sensitivität der Adipozyten herzustellen (zusammengefasst in<sup>65,66</sup>).

Insulin induziert unter anderem den Faktor SREBP1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1) der PPAR $\gamma$  und andere relevante Gene der Adipogenese aktiviert<sup>57,61</sup>.

Bei der Adipogenese spielen auch inhibitorische Faktoren eine Rolle. Gene wie TCF (T Cell-Specific Transcription Factor), LEF (Lymphoid-Enhancer Factor), GATA2/3 (GATA Binding Protein 2/3) und SMAD3 (Tumour-Suppressor Protein 3) verhindern die Adipogenese indem sie die Herabregulation von C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$  induzieren (zusammengefasst in<sup>65-67</sup>).



**Abbildung 1.4:** Ausschnitt aus der transkriptionalen Regulation der Adipogenese, zusammengestellt aus<sup>61,65,67</sup>. Durch die hormonelle Induktion von Präadipozyten mit IBMX, Insulin und Dexamethason, werden verschiedene Signalwege aktiviert (blau). Diese induzieren die Schlüsselregulatoren der Adipogenese, PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$ , welche ihre Expression in einer positiven Feedbackschleife gegenseitig verstärken und die Expression von weiteren Genen der Adipogenese induzieren. Inhibitoren der Adipogenese sind in grau dargestellt.

Abkürzungen: IBMX, Isobutylmethylxanthin; cAMP, cyclic AMP; JAK2, Janus Kinase 2; STAT3, Signal Transducer and Activator of Transcription 3; CREB, cAMP-Responsive Element-Binding; GATA2/3, GATA Binding Protein 2/3; SREBP1, Sterol Regulatory Element Binding Protein 1; KLF4, Krüppel-Like Factor 4; C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , CAAT/Enhancer Binding Protein alpha, beta, delta; PPAR $\gamma$ , Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma; TCF/LEF, T Cell-Specific Transcription Factor/Lymphoid-Enhancer Factor; SMAD3, Tumour-Suppressor Protein 3.

### 1.3.3 Die Bedeutung der Translationskontrolle in der Adipogenese

Viele der translational regulierten Gene kodieren für Schlüsselproteine des Zellzykluses, der Zelldifferenzierung und metabolischer Signalwege. Eine Herabregulation dieser Gene auf der Translationsebene wurde bereits mit verschiedenen Erkrankungen, unter anderem mit der Entwicklung von Tumoren, assoziiert (zusammengefasst in<sup>54</sup>).

Die Erforschung der Translation ist notwendig um die Regulationsmechanismen der Differenzierung in der Adipogenese zu entschlüsseln<sup>62</sup>.

mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) ist in einen zentralen Signalweg der translationalen Kontrolle involviert. Diese Proteinkinase ist bei allen Eukaryoten evolutionär konserviert. So spielt mTOR eine entscheidende Rolle bei der Transkription, in der Ribosomen Biogenese, der Protein Synthese, dem Zellzyklus sowie der Autophagie (zusammengefasst in<sup>68-70</sup>).



Die Aktivierung von mTORC1 (mTOR C1 Komplex) ist notwendig für die Stimulation der PPAR $\gamma$  Expression in der Differenzierung von Adipozyten<sup>71</sup>. Eine fehlerhafte Regulation von mTORC1 ist in die Entstehung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 involviert<sup>72</sup>.

### **1.3.3.1 Translationskontrolle über den PI3K Signalweg**

Ein Aktivator des mTORC1 ist das Insulin. Dieses wirkt über IRS (Insulin Rezeptor Substrat) auf den PI3K Signalweg<sup>68</sup> (Abbildung 1.5).

In diesem Signalweg induziert PI3K zunächst PDK1 (Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1), welches anschließend AKT (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1, Protein Kinase B) phosphoryliert und aktiviert<sup>73</sup>.

AKT initiiert die Expression von CREB, wodurch die Adipogenese über die C/EBPs und PPAR $\gamma$  aktiviert wird (Kapitel 1.3.2)<sup>67</sup>. In Folge dessen inhibiert AKT die Aktivität der FOXO (Forkhead Box O) Transkriptionsfaktoren, welche die terminale Differenzierung der Adipozyten verhindern. Somit wird indirekt die Expression von PPAR $\gamma$  induziert<sup>71</sup>. Schließlich ist AKT für die Regulation von mTORC1 notwendig, indem es dessen Inhibition durch TSC2 deaktiviert. Die transkriptionale Induktion von PPAR $\gamma$  durch mTORC1 verstärkt wiederum die Adipogenese<sup>71</sup>.

Ein weiterer Aktivator der Adipogenese ist HZF (Haematopoietic Zinc-Finger). HZF bindet an die 3' untranslatierte Region der C/EBP $\alpha$  mRNA und steigert deren Translationseffizienz<sup>74</sup>.

Indessen blockiert der Faktor c-MYC (Cellular Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog) die terminale Phase der Adipogenese durch die Inhibition von C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$ <sup>75</sup>.

### **1.3.3.2 Translationskontrolle über die Ribosomenbiogenese**

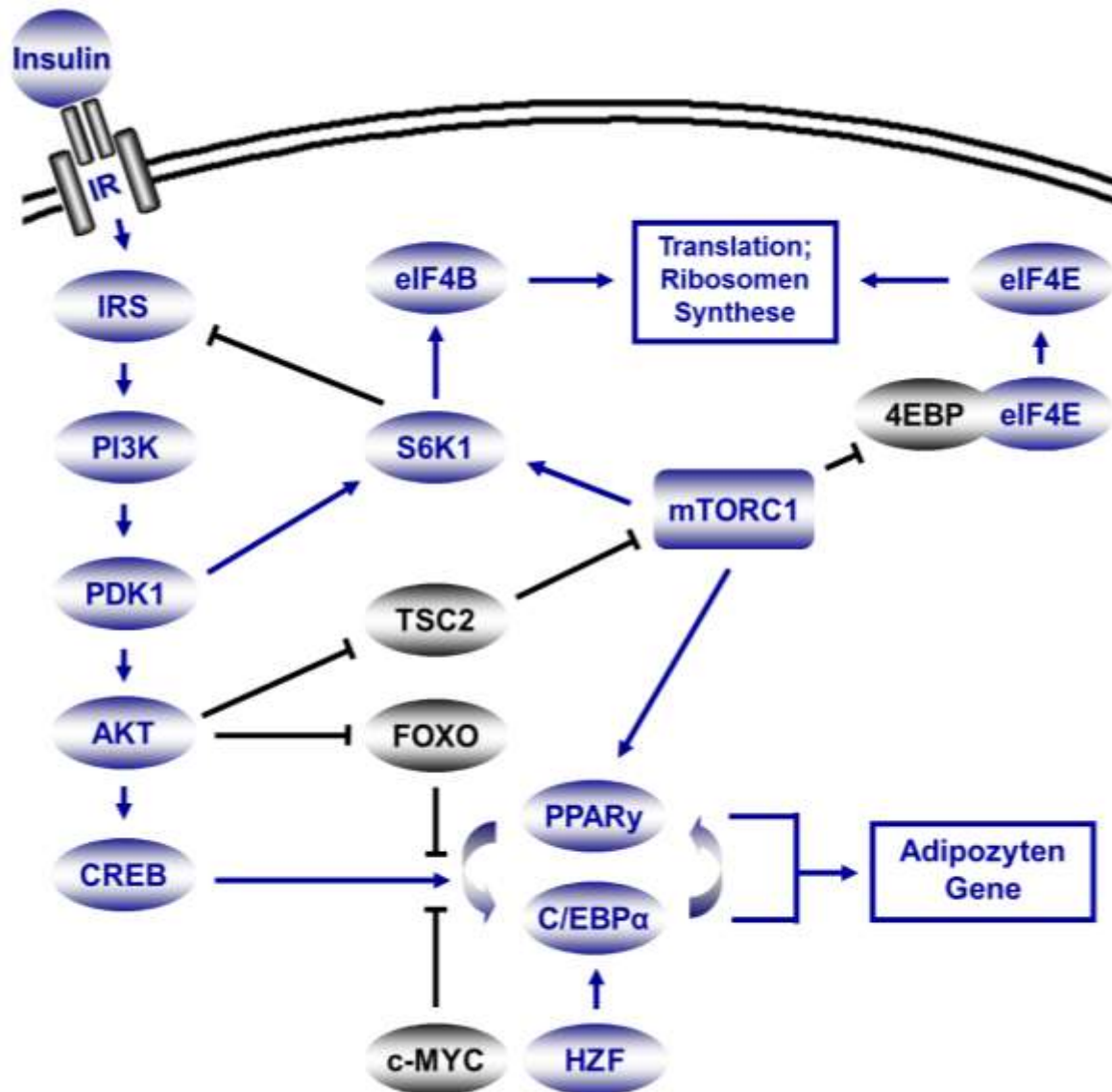
Neben der Aktivierung von PPAR $\gamma$  wirken der PI3K Signalweg und mTORC1 zusätzlich durch die Stimulation der Ribosomenbiogenese auf die Translation von Genen der Adipogenese<sup>76</sup>.

Die indirekte Aktivierung von mTORC1 durch AKT führt zur Phosphorylierung und Inhibition des translationalen Repressors 4EBP (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) Binding Protein). Dadurch wird das, am 4EBP gebundene eIF4E freigesetzt, was in einer gesteigerten Translationsrate resultiert<sup>76,77</sup>.

Zusätzlich fördert mTORC1 die Translation und die Synthese von Ribosomen durch die Phosphorylierung von S6K1 (Ribosomen S6 Kinase 1)<sup>78</sup>. S6K1 wiederum phosphoryliert Komponenten der Translationsmaschinerie wie eIF4B (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 B)<sup>77</sup>. Bei der Aktivierung von S6K1 und somit von eIF4B ist auch PDK1 ein wichtiger Faktor, da er S6K1 phosphoryliert<sup>76</sup>.

S6K1 kann in einer negativen Rückkopplung, durch die Phosphorylierung von IRS, den Insulin induzierten PI3K Signalweg inhibieren<sup>71,79</sup>.

Ein Ausschnitt aus der komplexen Regulation der Translation während der Adipogenese ist in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abbildung 1.5:** Ausschnitt aus der translationalen Regulation der Adipogenese, zusammengestellt aus<sup>61,67,71,74–77,80,81</sup>. Die hormonelle Induktion von Präadipozyten mit Insulin aktiviert den PI3K Signalweg und somit mTORC1. Hierdurch wird die Expression von Adipozyten Genen über die Aktivierung von PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$  induziert. Zusätzlich wird die Translation von Proteinen der Adipogenese durch eine gesteigerte Synthese von Ribosomen gefördert (blau). Inhibitoren der Adipogenese sind in grau dargestellt.

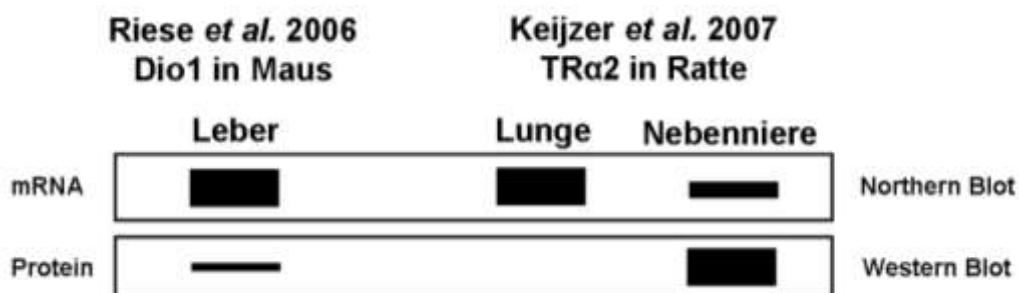
Abkürzungen: IR, Insulin Rezeptor; IRS, Insulin Rezeptor Substrat; eIF4B/E, Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 B/E; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; S6K1, Ribosome S6 Kinase 1; mTORC1, Mammalian Target of Rapamycin C1 Komplex; 4EBP, eIF4E Binding Protein; PDK1, Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1; TSC2, Tuberous Sclerosis Complex 2; AKT, Phosphoinositide-Dependent Kinase 1, Protein Kinase B; FOXO, Forkhead Box O; c-MYC, Cellular Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; CREB, cAMP-Responsive Element-Binding; PPAR $\gamma$ , Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma; C/EBP $\alpha$ , CAAT/Enhancer Binding Protein alpha; HZF, Haematopoietic Zinc-Finger.

### 1.3.4 Erforschung der Translationskontrolle über Saccharosegradienten und Microarray-Analyse

Durch die Erforschung der Transkriptions- und Translationskontrolle wurde bereits eine große Zahl an Genen identifiziert, die bei der Regulation der Adipogenese von großer Bedeutung sind (Kapitel 1.3.2 und 1.3.3)<sup>65,72</sup>. Dennoch sind die Regulationsmechanismen in der frühen Phase der Adipogenese nicht vollständig geklärt<sup>70,71</sup>.

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit war noch keine Studie publiziert, welche die Expression von translationell regulierten Genen in der frühen Adipogenese beschreibt.

Für eine Vorhersage der Protein Konzentration in der Zelle ist die Menge der exprimierten mRNA nur bedingt geeignet (Abbildung 1.6)<sup>82,83</sup>. Durch Effekte wie interne ribosomale Eintrittsstellen, die Initiation an non-AUG Codons oder alternatives Spleißen, ist es nicht möglich die exakten Proteinprodukte aus der Sequenz des primären Transkriptes abzuleiten<sup>82-84</sup>.



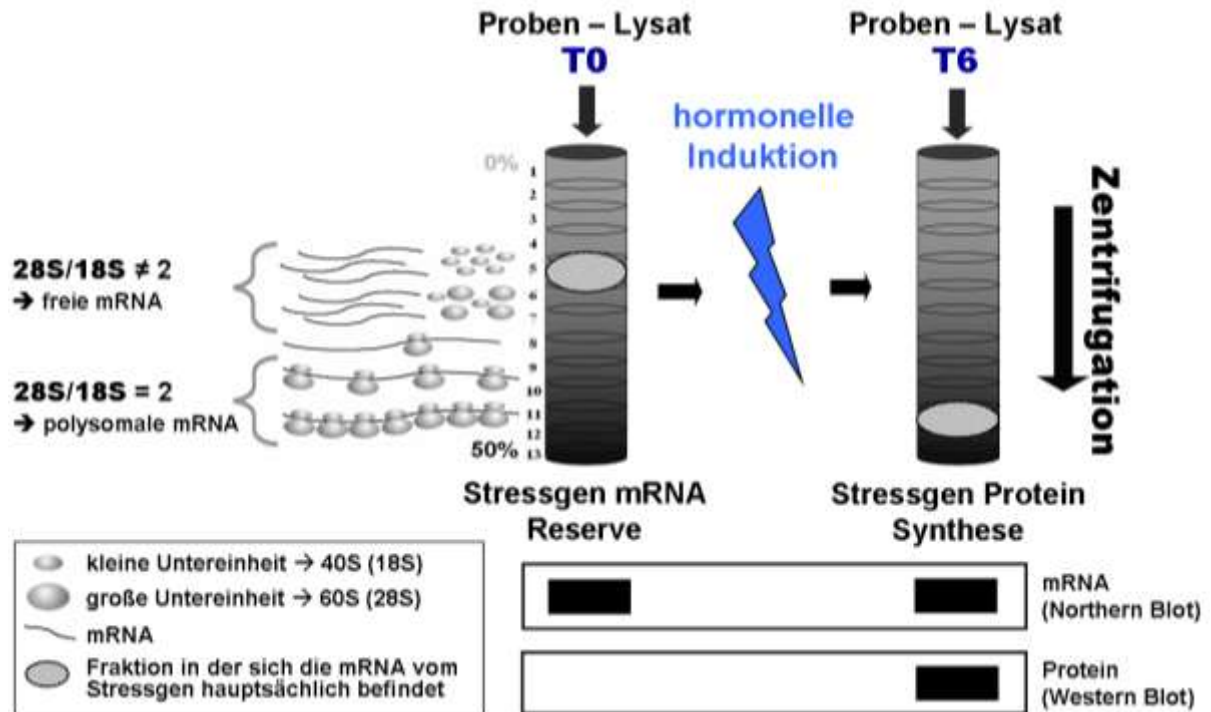
**Abbildung 1.6:** Vergleich von schematisierten Northern- und Western-Blots, abgeleitet aus Ergebnissen von Riese *et al.* (2006) für Dio1 (Iodothyronine Deiodinase Type 1)<sup>82</sup> und Keijzer *et al.* (2007) für TRα2 (Thyroid Hormon Rezeptor alpha 2)<sup>83</sup>. Die Protein Konzentration ist nicht immer von der Expressionsmenge der mRNA eines Gens ableitbar.

Die Effizienz der Translation einer mRNA steht in Zusammenhang mit deren Ribosomenbesatz<sup>85</sup>. Der Ribosomenbesatz der mRNA kann über eine Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten untersucht werden. Die Position der mRNA im Gradienten korreliert hierbei direkt mit deren Ribosomenbesatz und gibt somit Aufschluss über deren Translationseffizienz<sup>85,86</sup>.

mRNAs, die nicht mit Ribosomen besetzt sind (freie RNAs), weisen eine geringe Dichte auf und werden nicht translatiert (Abbildung 1.7). Indessen werden mRNAs, die mit vielen Ribosomen besetzt sind (polysomale mRNAs), translatiert und weisen eine hohe Dichte auf<sup>85</sup>.

Eine anschließende Identifikation der mRNAs aus den einzelnen Gradientenfraktionen mit Hilfe von Microarray Analysen ermöglicht neue Einblicke in die Regulation der Translation in vielfältigen Prozessen<sup>85,86</sup>.

In dieser Arbeit wurde der beschriebene methodische Ansatz im Hinblick auf die Translationskontrolle in der frühen Adipogenese, sechs Stunden nach der hormonellen Induktion, angewendet.



**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation und erwarteter Ergebnisse für mRNA- und Protein-Konzentrationen eines beispielhaften Stressgens. Direkt vor der hormonellen Induktion (T0) ist bereits mRNA des Stressgens vorhanden, wird aber nicht translatiert. Erst sechs Stunden nach der hormonellen Induktion (T6) werden messbare Mengen an mRNA des Stressgens von Ribosomen besetzt und translatiert. Die im Proben-Lysat enthaltene mRNA wird durch Ultrazentrifugation im linearen Saccharosegradienten anhand ihrer Dichte aufgetrennt. Im Gegensatz zu freier mRNA ( $28S/18S \neq 2$ ) hat jene, die mit vielen Ribosomen besetzt ist (polysomale mRNA;  $28S/18S = 2$ ) eine höhere Dichte und sammelt sich in den unteren Fraktionen des Gradienten.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von *DOR* im Fett- und Muskelgewebe bei Mäusen mit unterschiedlicher metabolischer Voraussetzung betrachtet. Einerseits wurde dabei der Einfluss der Nahrungszufuhr durch eine fettreiche Diät auf die *DOR*-Expression betrachtet. Andererseits wurde die Auswirkung einer genetischen Prädisposition für die Adipositas auf *DOR* untersucht.

Dafür wurden folgende Hypothesen überprüft:

- Die Fütterung einer fettreichen Diät bewirkt eine Änderung in der *DOR*-Expression im Fett- und Muskelgewebe.
- Die Ausprägung einer genetisch bedingten Adipositas bewirkt eine Änderung in der *DOR*-Expression im Fett- und Muskelgewebe.
- Die Art des untersuchten Gewebes und das Geschlecht sowie das Alter der untersuchten Tiere beeinflussen die *DOR*-Expression im Fett- und Muskelgewebe.

Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war die Identifikation von Genen, deren Translationsrate sich sechs Stunden nach der hormonellen Induktion von 3T3-L1 Präadipozyten ändert. Eine *in silico* Analyse der alternativ translatierten Gene durch "clustering" sollte die Identifikation gemeinsamer Funktionsmerkmale erlauben. Dies soll Rückschlüsse auf die Mechanismen der Regulation der Translation in der frühen Adipogenese ermöglichen.

Dafür wurden folgende Hypothesen überprüft:

- In der frühen Adipogenese werden Gene auf der Ebene der Translation hoch reguliert, welche die Expression von Genen der terminalen Adipogenese induzieren.
- In der frühen Adipogenese werden Gene auf der Ebene der Translation herab reguliert, welche die Expression von Genen der terminalen Adipogenese inhibieren.

## 1.5 Literatur

1. Jo, J., Gavrilova, O., Pack, S., Jou, W., Mullen, S., Sumner, A.E., Cushman, S.W. & Perival, V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000324 (2009).
2. O'Rahilly, S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* **462**, 307-314 (2009).
3. WHO | Obesity and overweight. WHO at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>
4. Pijl, H. Obesity: evolution of a symptom of affluence. *Neth J Med* **69**, 159-166 (2011).
5. Alfredo Martínez, J., Martínez-Hernández, A., Enríquez, L., Moreno-Aliaga, M.J., Moreno-Moreno, M.J. & Martí, A. Genetics of obesity. *Public Health Nutr* **10**, 1138-1144 (2007).
6. Lev-Ran, A. Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline. *Diabetes Metab Res Rev* **17**, 347-362 (2001).
7. Seki, Y., Williams, L., Vuguin, P. M. & Charron, M. J. Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models. *Endocrinology* **153**, 1031-1038 (2012).
8. Rajala, M. W. & Scherer, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**, 3765-3773 (2003).
9. Singla, P., Bardoloi, A. & Parkash, A. A. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes* **1**, 76-88 (2010).
10. Mattson, M. P. Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res Rev* **9**, 69-76 (2010).
11. Gesta, S., Tseng, Y.-H. & Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**, 242-256 (2007).
12. Nedergaard, J. & Cannon, B. The Changed Metabolic World with Human Brown Adipose Tissue: Therapeutic Visions. *Cell Metabolism* **11**, 268-272 (2010).
13. Martinez de Mena, R., Scanlan, T. S. & Obregon, M.-J. The T3 Receptor  $\beta$ 1 Isoform Regulates UCP1 and D2 Deiodinase in Rat Brown Adipocytes. *Endocrinology* **151**, 5074 -5083 (2010).
14. Sell, H., Deshaies, Y. & Richard, D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2098-2104 (2004).
15. Hajer, G. R., van Haeften, T. W. & Visseren, F. L. J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* **29**, 2959-2971 (2008).
16. Ukropec, J., Ukropcova, B., Kurdiová, T., Gasperikova, D. & Klimes, I. Adipose tissue and skeletal muscle plasticity modulates metabolic health. *Archives of Physiology and Biochemistry* **114**, 357-368 (2008).
17. Aprahamian, T. R. & Sam, F. Adiponectin in Cardiovascular Inflammation and Obesity. *Int J Inflam* **2011**, 376909 (2011).
18. Karjalainen, J., Tikkanen, H., Hernelahti, M. & Kujala, U. M. Muscle fiber-type distribution predicts weight gain and unfavorable left ventricular geometry: a 19 year follow-up study. *BMC Cardiovasc Disord* **6**, 2 (2006).
19. Du, M., Yan, X., Tong, J. F., Zhao, J. & Zhu, M. J. Maternal Obesity, Inflammation, and Fetal Skeletal Muscle Development. *Biology of Reproduction* **82**, 4 -12 (2010).
20. Schiebler, T. H. & Korf, H.-W. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. (Springer: 2007).
21. Harrison, B. C. & Leinwand, L. A. Fighting fat with muscle: bulking up to slim down. *Cell Metab* **7**, 97-98 (2008).
22. Argilés, J. M., López-Soriano, J., Almendro, V., Busquets, S. & López-Soriano, F. J. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: A link with obesity? *Med Res Rev* **25**, 49-65 (2005).

23. Dyck, D. J., Heigenhauser, G. J. F. & Bruce, C. R. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol (Oxf)* **186**, 5-16 (2006).
24. Havekes, B. & Sauerwein, H. P. Adipocyte-myocyte crosstalk in skeletal muscle insulin resistance; is there a role for thyroid hormone? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**, 641-646 (2010).
25. Sell, H., Dietze-Schroeder, D. & Eckel, J. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 416-422 (2006).
26. Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., Kajimura, S., Zingaretti, M.C., Vind, B.F., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, S.P. & Spiegelman, B.M. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468 (2012).
27. Obregon, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid* **18**, 185-195 (2008).
28. Baumgartner, B.G., Orpinell, M., Duran, J., Ribas, V., Burghardt, H.E., Bach, D., Villar, A.V., Paz, J.C., González, M., Camps, M., Oriola, J., Rivera, F., Palacín, M. & Zorzano, A. Identification of a Novel Modulator of Thyroid Hormone Receptor-Mediated Action. *PLoS ONE* **2**, e1183 (2007).
29. Klieverik, L.P., Coomans, C.P., Endert, E., Sauerwein, H.P., Havekes, L.M., Voshol, P.J., Rensen, P.C.N., Romijn, J.A., Kalsbeek, A. & Fliers, E. Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology* **150**, 5639-5648 (2009).
30. Sheehan, T. E., Kumar, P. A. & Hood, D. A. Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase subunit expression by thyroid hormone. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **286**, E968 -E974 (2004).
31. Lee, J.-Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y.-I., Hashizaki, H., Kim, M.-J., Sakamoto, T., Goto, T. & Kawada, T. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **302**, C463 -C472 (2012).
32. Seifi, S., Tabandeh, M.R., Nazifi, S., Saeb, M., Shirian, S. & Sarkoohi, P. Regulation of adiponectin gene expression in adipose tissue by thyroid hormones. *J Physiol Biochem* **68** (2), 193-203 (2011).
33. Gereben, B., Zavacki, A.M., Ribich, S., Kim, B.W., Huang, S.A., Simonides, W.S., Zeöld, A. & Bianco, A.C. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews* **29**, 898 -938 (2008).
34. Pessemeesse, L., Schlernitzauer, A., Sar, C., Levin, J., Grandemange, S., Seyer, P., Favier, F.B., Kaminski, S., Cabello, G., Wrutniak-Cabello, C. & Casas, F. Depletion of the p43 mitochondrial T3 receptor in mice affects skeletal muscle development and activity. *FASEB J* **26**, 748-756 (2011).
35. Cheng, S.-Y., Leonard, J. L. & Davis, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* **31**, 139-170 (2010).
36. Ribeiro, M.O., Carvalho, S.D., Schultz, J.J., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Bianco, A.C. & Brent, G.A. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest* **108**, 97-105 (2001).
37. White, P., Burton, K. A., Fowden, A. L. & Dauncey, M. J. Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. *FASEB J* **15**, 1367 -1376 (2001).
38. Mishra, A., Zhu, X.-G., Ge, K. & Cheng, S.-Y. Adipogenesis is differentially impaired by thyroid hormone receptor mutant isoforms. *J Mol Endocrinol* **44**, 247-255 (2010).
39. Golozoubova, V., Gullberg, H., Matthias, A., Cannon, B., Vennström, B. & Nedergaard, J. Depressed Thermogenesis but Competent Brown Adipose Tissue Recruitment in Mice Devoid of All Hormone-Binding Thyroid Hormone Receptors. *Molecular Endocrinology* **18**, 384 -401 (2004).

40. Kindblom, J.M., Gevers, E.F., Skrtic, S.M., Lindberg, M.K., Göthe, S., Törnell, J., Vennström, B. & Ohlsson, C. Increased adipogenesis in bone marrow but decreased bone mineral density in mice devoid of thyroid hormone receptors. *Bone* **36**, 607-616 (2005).
41. Liu, Y.-Y., Schultz, J. J. & Brent, G. A. A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J Biol Chem* **278**, 38913-38920 (2003).
42. Moeller, L. C. & Broecker-Preuss, M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res* **4**, S6 (2011).
43. Fang, S., Suh, J.M., Atkins, A.R., Hong, S.-H., Leblanc, M., Nofsinger, R.R., Yu, R.T., Downes, M. & Evans, R.M. Corepressor SMRT promotes oxidative phosphorylation in adipose tissue and protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 3412-3417 (2011).
44. Malik, I.A., Baumgartner, B.G., Naz, N., Sheikh, N., Moriconi, F. & Ramadori, G. Changes in gene expression of DOR and other thyroid hormone receptors in rat liver during acute-phase response. *Cell Tissue Res* **342**, 261-272 (2010).
45. Linares, G.R., Xing, W., Burghardt, H., Baumgartner, B., Chen, S.-T., Ricart, W., Fernandez-Real, J.-M., Zorzano, A. & Mohan, S. Role of Diabetes and Obesity Related Protein (DOR) in the Regulation of Osteoblast Differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E40-E48 (2011).
46. Bennetts, J. S., Rendtorff, N. D., Simpson, F., Tranebjaerg, L. & Wicking, C. The coding region of TP53INP2, a gene expressed in the developing nervous system, is not altered in a family with autosomal recessive non-progressive infantile ataxia on chromosome 20q11-q13. *Dev Dyn* **236**, 843-852 (2007).
47. Mauvezin, C., Orpinell, M., Francis, V.A., Mansilla, F., Duran, J., Ribas, V., Palacín, M., Boya, P., Teleman, A.A. & Zorzano, A. The nuclear cofactor DOR regulates autophagy in mammalian and Drosophila cells. *EMBO Rep* **11**, 37-44 (2010).
48. Nowak, J. & Iovanna, J. L. TP53INP2 is the new guest at the table of self-eating. *Autophagy* **5**, 383-384 (2009).
49. Francis, V. A., Zorzano, A. & Teleman, A. A. dDOR is an EcR Coactivator that Forms a Feed-Forward Loop Connecting Insulin and Ecdysone Signaling. *Current Biology* **20**, 1799-1808 (2010).
50. Nowak, J., Archange, C., Tardivel-Lacombe, J., Pontarotti, P., Pébusque, M.-J., Vaccaro, M.I., Velasco, G., Dagorn, J.-C. & Iovanna, J.L. The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **20**, 870-881 (2009).
51. Moran-Jones, K., Grindlay, J., Jones, M., Smith, R. & Norman, J. C. hnRNP A2 regulates alternative mRNA splicing of TP53INP2 to control invasive cell migration. *Cancer Res* **69**, 9219-9227 (2009).
52. Ortega, F.J., Moreno-Navarrete, J.M., Ribas, V., Esteve, E., Rodriguez-Hermosa, J.I., Ruiz, B., Peral, B., Ricart, W., Zorzano, A. & Fernández-Real, J.M. Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 2134-2141 (2009).
53. Liu, Y.-Y., Schultz, J. J. & Brent, G. A. A Thyroid Hormone Receptor  $\alpha$  Gene Mutation (P398H) Is Associated with Visceral Adiposity and Impaired Catecholamine-stimulated Lipolysis in Mice. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 38913 -38920 (2003).
54. Calkhoven, C. F., Müller, C. & Leutz, A. Translational control of gene expression and disease. *Trends Mol Med* **8**, 577-583 (2002).
55. Tee, A. R. & Blenis, J. mTOR, translational control and human disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 29-37 (2005).
56. Green, H. & Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**, 19-27 (1975).
57. Otto, T. C. & Lane, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 229-242 (2005).
58. MacDougald, O. A. & Lane, M. D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* **64**, 345-373 (1995).



59. Poulos, S. P., Dodson, M. V. & Hausman, G. J. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 1185-1193 (2010).
60. Reichert, M. & Eick, D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* **18**, 459-466 (1999).
61. Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* **4**, 263-273 (2006).
62. Kawaji, A., Nishizuka, M., Osada, S. & Imagawa, M. TC10-like/TC10betaLong regulates adipogenesis by controlling mitotic clonal expansion. *Biol Pharm Bull* **33**, 404-409 (2010).
63. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**, 1293-1307 (2000).
64. Avram, M. M., Avram, A. S. & James, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol* **56**, 472-492 (2007).
65. Cristancho, A. G. & Lazar, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 722-734 (2011).
66. MacDougald, O. A. & Mandrup, S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **13**, 5-11 (2002).
67. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 885-896 (2006).
68. Sun, J., Conn, C. S., Han, Y., Yeung, V. & Qian, S.-B. PI3K-mTORC1 Attenuates Stress Response by Inhibiting Cap-independent Hsp70 Translation. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 6791 -6800 (2011).
69. Ruggero, D. & Sonenberg, N. The Akt of translational control. *Oncogene* **24**, 7426-7434 (2005).
70. Wang, X. & Proud, C. G. mTORC1 signaling: what we still don't know. *J Mol Cell Biol* **3**, 206-220 (2011).
71. Zhang, H.H., Huang, J., Düvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R.M., Wu, C.-L. & Manning, B.D. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE* **4**, e6189 (2009).
72. Catania, C., Binder, E. & Cota, D. mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease. *Int J Obes (Lond)* **35**, 751-761 (2011).
73. Cully, M., You, H., Levine, A. J. & Mak, T. W. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **6**, 184-192 (2006).
74. Kawagishi, H., Wakoh, T., Uno, H., Maruyama, M., Moriya, A., Morikawa, S., Okano, H., Sherr, C.J., Takagi, M. & Sugimoto, M. Hzf regulates adipogenesis through translational control of C/EBPalpha. *EMBO J* **27**, 1481-1490 (2008).
75. Heath, V. J., Gillespie, D. A. & Crouch, D. H. Inhibition of the terminal stages of adipocyte differentiation by cMyc. *Exp Cell Res* **254**, 91-98 (2000).
76. Shahbazian, D., Roux, P.P., Mieulet, V., Cohen, M.S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J.W., Blenis, J., Pende, M. & Sonenberg, N. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* **25**, 2781-2791 (2006).
77. Rui, L. A link between protein translation and body weight. *J Clin Invest* **117**, 310-313 (2007).
78. Kaeberlein, M. & Kennedy, B. K. Hot topics in aging research: protein translation and TOR signaling, 2010. *Aging Cell* **10**, 185-190 (2011).
79. Wang, X. & Proud, C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* **21**, 362-369 (2006).
80. Kaur, S., Katsoulidis, E. & Plataniias, L. C. Akt and mRNA translation by interferons. *Cell Cycle* **7**, 2112-2116 (2008).
81. Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **13**, 1016-1023 (2011).
82. Riese, C., Michaelis, M., Mentrup, B., Götz, F., Köhrle, J., Schweizer, U. & Schomburg, L. Selenium-Dependent Pre- and Posttranscriptional Mechanisms Are

- Responsible for Sexual Dimorphic Expression of Selenoproteins in Murine Tissues. *Endocrinology* **147**, 5883 -5892 (2006).
83. Keijzer, R., Blommaart, P.-J.E., Labruyère, W.T., Vermeulen, J.L.M., Doulabi, B.Z., Bakker, O., Tibboel, D. & Lamers, W.H. Expression of thyroid hormone receptors A and B in developing rat tissues; evidence for extensive posttranscriptional regulation. *Journal of Molecular Endocrinology* **38**, 523 -535 (2007).
84. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218-223 (2009).
85. Melamed, D. & Arava, Y. Genome-wide analysis of mRNA polysomal profiles with spotted DNA microarrays. *Meth Enzymol* **431**, 177-201 (2007).
86. Melamed, D., Eliyahu, E. & Arava, Y. Exploring translation regulation by global analysis of ribosomal association. *Methods* **48**, 301-305 (2009).

## 2. Manuskript „DOR“

### **Extrinsic and intrinsic regulation of *DOR/TP53/INP2* expression in mice: effects of dietary fat content, tissue type and sex in adipose and muscle tissues**

**Carolin Fromm-Dornieden<sup>1\*</sup>, Oleksandr Lytovchenko<sup>1\*</sup>, Silvia von der Heyde<sup>2\*</sup>, Nina Behnke<sup>1</sup>, Sebastian Hogg<sup>1</sup>, Janina Berghoff<sup>1</sup>, Frederik Köpper<sup>1</sup>, Lennart Opitz<sup>3</sup>, Ulla Renne<sup>4</sup>, Andreas Hoeflich<sup>4</sup>, Tim Beissbarth<sup>2</sup>, Bertram Brenig<sup>1</sup>, Bernhard G Baumgartner<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen, Germany

<sup>2</sup>Statistical Bioinformatics, Department of Medical Statistics, University Medical Center, Humboldtallee 32, 37073 Göttingen, Germany

<sup>3</sup>DNA Microarray Facility, University of Göttingen, Department of Developmental Biochemistry, Humboldtallee 23, 37073 Göttingen, Germany

<sup>4</sup>Research Units Genetics & Biometry, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Metabolic Diseases and Medical Molecular Biology, Paracelsus Private Medical University Salzburg, Müllner Hauptstr. 48, 5020 Salzburg, Austria

\*These authors contributed equally to this work

## **2.1 Abstract**

### **2.1.1 Background**

DOR/TP53INP2 acts both at the chromosomal level as a nuclear co-factor e.g. for the thyroid hormone receptor and at the extrachromosomal level as an organizing factor of the autophagosome. In a previous study, *DOR* was shown to be down-regulated in skeletal muscle of obese diabetic Zucker fa/fa rats.

### **2.1.2 Methods**

To identify sites of differential *DOR* expression in metabolically active tissues, we measured differences in *DOR* expression in white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), skeletal muscle (SM) and heart muscle (HM) by qPCR. To assess whether *DOR* expression is influenced short term by nutritional factors, NMRI mice were fed different fat rich diets (FD: 18% or HFD: 80% fat) for one week and *DOR* expression was compared to NMRI mice fed a control diet (ND: 3.3% fat). Additionally, *DOR* expression was measured in young (45 days old) and adult (100 days old) genetically obese (DU6/DU6i) mice and compared to control (DUKs/DUKsi) animals.

### **2.1.3 Results**

ANOVA results demonstrate a significant influence of diet, tissue type and sex on *DOR* expression in adipose and muscle tissues of FD and HFD mice. In SM, *DOR* expression was higher in HFD than in FD male mice. In WAT, *DOR* expression was increased as compared to BAT in male FD and HFD mice. In contrast, expression levels in female mice were higher in BAT for both dietary conditions.

*DOR* expression levels in all tissues of 100 day old genetically obese animals were mainly influenced by sex. In HM, *DOR* expression was higher in male than female animals.

### **2.1.4 Conclusions**

*DOR* expression varies under the influence of dietary fat content, tissue type and sex. We identified target tissues for further studies to analyse the specific function of *DOR* in obesity. *DOR* might be part of a defence mechanism against fat storage in high fat diets or obesity.

## 2.2 Background

Obesity is characterized by an increase of adipose tissue caused by over-nutrition, genetic factors or a combination of both. The two types of adipose tissue in mammals, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) show great differences in cell structure and function. WAT is responsible for heat insulation, mechanical cushioning and acts as storage site for fat in the form of triglycerides. It is also known as a key endocrine organ releasing a number of cytokines, referred to as adipokines, and other molecules that have both local and generalized effects. About 15% of total body weight consists of WAT in normal weight subjects, which can increase up to 40% in obese humans<sup>1</sup>. In contrast, BAT has the primary function to generate body heat while dissipating energy. BAT is rich in mitochondria and the BAT-specific protein UCP1 (uncoupling protein-1), which accomplishes energy dissipation by uncoupling of the respiratory chain from ATP production thus generating heat (reviewed in<sup>1-4</sup>).

Besides adipose tissue, muscle tissue takes an important part in body composition. Skeletal muscle (SM) composes 35% – 50% of body mass. Significant quantities of plasma fatty acids, either for energy production by fat oxidation or for storage are taken up by SM (reviewed in<sup>5-7</sup>).

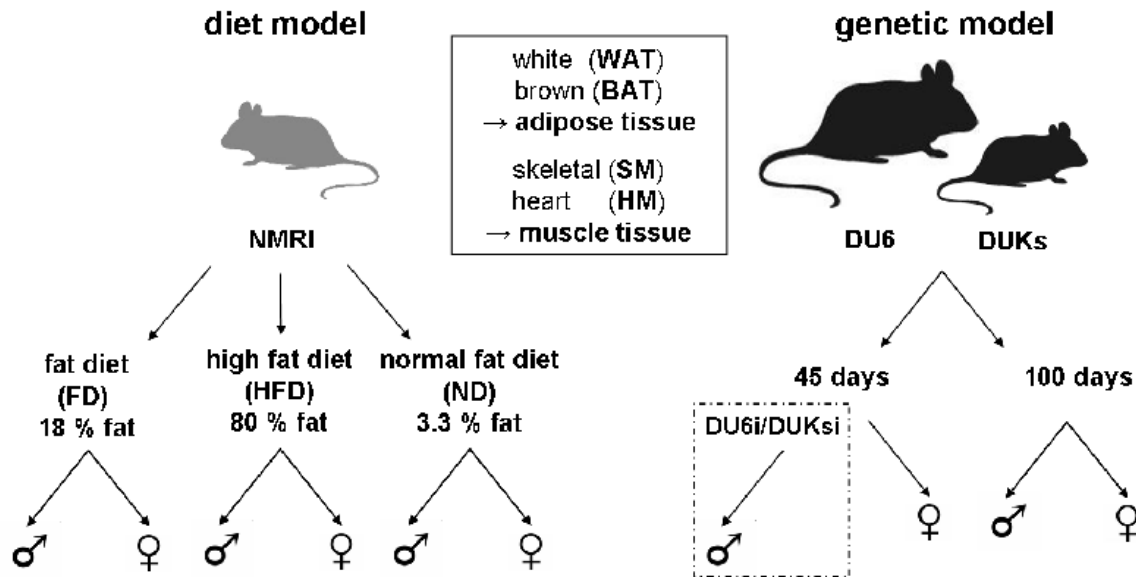
Thyroid hormones (THs) regulate metabolism and function of adipose and muscle tissue. They act as pleiotropic factors during development by regulating genes involved in differentiation<sup>1</sup>. Furthermore, THs play an important role in lipid mobilization, lipid degradation, fatty acid oxidation, and glucose metabolism<sup>8</sup>. THs influence the expression of a number of genes involved in lipid and glucose metabolism by direct or indirect effects<sup>8</sup>. In addition, THs stimulate muscle development and differentiation through activation of myogenin and myotube formation in muscle cells<sup>9</sup>. Until the 1980's, THs were used as agents for anti-obesity treatment due to their increasing effect on metabolic rate. However, they show severe side-effects e. g. cardiac acceleration, muscle loss, and other symptoms of thyrotoxicosis. As an alternative, Grover *et al.* (2007) reviewed the possibility to employ the two subgroups of thyroid hormone receptor activators, namely TR $\alpha$  and TR $\beta$ <sup>10</sup> to specifically modulate TH action. Their individual activation might allow reduction of obesity without the common side effects of THs<sup>10</sup>. This may be achieved by use of selective molecules or by specific activation of modulators of TH receptors.

*DOR* (Diabetes and Obesity Related), also called *TP53INP2* (Tumor Protein 53 Inducible Nuclear Protein 2), interacts with thyroid hormone receptor  $\alpha$ 1 (*TR $\alpha$ 1*) enhancing its transcriptional activity. Expression of *DOR* was shown to be highly reduced in skeletal

muscle of obese diabetic fa/fa Zucker rats<sup>9</sup>. *DOR* knock-down in cultured muscle cells, induced to differentiate into mature muscle cells, led to delayed muscle cell differentiation by attenuating expression of myogenin and other TH controlled genes<sup>9</sup>. Effects of *DOR* on differentiation were also shown in osteoblasts<sup>11</sup>. In liver, *DOR* is abundantly expressed and in acute-phase reaction it is down-regulated together with other activating factors of the TH signaling system. *TRα2*, which blocks transactivation of TH controlled genes, is up-regulated in these conditions pinpointing the activating role of *DOR* in the context of the TH system<sup>12</sup>. Mauvezin *et al.* (2010) demonstrated involvement of mammalian and *Drosophila* *DOR* in stimulation of the autophagosome formation<sup>13</sup>. Autophagy has been shown to play a role in adipogenesis and fat accumulation<sup>14</sup>. Dysregulation of autophagy may cause impaired insulin sensitivity in obesity<sup>15</sup>.

For the analysis of the role of *DOR* in the pathophysiology of obesity, as an initial step, we determined *DOR* expression changes in obese mice in comparison to lean animals. For this, DU6 and DUKs mouse strains as well as their inbred lines were used. The mouse strain DU6 was established by selection for high body weight for 70 generations, while the mouse strain DUKs is an unselected, randomly mated control line<sup>16,17</sup>.

*DOR* is involved in the modulation of TH controlled gene expression and in autophagy. Both have been attributed to obesity. In this study we investigated changes in *DOR* expression in different types of fat and muscle tissue. These tissues were derived from NMRI mice fed with a fat-rich diet, as well as genetic obese DU6 mice and their correlated control animals (Figure 2.1), to detect sites of *DOR* action and link *DOR* expression levels with changes in fat or muscle mass in induced or genetic obesity.



**Figure 2.1: Overview of investigated mouse models and tissues for *DOR*-expression analysis.**

For the diet model, NMRI mice were fed diets with different fat content. In the genetic model, 45 days old male mice from inbred lines DU6i and DUKsi were used (dashed box). All female animals and 100 days old male mice were DU6 and DUKs animals.

## 2.3 Methods

### 2.3.1 Ethics Statement

All procedures were done in accordance with the German Animal Protection Law. Formal approval of the experiment is documented by the approval number "LALLF M-V/TSD/7221.3-1.2-037/06" from the ethical committee of Mecklenburg-Vorpommern under presidency of Dr. Krey.

According to the German law (TierSchG) approval by a named review board was not required.

### 2.3.2 Animals and tissues

For the feeding experiment using either a fat diet (FD; 18% fat), a high fat diet (HFD; 80% fat) or a normal fat diet (ND; 3.3% fat), male and female NMRI mice were housed and bred at the mouse facility of the FBN, Dummerstorf, Germany. Mice were housed in a semi-barrier system. Air was exchanged 12 times per hour and coarsely filtered. The room temperature was between 22.4 and 22.7° C, humidity between 50 and 60% and a 12L:12D light cycle was applied. Before starting the feeding experiments, NMRI mice were fed with standard rodent diet (V1534-0: protein 19.0%, fat 3.3%, raw fibre 4.9%, ash 6.4%, metabolizable energy: 12.8 MJ/kg; Ssniff, Soest, Germany) and water *ad libitum* until the age of 40 days. The FD (C1057: protein 17.6%, fat 18.0%, raw fibre 3.8%, ash 5.9%,

metabolizable energy: 17.2 MJ/kg) was produced by Altromin (Lage, Germany) and the HFD (E15149-30: protein 8.0%, fat 79.2%, raw fibre 5.0%, ash 4.5%, metabolizable energy: 28.6 MJ/kg) by Ssniff (Soest, Germany). Age matched animals on normal fat diet ND were used as control (Table 2.1 and Figure 2.1). The different fat diets were given to experimental animals for one week *ad libitum*, animals were sacrificed, white (gonadal fat) and brown fat tissues, skeletal muscle tissue (*Musculus quadriceps femoris*) and heart muscle tissue were taken and shock frozen in liquid nitrogen.

Different tissues from the mouse strains DU6/DU6i (genetically obese) and DUKs/DUKsi (lean control) were used for the experiments (Table 2.1 and Figure 2.1). The mouse strain DU6 was established by selection for high body weight. The mouse strain DUKs is an unselected, randomly mated control line<sup>17</sup>. Lines DU6i and DUKsi are inbred lines split from DU6 and DUKs in generation 79 and then full-sib mated for 41 generations. DU6/DU6i and DUKs/DUKsi lines were bred at the mouse facility of the FBN, Dummerstorf, Germany (see above and reviewed in<sup>16,17</sup>). Fixed formula food for laboratory mice (AltrominR 1314: protein 22.5%, fat 5%, raw fibre 4.5%, ash 6.5%, metabolizable energy: 12.5 MJ/kg, Altromin GmbH, Lage, Germany) was supplied *ad libitum* and fresh tap water was provided. For tissue isolation, male and female animals were sacrificed at day 45 *post natum* (*p.n.*; male DU6i/DUKsi and female DU6/DUKs mice) and day 100 *p.n.* (male and female DU6/DUKs mice), tissue samples were obtained as described before (Figure 2.1). From DUKsi male mice at day 45 additionally liver and pancreas were taken. Samples of tissues described above were stored at -80°C and used for RNA isolation, as described below.



**Table 2.1 - Mouse models used in this study.**

Values are expressed as mean +/-SD; “-“ indicates that data are not available.

mouse line	model	special treatment	from generation (m/f)	age (days) at section	sex (n)	mean BW at section (g)
NMRI		fat diet FD: 18% fat		48	male (12)	34.27 +/- 2.24
					female (11)	25.22 +/- 1.54
		high fat diet HDF: 80% fat		48	male (6)	-
					female (6)	-
NMRI		normal fat diet ND: 3.3% fat		48	male (6)	33.87 +/- 1.47
					female (6)	27.38 +/- 2.41
DU6	selection line: obese line		137 (0/10)	45	female (10)	64.40 +/- 3.24
			133 (5/5)	100	male (15)	104.95 +/- 14.67
			137 (10/10)	100	female (15)	82.17 +/- 8.57
DUKs	control line: normal line		137 (0/10)	45	female (10)	25.03 +/- 2.69
			133 (5/5)	100	male (15)	37.41 +/- 2.57
			137 (10/10)	100	female (15)	35.81 +/- 4.85
DU6i	selection line: obese line	inbreeding for the last 47 generations	126 (12)	45	male (12)	63.18 +/- 5.46
DUKsi	control line: normal line	inbreeding for the last 47 generations	126 (12)	45	male (12)	28.98 +/- 1.93

### 2.3.3 RNA isolation and reverse transcription

For RNA isolation from white (gonadal fat) and brown fat tissues, RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used. Tissue pieces of 30-50 mg were cut, immediately placed into 1 ml of QIAzol Lysis reagent, homogenized for 20 seconds using a rotor-stator homogenizer and further treated according to the manufacturer's protocol. RNA from *Musculus quadriceps femoris* and heart was extracted with RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. DNase treatment for all sample types was performed using RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany).

RNA was quantified by spectrophotometry and used for reverse transcription (500 ng RNA/reaction). Reverse transcription was performed using Omniscript® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using a poly-dT primer, according to the manufacturer's protocol.

#### 2.3.4 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Gene expression was quantified by qPCR using QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol in an MX4000 light cycler (Stratagene Inc, La Jolla, Canada). 1 µl of cDNA was used per reaction; reactions were performed in duplicates. The cycling program consisted of an initial pre-heating step at 95°C for 15 min, followed by 40 three-step cycles: 15 s at 95°C, 30 s at 58°C and 30 s at 72°C. Specificity of the reaction was assessed by melting curves from 55°C to 95°C. No-template controls were included to all reactions to confirm absence of contaminations. Primers used for qPCR, their annealing temperatures ( $T^{\circ}an$ ) and amplification efficiencies are listed in Additional file 2.1. Primers for mouse housekeeping genes were purchased from RealTimePrimers (RealTimePrimers.com, Elkins Park, PA, USA). Amplification

efficiencies (E) for each primer pair were estimated using formula:  $E = 10^{\frac{1}{slope} - 1}$ , where slope of standard curve built on serial 10-fold dilutions is used<sup>18,19</sup>.

The data were analyzed using efficiency-corrected  $\Delta\Delta Ct$  method of relative quantification (see<sup>20,21</sup> and MX4000 instructions, Stratagene).

To minimize mistakes caused by improper normalization, expression of genes of interest was normalized against the geometric mean of multiple normalizers (Additional file 2.1) using recommendations of Vandesompele *et al.* (2002) and GeNorm software, cited in there<sup>20</sup>. The primers used for NMRI mice were ACTb, B2M and PPIA, for the genetic models we used ACTb, GUSb and PPIA for normalization.

#### 2.3.5 Statistical analysis

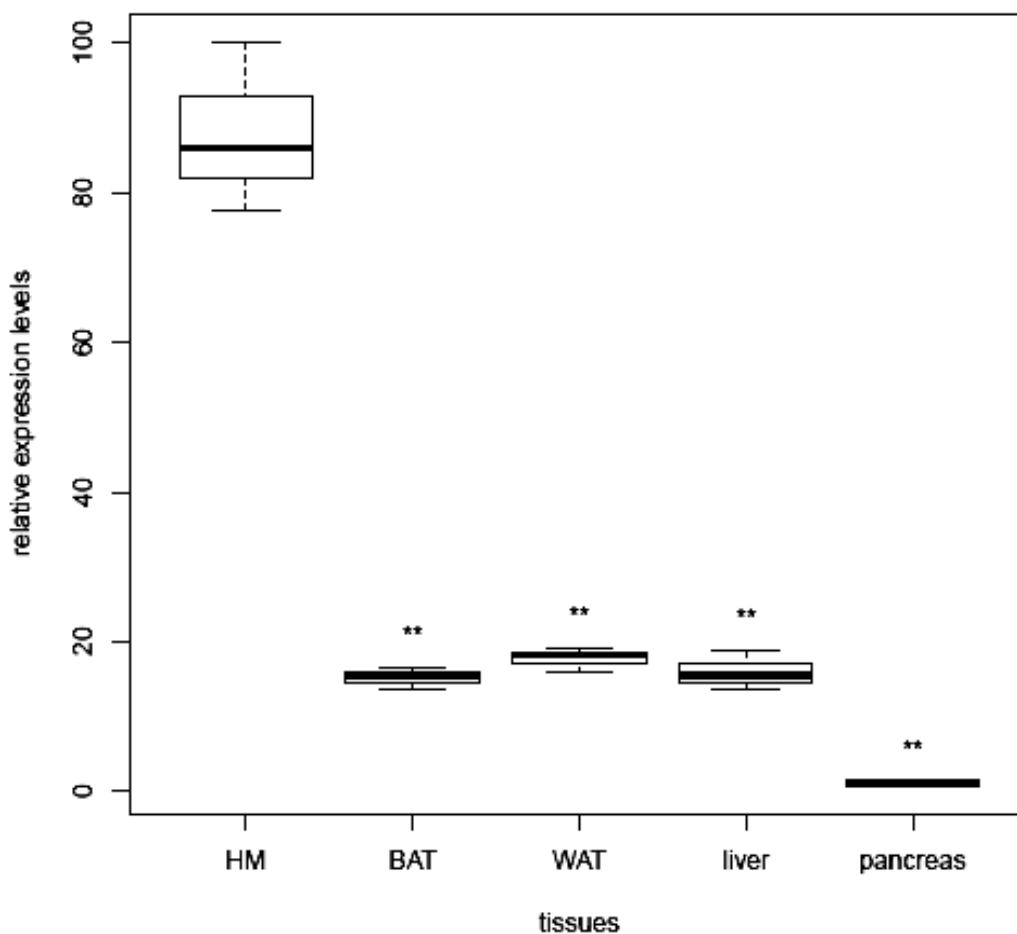
All the expression data from qPCR of metabolically challenged mice were normalized with housekeeping genes and calibrated to reference mice. Normalized data were analyzed using Welch Two Sample t-tests for independent samples. We inspected whether the null hypothesis that the true difference in group means, i.e. animal group of interest vs. related control group, equals zero can be rejected at the significance level of 5%. The tests were conducted in a two-sided fashion but in case of significance also for the specific alternative hypotheses, i.e. true difference in group means being greater than zero or less, respectively. The differences were considered significant in case of  $p < 0.05$ , highly significant if  $p < 0.01$  and highest significant if  $p < 0.001$ . The t-tests and graphic constructions were performed using the software R<sup>22</sup>.

ANOVA was performed with further normalized data based on control animals, i.e. raised under normal dietary condition and DUKs(i) strains respectively, to prove influences of diet, tissue type and sex on *DOR* expression levels in different mouse models<sup>23</sup>.

## 2.4 Results

### 2.4.1 *DOR* expression in different tissue types

*DOR* is highly transcribed in some insulin-sensitive tissues like skeletal and heart muscle, while expression is lower in others like WAT<sup>9</sup>. In pools from RNA of twelve 45 day old lean male DUKsi mice, *DOR* expression levels of heart muscle (HM), brown adipose tissue (BAT), white adipose tissue (WAT), liver tissue and pancreas tissue were measured by qPCR. We reconfirmed that *DOR* transcription is highest in heart muscle (Figure 2.2). The expression of *DOR* in WAT, BAT and liver is significantly lower ( $p < 0.01$ ) and equates approximately 20% to the expression in heart muscle. Additionally, *DOR* expression in pancreas corresponds approximately to 1.5% of the *DOR* expression in heart muscle ( $p < 0.01$ ).



**Figure 2.2: *DOR* expression levels in different tissues.**

*DOR* expression levels were measured in different tissues of twelve 45 days old lean male DUKsi mice by qPCR. Expression levels of brown adipose tissue (BAT), white adipose tissue (WAT), liver tissue and pancreas tissue were normalized to expression of *DOR* in heart muscle (HM; \*\*  $p < 0.01$ ).

## 2.4.2 DOR expression in models of obesity

*DOR* expression and its changes in different tissues in models of obesity were investigated in two systems: in FD and HFD mice and in young and adult mice in a genetic system (Table 2.1 and Figure 2.1).

### 2.4.2.1 DOR expression in FD/HFD mice

In order to investigate changes in *DOR* expression caused by high fat diet, 40 day old NMRI mice were fed with two different fat diets (FD: 18% fat or HFD: 80% fat) for one week. After one week of feeding, weights of the animals did not differ significantly from starting values (Table 2.2). It is noteworthy that food consumption in FD was generally lower than in ND, with females gaining less weight in FD, which is in accordance to other studies<sup>24</sup>. Caloric intake in males was identical between ND and FD feeding, while female caloric intake declined in FD (Table 2.2). Weight data for HFD animals are not available.

**Table 2.2 – Overview of Changes in body weight and food consumption in NMRI mice.**

Changes in body weight (BW), food consumption (FC) and food consumption expressed as kilo Joule (FC (kJ)) in NMRI mice fed a normal diet (ND; 3.3% fat) or fat rich diet (FD; 18% fat) for one week; values are expressed as mean +/-SD.

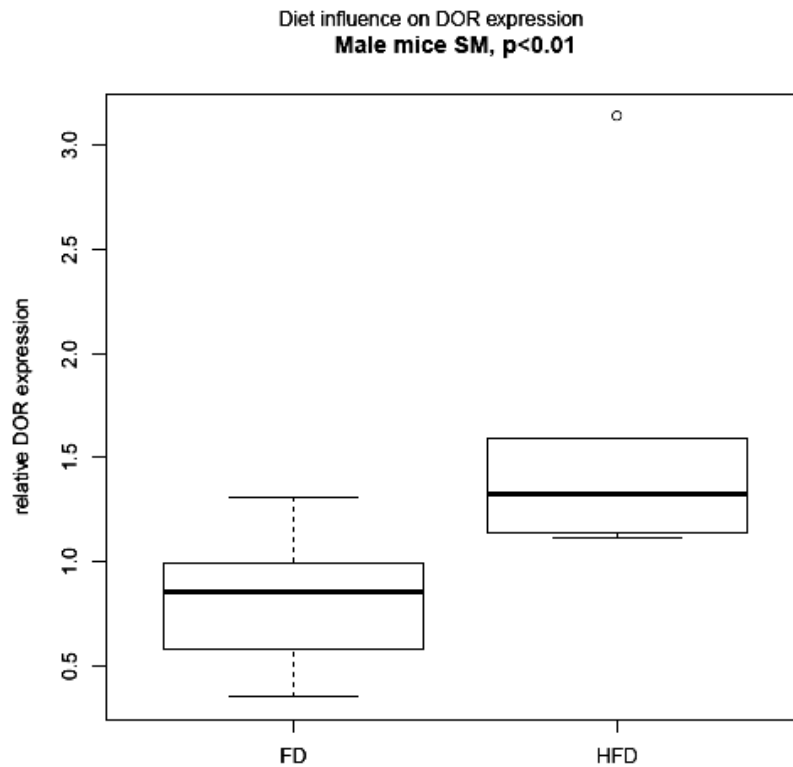
diet	sex (n)	mean BW (g)		changes in BW (g)	FC (g)	FC (kJ)
		day 1	day 8			
FD 18% fat	male (6)	32.02	34.27	+ 2,25	35.47	610.03
		+/- 2.47	+/- 2.24	+/- 0.62	+/- 2.71	+/- 46.63
FD 18% fat	female (6)	25.62	25.22	- 0.40	28.28	486.47
		+/- 1.51	+/- 1.54	+/- 1.98	+/- 3.54	+/- 60.96
ND 3.3% fat	male (6)	32.92	33.87	+ 0.95	48.07	615.25
		+/- 1.30	+/- 1.47	+/- 0.79	+/- 6.20	+/- 79.40
ND 3.3% fat	female (6)	25.58	27.38	+ 1.80	41.98	537.39
		+/- 1.46	+/- 2.41	+/- 1.24	+/- 6.52	+/- 83.46

At the age of 48 days, *DOR* expression was assessed by qPCR in white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). Additionally, expression levels were measured in skeletal muscle (SM) and heart muscle (HM), as shown in Figure 2.1. *DOR* expression levels were compared to expression levels in the respective tissues of control animals. After feeding the animals with 18% fat (FD) *ad libitum* for one week, in WAT statistically significant up-regulation of *DOR* was detected in males (n = 7; p < 0.05). Similar changes were observed in HM of females (n = 11; p < 0.05) (Additional file 2.2).

Feeding the 80% fat diet (HFD) led to more prominent changes in *DOR* expression in WAT of HFD females, with a significant down-regulation of expression (n = 6; p < 0.01). HFD diet led to a significant increase of *DOR* expression in HM of males (n = 6; p < 0.05). In

BAT and SM of male and female mice, changes in *DOR* expression were not statistically significant (Additional file 2.2).

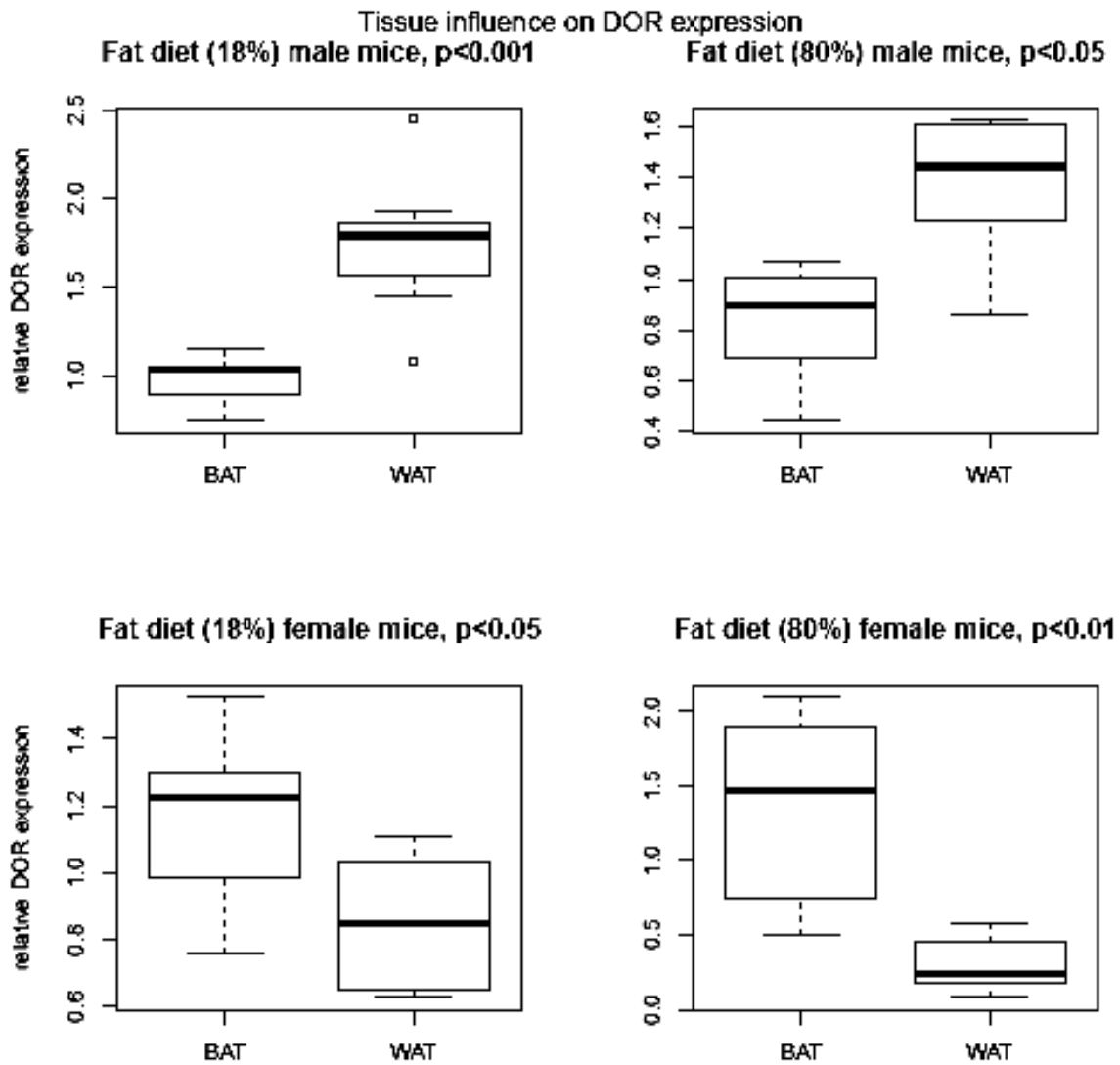
Influences of diet, tissue type and sex on *DOR* expression were tested by ANOVA. For diet, there was a general effect on *DOR* expression detected for WAT and BAT ( $p < 0.05$ ) (Table 2.3). Additionally, diet has a significant influence on *DOR* expression in SM of male mice ( $p < 0.01$ ) (Figure 2.3). The expression levels of *DOR* were higher in HFD- than in FD- fed animals.



**Figure 2.3 – Influence of diet on *DOR* expression in SM of male mice.**

Influence of different fat rich diets (FD = 18% fat content; HFD = 80% fat content) over one week *ad libitum* on *DOR* expression was proved by ANOVA. We found significant influence of diet in SM of male mice in FD and HFD animals (normalized to control animals). Changes in *DOR* expression in comparison to control animals were more prominent in HFD mice.

In FD and HFD animals, tissue type also influenced *DOR* expression (Figure 2.4). *DOR* mRNA levels were higher in WAT than in BAT of male animals ( $p < 0.05$ ). In female mice, *DOR* expression was higher in BAT ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2.4 – Influence of tissue type on *DOR* expression in mice fed a high fat diet.**

Influence of adipose tissue type (BAT and WAT) on *DOR* expression was proved by ANOVA. We found significant influence of tissue type in male and female mice in FD and HFD animals (normalized to control animals). In male mice, *DOR* expression was higher in WAT while in female animals the expression levels were higher in BAT.

Additionally, a general effect was detected for HM and SM ( $p < 0.01$ ) (Table 2.3). In male FD mice *DOR* expression was higher in HM than SM ( $p < 0.05$ ) (Additional file 2.4).

**Table 2.3 – ANOVA results, general effects of diet, tissue weight and sex in metabolically challenged mice.**

“NS” indicates that effects are not significant.

	adipose tissue (BAT/WAT)		muscle tissue (SM/HM)	
	factor	p-value	factor	p-value
<b>FD/HFD mice</b>	diet	0.024470	diet	NS
	tissue	NS	tissue	0.00372
	sex	0.007940	sex	NS
<b>genetically obese mice (100 days old)</b>	tissue	NS	tissue	NS
	sex	0.0438	sex	0.02

An influence of sex on *DOR* expression was detected for BAT and WAT ( $p < 0.01$ ), which was stronger than the influence of diet. In WAT of FD animals, *DOR* expression was significantly higher in male mice than in female ones ( $p < 0.001$ ) (Figure 2.5).

#### **2.4.2.2 *DOR* expression in DU6/DU6i and DUKs/DUKsi mice**

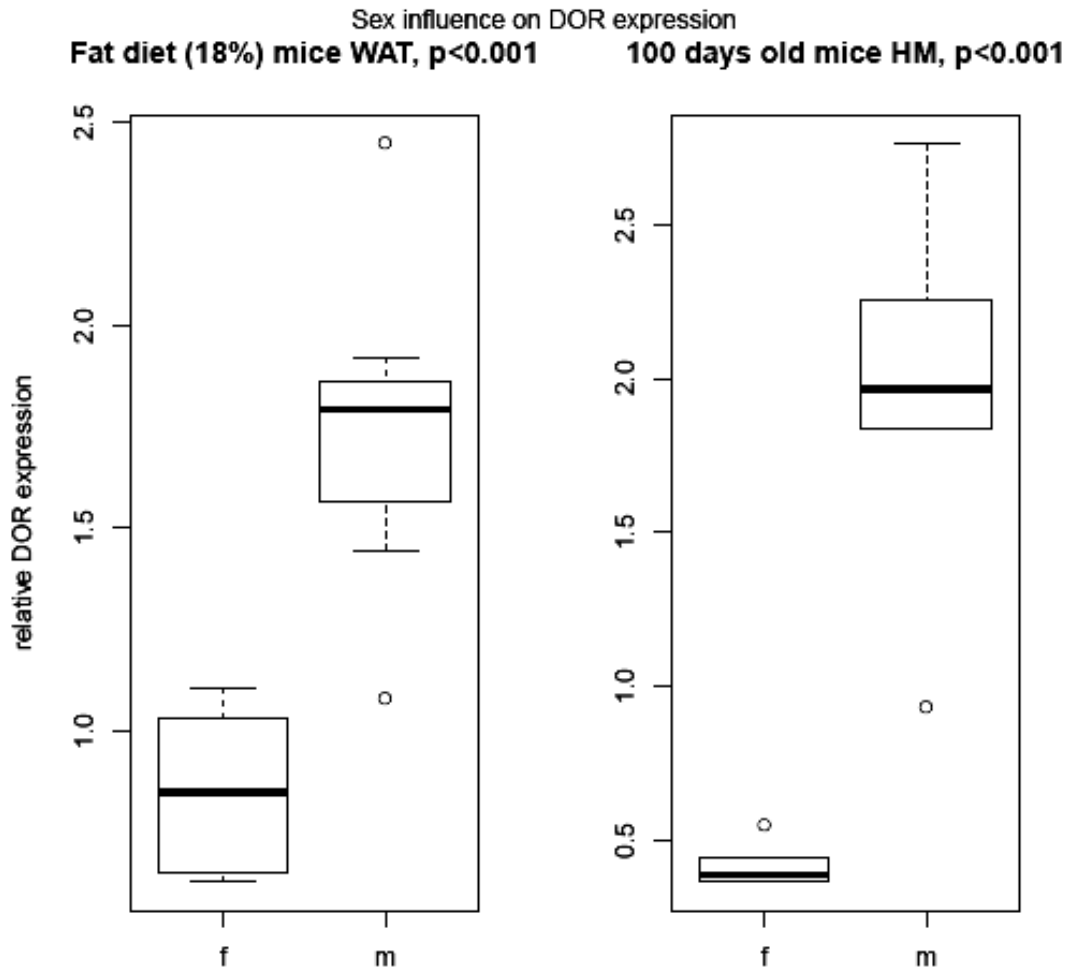
Four mouse lines were used for this part of the study. Two of them, long-term selected for increased body weight (DU6/DU6i), served as models for genetically predisposed obesity. The other strains (DUKs/DUKsi) were bred as normal weight controls (see<sup>16,17</sup>, Figure 2.1 and Table 2.1).

*DOR* expression was determined in WAT, BAT, SM and HM in male and female animals at day 45 *p.n.* and day 100 *p.n.*, corresponding to juvenile (day 45 *p.n.*) and adolescent (day 100 *p.n.*) life phases. Expression levels in DU6/DU6i were compared to DUKs/DUKsi mice in tissues of age and sex matched groups (Additional file 2.4).

In 45 day old male animals, *DOR* mRNA levels were significantly lower in HM of obese (DU6i) mice compared to normal weight (DUKsi) ones ( $n = 12$ ;  $p < 0.05$ ). Conversely, in 100 day old animals, *DOR* was expressed significantly higher in HM of male obese DU6 mice ( $n = 5$ ;  $p < 0.05$ ).

In BAT, *DOR* expression was higher in obese 100 days old female DU6 animals compared to normal weight DUKs ones ( $n = 5$ ;  $p < 0.05$ ). In WAT and SM of male and female DU6/DU6i mice, no statistically significant difference in expression was found.

Influences of sex and tissue type on *DOR* expression were tested by ANOVA. A general influence of sex on *DOR* expression was detected for all tissues ( $p < 0.05$ ) (Table 2.3). In HM of 100 days old animals, *DOR* expression was significantly higher in male animals than female ones ( $p < 0.001$ ) (Figure 2.5).



**Figure 2.5 – Influence of sex on *DOR* expression in WAT and HM of metabolically challenged mice.**

Influence of sex on *DOR* expression in different tissues was proved by ANOVA. We found significant influence of sex in WAT of FD mice and in HM of 100 days old DU6 animals (normalized to control animals). In both cases, *DOR* expression was higher in male than female mice.

In genetically obese animals, tissue type influenced *DOR* expression only in WAT and BAT of 45 day old male mice (Additional file 2.5). *DOR* expression was higher in WAT than in BAT ( $p < 0.01$ ).

## 2.5 Discussion

Based on the fact that *DOR* is drastically down-regulated in SM of obese diabetic Zucker *fa/fa* rats and modulates expression of TH controlled genes<sup>9</sup>, we investigated *DOR* expression in FD/HFD fed mice and genetically obese mice in different tissues. Here we show that *DOR* expression varies under the influence of fat content of diet, tissue type and sex. In our analysis we investigated early effects on *DOR* expression in the FD and HFD model and long-term effects in the genetic models.



### 2.5.1 Influence of dietary fat content on *DOR* expression

In this study, we measured *DOR* expression after one week of FD or HFD and notably *DOR* expression levels already displayed significant changes in WAT and HM. In general, effects were stronger in HFD mice than in FD mice in SM of male animals (Figure 2.3). In WAT and BAT we demonstrated an effect of diet in male and female mice. This might indicate that *DOR* plays a role in fighting negative effects of lipotoxicity or high fat diets in general, influencing thyroid hormone action or modulating autophagy. The description of an increase in serum levels of thyroid hormones in rats fed with a high fat diet, published by Araujo *et al.* (2010), promotes this theory<sup>24</sup>. Additionally, Bastemir *et al.* (2007) found higher thyroid hormone serum levels in obese than in lean women<sup>25</sup>.

However, it remains to be investigated if *DOR* expression is changed in preadipocytes of the stromavascular fraction (SVF) which can be stimulated to develop into mature adipocytes. It cannot be ruled out that *DOR* expression is changed in SVF influencing the growth of fat pads. This hypothesis is supported by the fact that mutations in *TRα1*, the predominant TH receptor type in adipocytes, leads to changes in the size of different fat pads<sup>26,27</sup>.

In rats fed a HFD for 8 weeks, circulating T3 and T4 levels were not elevated<sup>24</sup>. The activity of deiodinase D1, on the other hand, was increased slightly, while activity of D2, which converts T4 into the biologically much more active T3, was either similar to the control group or showed reduced activity in BAT. However, increased serum TSH levels were associated with up-regulation of thyroid function as observed by increased iodide uptake and D1 activity. A shift toward fat oxidation was observed, which depended mainly on the nutrient composition of the diet.

Rather than changed T4 or T3 levels in serum, transport, processing and modulation of signaling seem to be the driving forces behind the effects of TH. Modulation of TH signaling can be exerted by co-activators/co-repressors or proteins competing with T3 for binding sites on responsive promoters. *PPARγ*, for instance, was shown to be down-regulated within hours following TH administration<sup>28</sup>. Since PPAR and TR proteins bind to similar DNA sequences, depletion of *PPARγ* might facilitate binding of TR to these sites<sup>29</sup>. As *DOR* interacts with *TRα1* competing with its preferred bonding partner RXR, it also might modulate genomic response to T3 signaling in the early phase of HFD *in vivo*.

### 2.5.2 Influence of tissue type on *DOR* expression

In FD and HFD animals, we detected a significant influence of tissue type on *DOR* expression (Figure 2.4). In male animals, *DOR* expression was higher in WAT than in BAT, while in female mice *DOR* expression was higher in BAT than in WAT.

Thyroid hormone is an important factor for cold-induced thermogenesis<sup>30</sup> and TH supports the effects of norepinephrine on UCP1 expression and brown adipocyte recruitment<sup>31</sup>.

Furthermore, T3 has a positive effect on mitochondrial biogenesis<sup>32</sup>. On the other, hand, it was shown that HFD does not alter circulating T3 levels but rather the local availability of T3, as discussed above. Up-regulation of *DOR* in adipose tissue might contribute to increased mitochondrial biogenesis and energy expenditure by increasing the effects of local T3.

In comparison of metabolically challenged mice to reference animals, it is a very interesting finding that *DOR* is up-regulated in male and female heart muscle when fed a FD or HFD (Additional file 2.2). In the genetic model, *DOR* expression is down-regulated in the heart muscle of DU6i males at day 45 *p.n.*, up-regulated in DU6 males at day 100 *p.n.* and not altered in females (Additional file 2.4). TH plays an important role in cardiac mitochondrial biogenesis thus increasing myocardial mitochondrial mass, respiration, OXPHOS enzyme activity, protein synthesis and others (summarized in<sup>33</sup>). In the heart, TR $\alpha$  is the predominant form. Hyperthyroidism leads to increased metabolic rate and increased mitochondrial biogenesis by up-regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins<sup>34</sup>.

*DOR* up-regulation in FD and HFD animals might be part of an early defense system against effects of lipotoxicity by increasing mitochondrial activity and metabolic rate.

In the FD and HFD, as well as the genetic mouse model, no expression changes were detected in SM, neither in male nor in female animals (Additional file 2.2 and 2.4). *DOR*, however, was shown to be down-regulated in SM of obese type 2 diabetes *fa/fa* rats, before<sup>9</sup>. We propose that physiological changes conferred by diabetes rather than the obese condition lead to down-regulation of *DOR*. This needs confirmation by measuring *DOR* in diabetic animals.

### 2.5.3 Influence of sex on *DOR* expression

In this study, we discovered effects of sex on *DOR* expression in fat tissue of the diet model and in all tissues of the genetic model. In the diet model, the effect of sex was stronger than the effect of diet (Table 2.3). Male FD mice showed a significant higher *DOR* expression in WAT than female animals (Figure 2.5). In the genetic model we found a similar difference in 100 day old obese mice in HM (Figure 2.5).

Nearly all common diseases exhibit some degree of sex bias, often being very dramatic<sup>35</sup>. The distribution of fat displays a sexual polymorphism with females depositing relatively more fat in subcutaneous/inguinal depots whereas males deposit more fat in the intra abdominal (summarized in<sup>36</sup>). Also properties of adipocytes differ between fat depot and sex. In a study by Macotela *et al.* (2009), male GAT adipocytes were 60% larger than

those from females<sup>37</sup>. These findings indicate that gene expression needs to be fine-tuned between diverse fat depots in male and female individuals. There are several studies confirming this hypothesis. Yang *et al.* (2006) compared gene expression in various tissues in 334 mice. They detected thousands of genes to be sexually dimorphic in muscle and fat tissue<sup>35</sup>. These genes exhibited highly tissue-specific patterns of expression and were enriched for distinct pathways<sup>36</sup>. Sexual dimorphisms were also detected for gene expression in C57/Bl6 mice fed a high fat diet for 12 weeks<sup>36</sup>. Most of the genes were up- or down-regulated depending on the fat depot; only 138 genes were commonly regulated in both sexes. For skeletal muscle, the most obvious sexual dimorphism is the greater muscle mass in men<sup>38</sup>.

## **2.6 Conclusions**

In summary, control of *DOR* expression is shown to exhibit complex regulation and to depend on dietary fat content, tissue type and sex. *DOR* might exert important effects on the function of certain tissues by gene regulation or via autophagy and counteract adipogenesis in high fat diets or obesity. Further investigation into differential *DOR* expression in tissues where its expression was shown to vary with respect to obesity is necessary to uncover *DOR*'s role in metabolic diseases.

## **2.7 Authors' contributions**

CF-D participated in RNA isolation as well as statistical analysis and wrote the manuscript. OL carried out RNA isolation and qPCR analysis in white as well as brown adipose tissue and wrote parts of the manuscript. SvdH and LO performed statistical analysis under the supervision of TB. NB carried out RNA isolation and qPCR analysis in muscle tissue. SH, JB and FK participated in expression analysis in adipose and muscle tissue. UR housed, bred and sacrificed mice. AH, BB and TB co-developed the strategy and edited the manuscript. BGB conceived the project, supervised experiments, coordinated the project and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## 2.8 References

1. Obregon, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid* **18**, 185–195 (2008).
2. Laclaustra, M., Corella, D. & Ordovas, J. M. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **17**, 125–139 (2007).
3. Ukropec, J., Ukropcova, B., Kurdiova, T., Gasperikova, D. & Klimes, I. Adipose tissue and skeletal muscle plasticity modulates metabolic health. *Archives of Physiology and Biochemistry* **114**, 357–368 (2008).
4. Gesta, S., Tseng, Y.-H. & Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**, 242–256 (2007).
5. Du, M., Yan, X., Tong, J. F., Zhao, J. & Zhu, M. J. Maternal Obesity, Inflammation, and Fetal Skeletal Muscle Development. *Biology of Reproduction* **82**, 4–12 (2010).
6. Dyck, D. J., Heigenhauser, G. J. F. & Bruce, C. R. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol (Oxf)* **186**, 5–16 (2006).
7. Karjalainen, J., Tikkanen, H., Hernelahti, M. & Kujala, U. M. Muscle fiber-type distribution predicts weight gain and unfavorable left ventricular geometry: a 19 year follow-up study. *BMC Cardiovasc Disord* **6**, 2 (2006).
8. Lu, C. & Cheng, S.-Y. Thyroid hormone receptors regulate adipogenesis and carcinogenesis via crosstalk signaling with peroxisome proliferator-activated receptors. *Journal of Molecular Endocrinology* **44**, 143–154 (2010).
9. Baumgartner, B.G., Orpinell, M., Duran, J., Ribas, V., Burghardt, H.E., Bach, D., Villar, A.V., Paz, J.C., González, M., Camps, M., Oriola, J., Rivera, F., Palacín, M. & Zorzano, A. Identification of a Novel Modulator of Thyroid Hormone Receptor-Mediated Action. *PLoS ONE* **2**, e1183 (2007).
10. Grover, G. J., Mellström, K. & Malm, J. Therapeutic potential for thyroid hormone receptor-beta selective agonists for treating obesity, hyperlipidemia and diabetes. *Curr Vasc Pharmacol* **5**, 141–154 (2007).
11. Linares, G.R., Xing, W., Burghardt, H., Baumgartner, B., Chen, S.-T., Ricart, W., Fernandez-Real, J.-M., Zorzano, A. & Mohan, S. Role of Diabetes and Obesity Related Protein (DOR) in the Regulation of Osteoblast Differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E40-E48 (2011).
12. Malik, I.A., Baumgartner, B.G., Naz, N., Sheikh, N., Moriconi, F. & Ramadori, G. Changes in gene expression of DOR and other thyroid hormone receptors in rat liver during acute-phase response. *Cell Tissue Res* **342**, 261-272 (2010).
13. Mauvezin, C., Orpinell, M., Francis, V.A., Mansilla, F., Duran, J., Ribas, V., Palacín, M., Boya, P., Teleman, A.A. & Zorzano, A. The nuclear cofactor DOR regulates autophagy in mammalian and *Drosophila* cells. *EMBO Rep* **11**, 37–44 (2010).
14. Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M. & Jin, S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 19860–19865 (2009).
15. Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S. & Hotamisligil, G. S. Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell Metab* **11**, 467–478 (2010).
16. Brockmann, G. A., Haley, C. S., Renne, U., Knott, S. A. & Schwerin, M. Quantitative trait loci affecting body weight and fatness from a mouse line selected for extreme high growth. *Genetics* **150**, 369–381 (1998).
17. Brockmann, G.A., Kratzsch, J., Haley, C.S., Renne, U., Schwerin, M. & Karle, S. Single QTL effects, epistasis, and pleiotropy account for two-thirds of the phenotypic F(2) variance of growth and obesity in DU6i x DBA/2 mice. *Genome Res* **10**, 1941–1957 (2000).
18. Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J. & Day, M. J. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *J Immunol Methods* **286**, 203–217 (2004).

19. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**, 95–125 (2006).
20. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3** (7), research0034.1–0034.11 (2002).
21. Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. & Paul, C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 1827–1831 (1992).
22. R Development Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. **1**, ISBN 3–900051–07–0
23. Chambers, J., Freeny, A. & Heiberger, R. Analysis of variance; designed experiments. *Statistical Models in S* (1992).
24. Araujo, R.L., Andrade, B.M., Padrón, A.S., Gaidhu, M.P., Perry, R.L.S., Carvalho, D.P. & Ceddia, R.B. High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology* **151**, 3460–3469 (2010).
25. Bastemir, M., Akin, F., Alkis, E. & Kaptanoglu, B. Obesity is associated with increased serum TSH level, independent of thyroid function. *Swiss Med Wkly* **137**, 431–434 (2007).
26. Liu, Y.-Y., Schultz, J. J. & Brent, G. A. A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J Biol Chem* **278**, 38913–38920 (2003).
27. Ying, H., Araki, O., Furuya, F., Kato, Y. & Cheng, S.-Y. Impaired adipogenesis caused by a mutated thyroid hormone alpha1 receptor. *Mol Cell Biol* **27**, 2359–2371 (2007).
28. Weitzel, J.M., Hamann, S., Jauk, M., Lacey, M., Filbry, A., Radtke, C., Iwen, K.A.H., Kutz, S., Harneit, A., Lizardi, P.M. & Seitz, H.J. Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats. *J. Mol. Endocrinol.* **31**, 291–303 (2003).
29. Weitzel, J. M. & Iwen, K. A. Coordination of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* **342**, 1–7 (2011).
30. Ueta, C. B., Olivares, E. L. & Bianco, A. C. Responsiveness to Thyroid Hormone and to Ambient Temperature Underlies Differences Between Brown Adipose Tissue and Skeletal Muscle Thermogenesis in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity. *Endocrinology* **152**, 3571–3581 (2011).
31. Hernández, A. & Obregón, M. J. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* **278**, E769–777 (2000).
32. Weitzel, J. M., Iwen, K. A. H. & Seitz, H. J. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol* **88**, 121–128 (2003).
33. Marín-García, J. Thyroid hormone and myocardial mitochondrial biogenesis. *Vascul Pharmacol* **52**, 120–130 (2010).
34. Tanaka, T., Morita, H., Koide, H., Kawamura, K. & Takatsu, T. Biochemical and morphological study of cardiac hypertrophy. Effects of thyroxine on enzyme activities in the rat myocardium. *Basic Res Cardiol* **80**, 165–174 (1985).
35. Yang, X., Schadt, E.E., Wang, S., Wang, H., Arnold, A.P., Ingram-Drake, L., Drake, T.A. & Lusis, A.J. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res* **16**, 995–1004 (2006).
36. Grove, K. L., Fried, S. K., Greenberg, A. S., Xiao, X. Q. & Clegg, D. J. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *Int J Obes (Lond)* **34**, 989–1000 (2010).
37. Macotela, Y., Boucher, J., Tran, T. T. & Kahn, C. R. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes* **58**, 803–812 (2009).

38. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91**, 1447–1531 (2011).

## 2.9 Additional files

### Additional file 2.1 - Primers used in the study for qPCR.

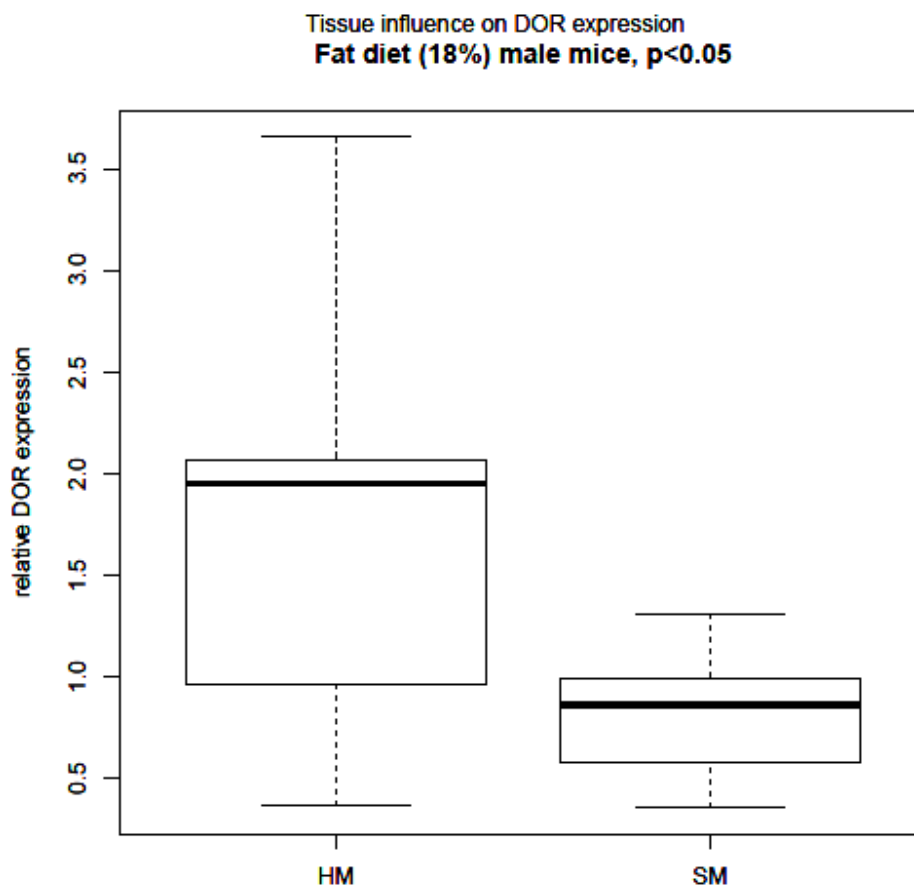
Sequences of primers used in this study for qPCR with their annealing temperatures (T°an) and amplification efficiencies.

gene	forward primer (5' → 3' direction)	reverse primer (5' → 3' direction)	T°an	efficiency %
<b>ACTb</b> (Beta-actin, cytoplasmic)	GGGAAATCGTGCGTG ACATC	GCGGCAGTGGCCATC TC	58°C	99.5
<b>B2M</b> (Beta-2 microglobulin)	GCCTGTATGCTATCC AGAA	GAAAGACCAGTCCTT GCTGA	58°C	96.0
<b>DOR (TP53INP2)</b> (transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2)	AACCACAGCCTGCTT CTAATACCTT	TCAGCCAGTCTCAAC ACAAAACAC	58°C	96.1
<b>GUSb</b> (Beta-glucuronidase)	AATGAGCCTTCCTCT GCTCT	AACTGGCTATTCAGCT GTGG	58°C	97.6
<b>PPIA</b> (Peptidylprolyl isomerase A)	AGCTCTGAGCACTGG AGAGA	GCCAGGACCTGTATG CTTTA	58°C	104.1

**Additional file 2.2 - Changes in *DOR* expression in mice fed a fat rich diet (FD/HFD).**

40 days old NMRI mice kept at standard conditions were administered with either a fat diet (FD; 18% fat) or a high fat diet (HFD; 80% fat) for 1 week. Control group animals received a normal fat diet (ND; 3.3% fat) during all time of the experiment. *DOR* expression in fat and muscle tissues was quantified by qPCR. All the expression data from qPCR were normalized with housekeeping genes. Normalized data of FD and HFD mice were compared to those of ND animals using Welch Two Sample t-tests for independent samples. "up/down" indicates differences in *DOR* expression of FD and HFD mice in comparison to control animals with respective p-values. "-" indicates that differences were not significant. "n" indicates the number of animals in each group.

<b>tissue</b>	<b>diet</b>	<b>sex</b>	<b>p-value (up/down )</b>	<b>n</b>
<b>white adipose tissue (WAT)</b>	FD	male	0.0138 (up)	7
		female	0.5972 (-)	6
	HFD	male	0.1324 (-)	6
		female	0.001926 (down)	6
<b>brown adipose tissue (BAT)</b>	FD	male	0.8365 (-)	7
		female	0.3171 (-)	6
	HFD	male	0.2411 (-)	6
		female	0.4017 (-)	6
<b>skeletal muscle (SM)</b>	FD	male	0.5845 (-)	12
		female	0.3768 (-)	10
	HFD	male	0.09653 (-)	6
		female	0.1368 (-)	6
<b>heart muscle (HM)</b>	FD	male	0.2164 (-)	11
		female	0.02009 (up)	11
	HFD	male	0.01602 (up)	6
		female	0.381 (-)	6



**Additional file 2.3 – Influence of tissue type on *DOR* expression in male mice fed a fat rich diet (FD, 18% fat content).**

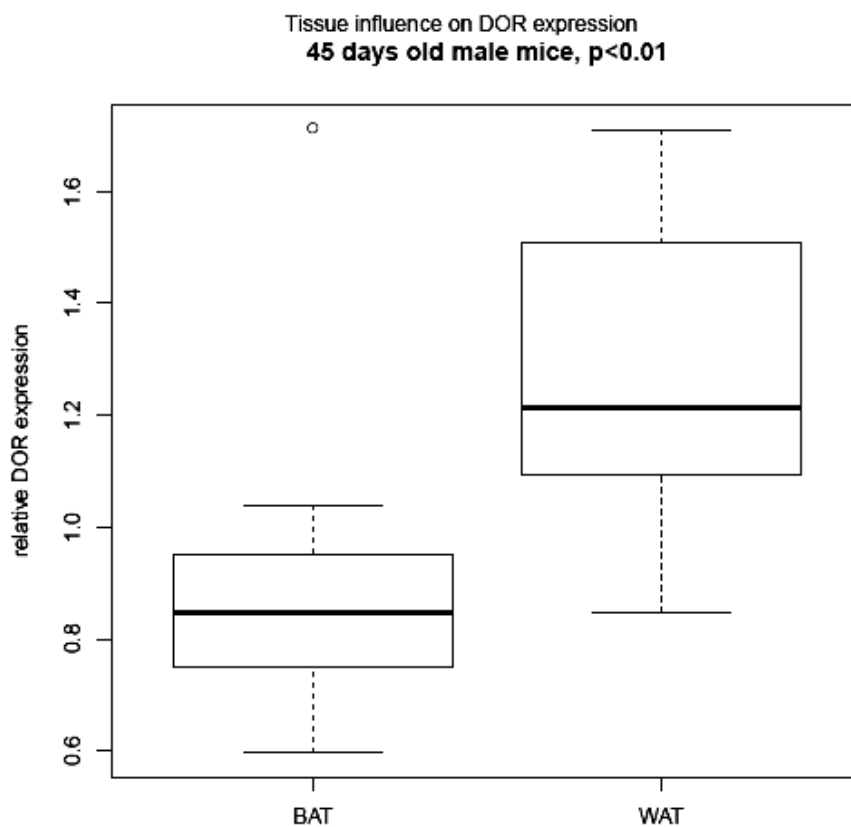
Influence of muscle tissue type (HM and SM) on *DOR* expression was proved by ANOVA. We found significant influence of tissue type in male mice in FD animals (normalized to control animals). *DOR* expression was higher in HM than in SM.



**Additional file 2.4 - DOR expression in fat and muscle tissues of genetically obese mice.**

*DOR* expression was quantified by qPCR in fat and muscle tissues of genetically obese (DU6/DU6i) and normal (DUKs/DUKsi) mice of both sexes at the age of 45 or 100 days *post natum* (*p.n.*). All the expression data from qPCR were normalized with housekeeping genes. Normalized data of DU6/DU6i were compared to those of DUKs/DUKsi mice using Welch Two Sample t-tests for independent samples. “up/down” indicates differences in *DOR* expression of DU6/DU6i mice in comparison to control animals with respective p-values. “-” indicates that differences were not significant. “n” indicates the number of animals in each group.

<b>tissue</b>	<b>age days</b>	<b>mouse</b>	<b>sex</b>	<b>p-value</b>	<b>n</b>
	<i>p.n.</i>	<b>strains</b>		<b>(up/down)</b>	
<b>white adipose tissue (WAT)</b>	45	DU6i	male	0.06815 (-)	12
		DU6	female	0.1478 (-)	10
	100	DU6	male	0.4699 (-)	5
		DU6	female	0.06361 (-)	5
<b>brown adipose tissue (BAT)</b>	45	DU6i	male	0.3987 (-)	10
		DU6	female	0.2317 (-)	8
	100	DU6	male	0.6844 (-)	5
		DU6	female	0.01531 (up)	5
<b>skeletal muscle (SM)</b>	45	DU6i	male	0.5517 (-)	12
		DU6	female	0.9541 (-)	10
	100	DU6	male	0.4895 (-)	5
		DU6	female	0.08204 (-)	5
<b>heart muscle (HM)</b>	45	DU6i	male	0.01678 (down)	12
		DU6	female	0.6918 (-)	10
	100	DU6	male	0.02344 (up)	5
		DU6	female	0.1294 (-)	5



**Additional file 2.5 – Influence of tissue type on *DOR* expression in 45 days old male DU6i mice.**

Influence of adipose tissue type (BAT and WAT) on *DOR* expression was proved by ANOVA. We found significant influence of tissue type in 45 days old male DU6i mice (normalized to DUKsi mice). *DOR* expression was higher in WAT than in BAT.

### **3. Manuskript „Translationskontrolle“**

#### **Novel polysome messages and changes in translational activity appear after induction of adipogenesis in 3T3-L1 cells**

**Carolin Fromm-Dornieden<sup>1</sup>, Silvia von der Heyde<sup>2</sup>, Oleksandr Lytovchenko<sup>1</sup>, Gabriela Salinas-Riester<sup>3</sup>, Bertram Brenig<sup>1</sup>, Tim Beissbarth<sup>2</sup>, Bernhard G. Baumgartner<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Veterinary Medicine, University of Göttingen, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen, Germany

<sup>2</sup>Statistical Bioinformatics, Department of Medical Statistics, University Medical Center, Humboldtallee 32, 37073 Göttingen, Germany

<sup>3</sup>DNA Microarray Facility, University of Göttingen, Department of Developmental Biochemistry, Humboldtallee 23, 37073 Göttingen, Germany

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Metabolic Diseases and Medical Molecular Biology, Paracelsus Private Medical University Salzburg, Müllner Hauptstr. 48, 5020 Salzburg, Austria

### **3.1 Abstract**

#### **3.1.1 Background**

Control of translation allows for rapid adaptation of the cell to stimuli, rather than the slower transcriptional control. We presume that translational control is an essential process in the control of adipogenesis, especially in the first hours after hormonal stimulation. 3T3-L1 preadipocytes were cultured to confluency and adipogenesis was induced by standard protocols using a hormonal cocktail. Cells were harvested before and 6 hours after hormonal induction. mRNAs attached to ribosomes (polysomal mRNAs) were separated from unbound mRNAs by velocity sedimentation. Pools of polysomal and unbound mRNA fractions were analyzed by microarray analysis. Changes in relative abundance in unbound and polysomal mRNA pools were calculated to detect putative changes in translational activity. Changes of expression levels of selected genes were verified by qPCR and Western blotting.

#### **3.1.2 Results**

We identified 43 genes that shifted towards the polysomal fraction (up-regulated) and 2 genes that shifted towards free mRNA fraction (down-regulated). Interestingly, we found Ghrelin to be down-regulated. Up-regulated genes comprise factors that are nucleic acid binding (eIF4B, HSF1, IRF6, MYC, POLR2a, RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa, TSC22d3), form part of ribosomes (RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa), act on the regulation of translation (eIF4B) or transcription (HSF1, IRF6, MYC, TSC22d3). Others act as chaperones (BAG3, HSPA8, HSP90ab1) or in other metabolic or signals transducing processes.

#### **3.1.3 Conclusions**

We conclude that a moderate reorganisation of the functionality of the ribosomal machinery and translational activity are very important steps for growth and gene expression control in the initial phase of adipogenesis.

### 3.2 Background

White adipose tissue (WAT) plays an important role in homeostasis by storing and releasing triglycerides and by releasing many hormonal factors called adipokines such as leptin or adiponectin. High caloric intake leads to the expansion of WAT by an increase of adipocyte numbers (hyperplasy), by expanding the volume of existing adipocytes (hypertrophy) or a combination of both<sup>1</sup>. In order to understand, which mechanisms drive hypertrophic or hyperplastic obesity, we need to understand the mechanisms controlling growth and differentiation of adipocytes.

Many factors have already been identified, mainly by RNA analysis, which regulate cell fate and control the transformation of preadipocytes into mature adipocytes. This process confers massive changes in the structure of the cell, which leads to storage of fat and the formation of fat vacuoles. The orchestrated changes in the structure of the preadipocyte require tight control of the involved factors.

An extensively studied model for adipogenesis *in vitro* is the mouse embryonic fibroblast cell line 3T3-L1<sup>2-4</sup>. 3T3-L1 cells are grown to confluency and among stimulation with a hormone cocktail consisting of insulin, dexamethasone and isobutylmethylxanthine (IBMX), cells re-enter cell cycle within 24 to 36 h. Two rounds of cell division are performed after which they permanently withdraw from the cell cycle, begin to accumulate lipid, and undergo terminal differentiation into mature adipocytes. Until recently, regulating mechanisms of the earliest step in the differentiation process are poorly understood in comparison to later stages of adipogenesis.

The orchestrated changes in the expression of structural proteins require changes in the expression and activity of factors controlling the expression of structural proteins. Induction of adipogenesis by hormones leads to the expression of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  within 2 hours<sup>5</sup>, which activate the expression of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  at low levels. PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  activate each others' expression in a positive feedback loop that promotes and maintains the differentiated state<sup>6</sup>. The latter proteins orchestrate the changes in gene expression typical for mature adipocytes. Besides the C/EBP family and PPAR $\gamma$ , many other factors are known that play a role in adipogenesis. Most of these factors are regulated on the transcriptional level and mRNA steady state levels can be easily measured. However, there is increasing evidence that proteins, which are controlled at the translational level, are of uttermost importance for adipogenesis and other cellular processes. A handful of translationally controlled proteins has been characterized in adipogenesis up to now. The C/EBP factors C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  are regulated at the

posttranscriptional level, whereupon various isoforms arise from a unique mRNA by differential initiation of translation<sup>7</sup>. In 3T3-L1 cells, high eIF2 and eIF4E activity shifts the ratio of C/EBP isoforms expression toward more truncated isoforms<sup>7</sup>. An important factor that controls adipogenesis at the translational level is HZF<sup>8</sup>. HZF enhances translation of *C/EBP $\alpha$*  mRNA by binding to its 3'-untranslated region. Knock-down of HZF disrupts adipogenesis.

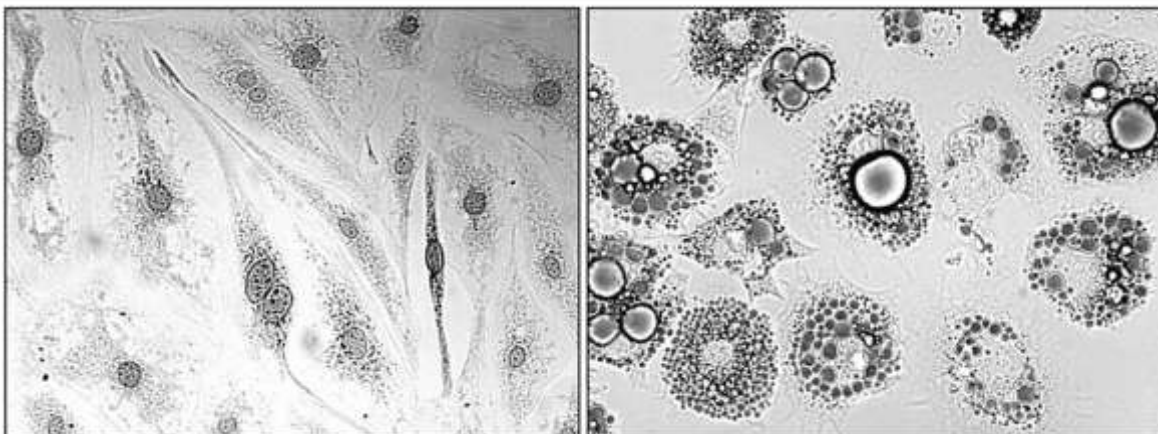
In most cases, translation efficiency is closely related to ribosomal association of the respective mRNA. The degree of ribosomal association can be easily measured by separation of the mRNAs in a sucrose gradient by velocity sedimentation<sup>9</sup>. The gradient is fractionated, mRNA is isolated from each fraction and the ratio of the 28S/18S rRNA is used to determine the fractions containing free RNA (no ribosomes bound) and polysomal RNA<sup>10</sup>. By use of microarrays, the composition of the RNA pools can be determined easily<sup>11,12</sup>.

We used velocity sedimentation and microarray analysis to identify mRNAs that change in ribosomal association during the first 6 hours after hormonal induction of adipogenesis of 3T3-L1 cells and assessed changes of translational activity by Western blotting of some candidate genes.

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Adipogenesis

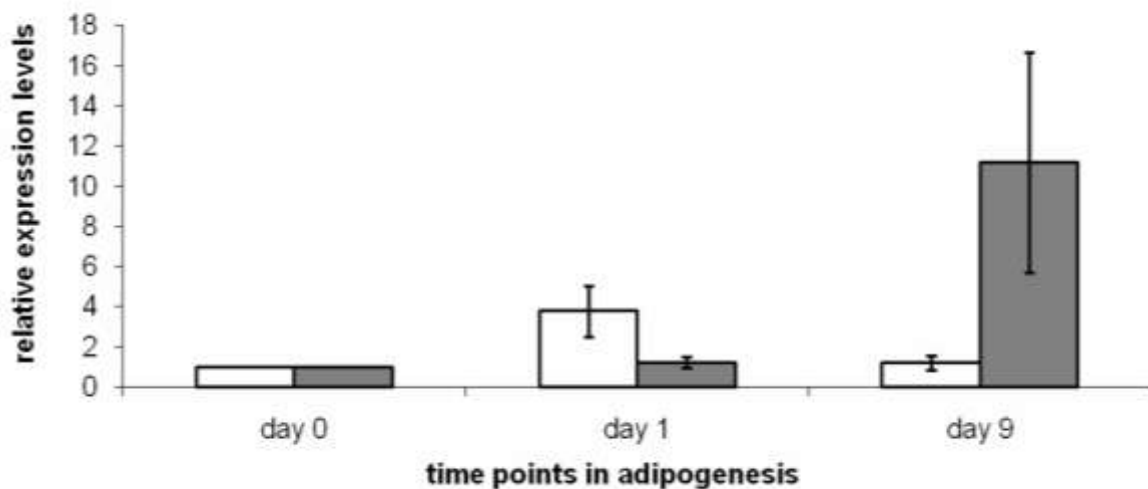
Adipogenesis was assessed microscopically by Oil Red O staining (Figure 3.1). In comparison to the fibroblastic phenotype of preadipocytes, mature adipocytes' phenotype is round and cells accumulate lipid droplets in the cytoplasm.



**Figure 3.1: Microscopical control of adipogenesis.**

In comparison to the fibroblastic phenotype of 3T3-L1 preadipocytes (left picture), mature adipocytes' phenotype (right picture) is round and cells accumulate lipid droplets in the cytoplasm. 3T3-L1 cells two days before hormonal induction (left picture) were stained with *Coomassie blue*. Cells nine days after hormonal induction (right picture) were stained with *Oil Red O* (400x magnification).

Additionally, adipogenesis was assessed by the analysis of mRNA steady state levels of *C/EBP $\beta$*  and *PPAR $\gamma$*  by means of q-PCR in total RNA at time points day 0, 1 and 9. Ct-values were calibrated to day 0, normalized with  $\beta$ Actin, (mean of 3 experiments with 3 replicates each, n=9). *C/EBP $\beta$*  was up-regulated 3times at day 1 and back to base levels at day 9. *PPAR $\gamma$*  was up-regulated at day 9, no significant change of mRNA steady state levels were detected at day 1 (Figure 3.2). These data confirm correct adipogenesis<sup>13</sup>.



**Figure 3.2: Molecular control of adipogenesis**

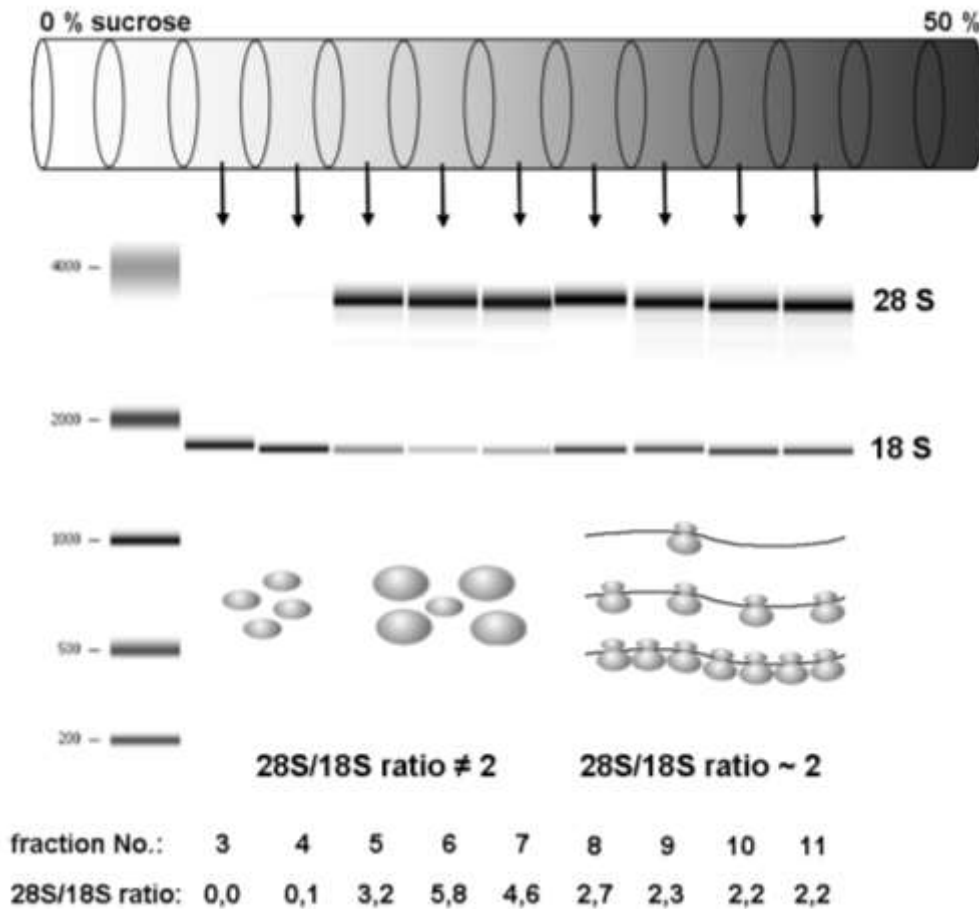
Analysis of mRNA steady state levels of *C/EBP $\beta$*  (empty boxes) and *PPAR $\gamma$*  (filled boxes) by means of q-PCR in total RNA at time points 0, 0+6h and 9 days. Ct-values were calibrated to day 0, normalized with  $\beta$ Actin, (mean of 3 experiments with 3 replicates each, n = 9). *C/EBP $\beta$*  was up-regulated 3times at 0+6h and back to base levels at day 9. *PPAR $\gamma$*  was up-regulated at day 9, no significant change of mRNA steady state levels were detected at day 0+6h. Standard deviation s are shown by error bars.

### 3.3.2 Velocity sedimentation and polysome analysis

We analyzed mRNA distribution in samples taken immediately before (0h) and 6 hours after hormonal stimulation (0h+6). 13 fractions of 1 ml each were collected from the top of the ultra centrifuged gradient. Stability of linear gradients was proved by refractive index of sucrose concentration (Additional Figure 3.1). The gradients showed high stability in fraction sucrose concentration.

After RNA isolation, the ratio of 28S to 18S rRNA was measured to determine the distribution of free RNA and polysomal RNA. Non-polysomal RNA shows 28S/18S ratios unequal to two, while polysomal fractions show 28/18S ratios close to two<sup>10</sup>. Fractions 5, 6 and 7 were pooled and considered as free RNA (Figure 3.3). Fractions 9, 10 and 11 were pooled and considered as polysomal RNA. Fraction 1 to 4 contained mainly buffer, remaining cell lysate and fat, fraction 12 and 13 contained cell debris. These fractions were

not used for ribosome profiling. Fraction 8 was not used in order to obtain a clear separation of polysomal and non-polysomal fractions.



**Figure 3.3: Sucrose gradient analysis**

Polysomal RNA (28S/18S ratio  $\sim 2$ ) was separated from non-polysomal RNA (28S/18S ratio  $\neq 2$ ) by sucrose gradient centrifugation. Ratio of 18S and 28S rRNA was measured to obtain the polysome profile on Agilent 2100 Bioanalyzer. Fractions 5 to 7 contain non-polysomal RNA and fractions 9 to 11 polysomal RNA.

### 3.3.3 Microarray analysis

Microarray analysis was performed according to standard protocols in three biological replicates (Agilent Technologies; Cat. No. G4122F; 41,000 genes represented)<sup>14</sup>. Expression levels were normalized to the spike values and the quality control revealed the expected clustering of fractions into polysomal and non-polysomal ones as well as clustering of time points (see methods). Data were submitted to GEO (accession number GSE29744). We identified 918 up-regulated and 20 down-regulated genes with a false discovery rate (fdr)  $< 0.05$  and with M-value ( $=\log_2(\text{fold change})$ )  $> 1$ . To exclude false positives from decreasing total mRNA steady state levels (relative increase in polysomal RNA versus free RNA after induction) only genes with values of  $p_6 > p_0$ ,  $p_6 > np_6$ ,  $np_6 < np_0$ ,  $p_0 < np_0$  were included in the analysis. For the present study, only genes with M-value  $> 2$  were considered. 43 genes showed highest abundance in polysomal fractions at time



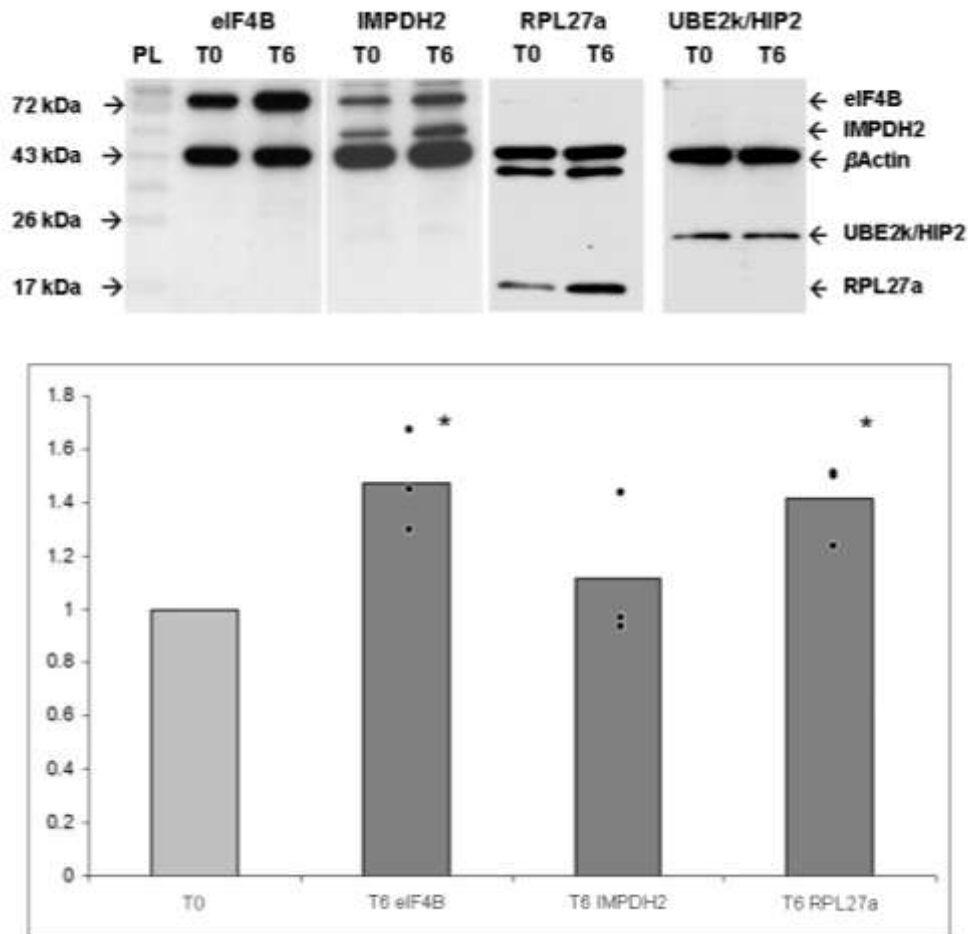
point 6h after hormonal induction and were identified as up-regulated (Additional Table 3.1). Two genes were identified as down-regulated with M-values  $< -2$ ,  $p_6 < p_0$  and  $p_0 > np_0$  (Additional Table 3.1). Determination of unchanged gene expression between  $(p_6-p_0)$  and  $(np_6-np_0)$  was based on two one-sided tests for equivalence gene-by-gene<sup>15,16</sup> in which a magnitude of 0.2 was chosen for the region of similarity and 27 genes fit these parameters (Additional Figure 3.2).

### 3.3.4 Quantitative Real Time-PCR (q-PCR)

In order to assess up-regulation of genes as determined by microarray analysis, we chose three up-regulated genes (*RPL27a*, *eIF4B* and *IMPDH2*) and one gene with unchanged mRNA (*UBE2k/HIP2*) for target verification by q-PCR. The RNA preparation used for q-PCR was the same as the one used for Agilent 2100 Bioanalyzer-analysis. q-PCR data confirmed microarray results. *RPL27a* was up-regulated 7.4 times in microarray analysis (MA) (fdr: 2.38E-07), and 13.8 times up-regulated in q-PCR (p-value: 0.0163). *eIF4B* was 7.2 times up-regulated in MA (fdr: 4.12E-07) and 8.3 times up-regulated (p-value: 0.1423) in q-PCR. *IMPDH2* was 6 times up-regulated in MA (fdr: 3.26E-07) and 12.2 times up-regulated (p-value: 0.073) in q-PCR. *UBE2k* was neither up nor down-regulated in MA (fdr: 0.013) or q-PCR. Hence, up-regulation of three randomly chosen genes was successfully confirmed by q-PCR (Additional file 3.3).

### 3.3.5 Western Blotting

To confirm up-regulation of protein levels of mRNAs identified in microarray assays and confirmed by q-PCR, 3T3-L1 cells were differentiated for 6 hours and protein levels were analyzed by western blotting. We analyzed protein levels of the three up-regulated genes *eIF4B*, *IMPDH2* and *RPL27a* and the unchanged gene *UBE2k* in three biological replicates, each biological replicate being performed twice. Changes in protein expression were quantified by densitometry and normalized with appropriate expression data of  $\beta$ Actin (Figure 3.4). *eIF4B* and *RPL27a* protein levels were 1.4 fold higher (t-test, p-value  $< 0.05$ ) at 0+6h than at 0h. *Impdh2* and *UBE2k/HIP2* showed no significant differences in protein levels between 0h and 0+ 6h after hormonal induction.



**Figure 3.4: Western blot results.**

3T3-L1 cells were differentiated with insulin, dexamethasone and IBMX. Protein was isolated from whole cell extracts 0h (T0) and 6h (T6) after hormonal induction. 30 µg of each sample was subjected to Western blot analysis for eIF4b, Impdh2, Rpl27a and Ube2k/HIP2 expression. Changes in protein expression were quantified by densitometry and normalized with appropriate expression data of  $\beta$ Actin. The values represent the average of three independent experiments, and the asterisk denotes a p-value < 0.05. eIF4b and Rpl27a protein expression is 1.4 fold higher (p-value < 0.05) at T6 than time point T0. Impdh2 and Ube2k/HIP2 show no significant differences in protein expression between T0 and T6.

### 3.3.6 Cluster analysis

We used PANTHER DB to classify genes into functional groups. For 5 of the 43 up-regulated mRNAs, no function is known. The known genes code for proteins that are nucleic acid binding - either RNA or DNA - (eIF4B, HSF1, IRF6, MYC, POLR2a, RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa, TSC22d3), form part of ribosomes (RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa), act on the regulation of translation (eIF4B) or transcription (HSF1, IRF6, MYC, TSC22d3), as chaperones (BAG3, HSPA8, HSP90ab1), nucleotidyl transferase (NMNAT2, POLR2a), amino acid transporter (SLC25a5, SLC25a30), kinase inhibitor (CDKN1c), aminoacyl-tRNA synthetase (SCYE1), peroxidase (LPO), oxidoreductase (IMPDH2, LPO, PLOD3), oxygenase (PLOD3) or hydrolase (AHCY, TBC1d22a) and peptide hormone (GHRL). PANTHER informations are shown in Additional Table 3.2.

### 3.4 Discussion

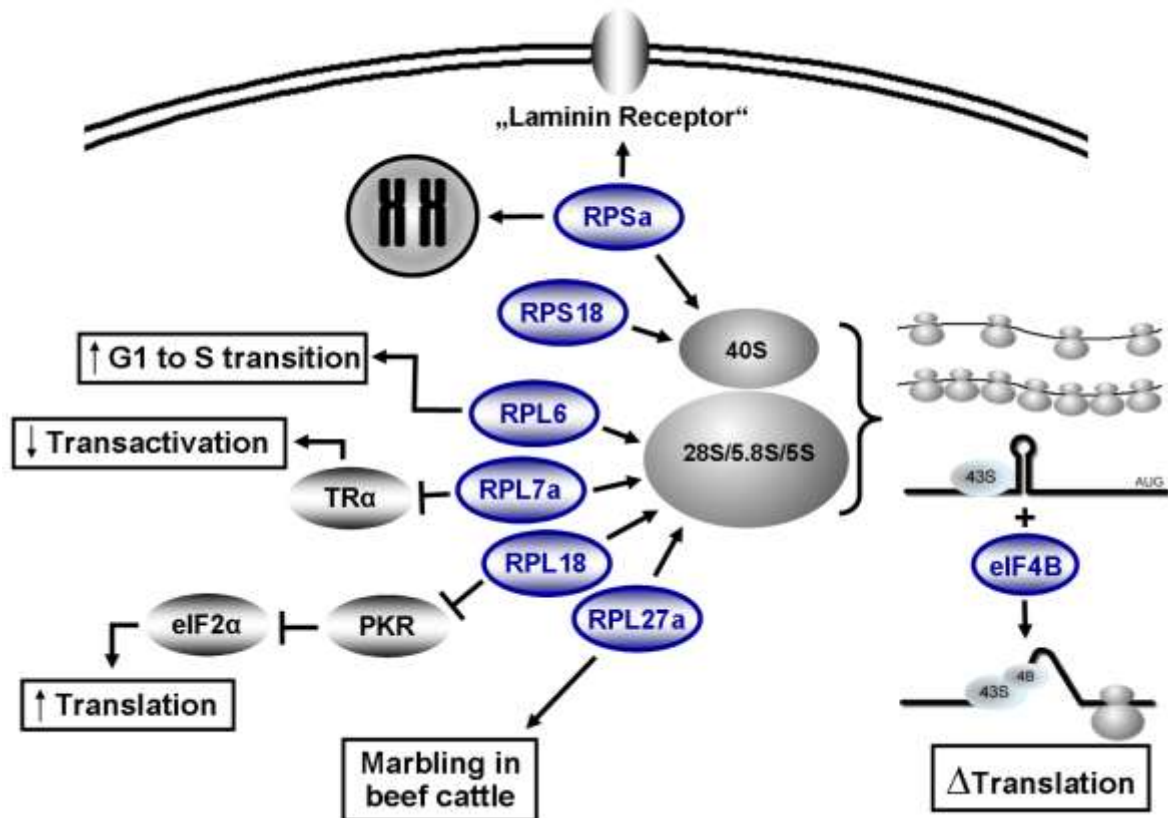
We analyzed the changes in the abundance of mRNAs in free or ribosome bound fractions from velocity sedimentation during the first hours of adipogenesis in 3T3-L1 mouse cells. We identified 43 genes that were significantly increased in the polysomal fraction at T6, and two genes with lower abundance (Additional Table 3.1) 6 hours after the induction of adipogenesis by administration of a hormone cocktail to the confluent cell culture. We confirmed MA data by q-PCR of three randomly chosen up-regulated genes. Finally, we analyzed protein levels of the three up-regulated genes *eIF4B*, *IMPDH2* and *RPL27a* and the unchanged gene *UBE2k/HIP2* (Figure 3.4). In Western blots, IMPDH2 protein levels were unchanged. It is subject to further investigation, if ribosomes on *IMPDH2* mRNA are stalled, protein levels increase later in the course of adipogenesis or if other mechanisms are employed to keep the protein levels unchanged. *eIF4B* and *RPL27a* levels were confirmed to be up-regulated and we assume that as a general rule, changes in translational activity is predicted by changes of ribosomal association as has been demonstrated before<sup>17</sup>.

There are several studies of transcriptional changes during adipogenesis and many factors have been identified that play an important role in this process. Burton *et al.* (2002) identified 286 clones with a greater than fivefold deviation of expression during the first 24 hours of adipogenesis<sup>5</sup>. In our study, none of these factors showed changes greater than fourfold with the exception of *c-Myc*. We conclude that analysis of translational activity is important for a full understanding of the processes controlling adipogenesis.

In the last few years, interest increased in the dynamics of the proteome and there is a handful of studies in man and mouse<sup>18-24</sup> about changes of the proteome, comparing preadipocytes and adipocytes in tissues, or later stages of adipogenesis. Here, we report changes as soon as 6 hours after hormonal induction of adipogenesis, a timepoint, at which clonal expansion of 3T3-L1 cells is induced and expression of mitotic and adipogenic genes is initiated.

3T3-L1 adipocytes are grown to confluency and upon stimulation with a hormone cocktail (insulin, dexamethasone and IBMX), post-confluent G<sub>0</sub> cells reenter one to two rounds of cell-cycle called mitotic clonal expansion (MCE)<sup>25</sup>. It has been proposed that MCE might facilitate the DNA remodeling for the adipogenesis gene expression program<sup>2</sup>. As 3T3-L1 cells reenter cell cycle by passing from G<sub>0</sub> to G<sub>1</sub> phase, it might be expected that the translation machinery is activated after hormonal stimulation. In fact, we detected a shift of mRNAs toward the higher molecular weight polysomal fractions, mostly derived from a general activation of gene expression. Expression of ribosomal proteins, ribosome assembly proteins and ribosomal RNA (rRNA) are up-regulated in mitotic active cells.

Hence it is not surprising that ribosomal proteins (RP) are prominent among the up-regulated proteins (compare Additional Table 1). Additionally, for some RPs, extraribosomal functions have been demonstrated. Many of these extraribosomal functions can be attributed to the regulation of cell cycle and for several RPs a role in cancer, promotion of cell growth or differentiation has been shown<sup>26</sup>. Some of these known extraribosomal functions might well explain the role of the RPs in the early phase of adipogenesis (Figure 3.5).



**Figure 3.5: Ribosomal and extraribosomal functions of the ribosomal proteins up-regulated in this study.**

Microarray results of polysomal fractions from 3T3-L1 cell lysate (6 h after hormonal induction) show that ribosomal proteins (RP) are prominent among the up-regulated genes. For some RPs, extraribosomal functions have been demonstrated. In the nucleus, RPSa binds to DNA by histone binding, in the cytoplasm it is associated with the 40S small ribosomal subunit and at the cell surface it acts as a receptor for various components<sup>34</sup>. *RPL6* over-expression promotes G1 to S phase transition of gastric cancer cells and promotes cell growth<sup>28</sup>. *RPL7a* interacts with the human thyroid hormone receptor and inhibits transactivation. Hyperthyroidism favours osteosarcoma cell growth and down-regulation of *RPL7a* might enhance sensitivity to TR and disrupt growth control<sup>61</sup>. *RPL18* was shown to inhibit autophosphorylation of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) and PKR mediated phosphorylation of the translation initiation factor eIF2α. Over-expression of *RPL18* reduced eIF2α phosphorylation and stimulated translation of a reporter gene *in vivo*<sup>31</sup>. A polymorphism in the promoter region of the *RPL27a* gene was associated with meat marbling in Japanese Black beef cattle<sup>32</sup>. These known extraribosomal functions might be important in early adipogenesis. Additionally an enhanced amount of RPs promotes an increase in translation process of adipocyte specific genes. In the beginning of translational process, the 43S ribosomal subunit scans mRNAs for start codons. Strong secondary structures inhibit processing of the complex on the mRNAs. eIF4B increases the helicase activity of the complex and allows translation mRNAs with strong secondary structures in the 5'UTR.

*RPL6* was initially identified as up-regulated in gastric multidrug-resistant cancer cells<sup>27</sup> and was shown to protect gastric cancer cells from drug-induced apoptosis. Furthermore, *RPL6* over-expression promotes G1 to S phase transition of gastric cancer cells and promotes cell growth<sup>28</sup> (Figure 3.5). *RPL7a* interacts with the human thyroid hormone receptor and inhibits transactivation. Thyroid hormone signalling stimulates adipogenesis<sup>29,30</sup> and up-regulation of *RPL7a* might participate in mitotic control. *RPL18* was shown to inhibit autophosphorylation of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) and PKR mediated phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$ . Over-expression of *RPL18* reduced eIF2 $\alpha$  phosphorylation and stimulated translation of a reporter gene *in vivo*<sup>31</sup>. Over-expression of *RPL18* is thought to promote protein synthesis and cell growth through inhibition of PKR activity<sup>31</sup>, which also might hold true for adipogenesis. A polymorphism in the promoter region of the *RPL27a* gene was associated with meat marbling (accumulation of intramuscular fat) in Japanese Black beef cattle<sup>32</sup>. Furthermore, *RPL27a* is ubiquitinated in a cell-cycle specific manner, leading to increased translational efficiency of the ribosomes<sup>33</sup>.

RPSa, which was up-regulated in our study, was previously known as 37-kDa laminin receptor precursor/67-kDa laminin receptor (LRP/LR). It has a number of functions depending on its subcellular localisation. In the nucleus, RPSa binds to DNA by histone binding, in the cytoplasm it is associated with the 40S small ribosomal subunit and at the cell surface it acts as a receptor for various components<sup>34</sup>. It confers an anti-obesity effect when stimulated by the green tea catechin EGCG<sup>35</sup>. Interestingly, RPSa inhibits insulin stimulation of 3T3-L1 mitogenesis and EGCG inhibited differentiation of preadipocytes to adipocytes<sup>36</sup>.

Most of the RPs up-regulated immediately after hormonal induction were shown to stimulate cell cycle which is concordant with the fact that 3T3-L1 cells undergo mitosis after stimulation. Translational control allows for rapid changes of protein redundancy and it may be speculated that proteins that initiate MCE and reprogramming of gene expression are regulated at the translational level. Therefore we suggest that the rapid increase of L6, L7a, L18, L27a, Sa, and S18 may reflect their importance of adipogenesis control in 3T3-L1 cells.

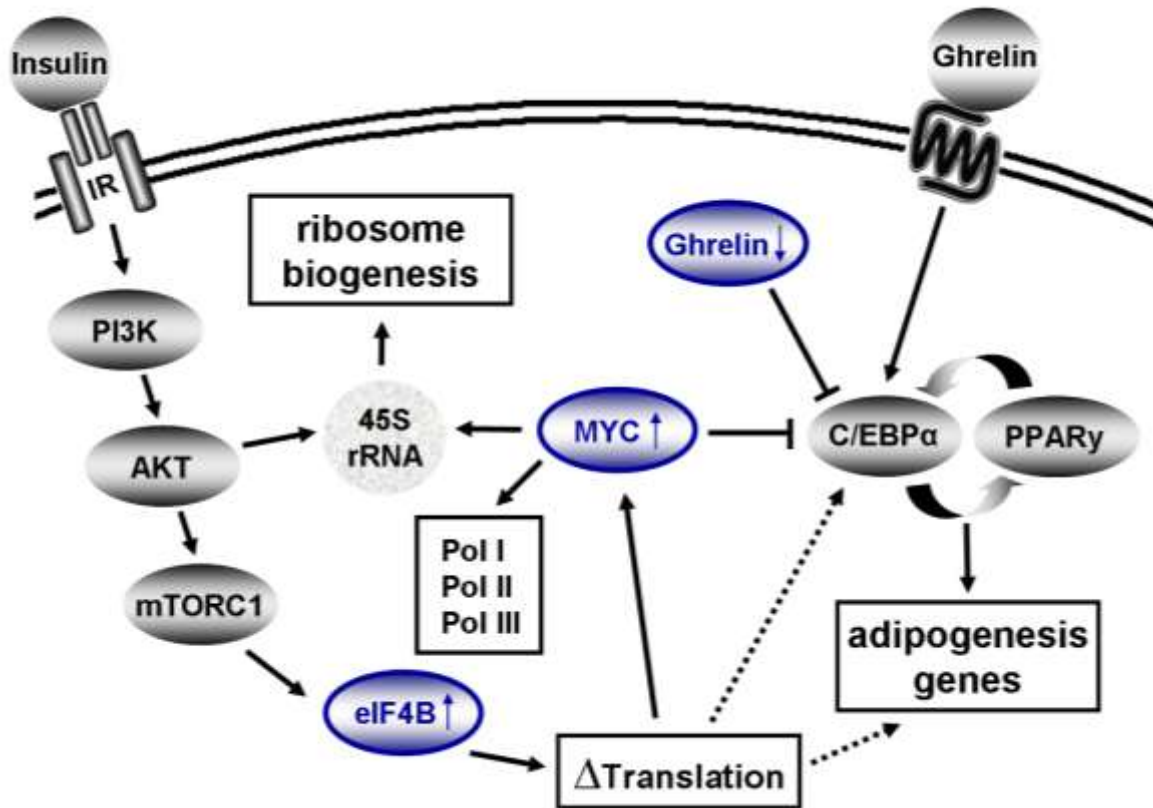
Higher translation rates require transport of amino acids, and we detected up-regulation of the amino acid transporters SLC25a5 and SLC25a30. Higher translation rates also lead to increased misfolding of nascent polypeptide chains. Up-regulation of chaperones in translation promoting conditions has been described before and was also observed in our study (BAG3, HSPA8, HSP90ab1).

The PI3K-AKT-mTOR pathway, which is stimulated by insulin, has been identified to be essential for many cellular processes (reviewed in<sup>37</sup>). mTORC1 is a protein complex containing mTOR (mammalian target of rapamycin) and raptor. mTORC1 activates S6K1, a kinase that promotes protein synthesis and cell growth by phosphorylation of multiple substrates including components of translation initiation or elongation such as ribosomal protein S6, eIF4B and eukaryotic elongation factor 2 kinase<sup>38</sup>. One target of this pathway is eIF4B (Figure 3.6) (reviewed in<sup>39</sup>). It was suggested that phosphorylation of eIF4B by S6 kinases, which are regulated by mTOR, stimulates its function. Indeed, this phosphorylation event favors recruitment of eIF4B into complexes with eIF3, which promotes the recruitment of ribosomes to the 5' end of the message (reviewed in<sup>40</sup>). eIF4B, which was up-regulated in our study, stimulates the RNA helicase activity of eIF4A in unwinding secondary structures in the 5'-untranslated regions (5'-UTR) of mRNAs<sup>41,42</sup>. By knock-down of eIF4B, selective reduction of translation was observed for mRNAs harboring strong to moderate secondary structures in their 5'-UTRs. These mRNAs code for proteins that function in cell proliferation (e.g. CDC25C, c-MYC) or cell survival (e.g. BCL-2). Silencing of *eIF4B* also leads to decreased proliferation rates and caspase-dependent apoptosis: eIF4B is required for cell proliferation and survival by regulating the translation of proliferative and prosurvival mRNAs<sup>43</sup>.

PPAR $\gamma$  expression is stimulated in response to mTORC1<sup>44</sup>. PPAR $\gamma$  is a key adipogenic factor and exogenous expression is sufficient to induce adipogenesis. Zhang *et al.* (2009) discuss the possibility that AKT and mTORC1 facilitate adipogenesis by up-regulation of PPAR $\gamma$  via regulation of FOXO1<sup>44</sup>. However, they do not discuss the activation of eIF4B upon mTORC1 activation with subsequent changes in the preference of ribosomes for certain mRNAs. We think that regulation of C/EBP $\alpha$  could possibly be explained by up-regulation of eIF4b activity, as members of the C/EBP family are regulated at the translational level (Figure 3.6).

*c-MYC* over-expression in cycling cells has been reported to block exit from the cell cycle, accelerate cell division, and increase cell size (reviewed in<sup>45</sup>). When *c-MYC* levels are high, 3T3-L1 adipoblasts are locked in a proliferation-competent state and normal differentiation can not be activated. Persisting high levels of *c-MYC* can inhibit the expression of genes that promote adipogenesis namely *C/EBP $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$ 2* and therefore prevent terminal differentiation of preadipocytes to mature adipocytes<sup>46,47</sup>. In microarray analysis, *c-MYC* was up-regulated in 3T3-L1 cells several hours after hormonal induction in a study by Burton *et al.* (2002)<sup>5</sup> and at day 2 of differentiation in a study by Kim *et al.* (2007)<sup>48</sup>. *c-MYC* is an important regulator of ribogenesis, as it activates Pol I, Pol II and Pol III leading to activation of expression of rRNA, tRNA, ribosomal proteins, initiation

factors of translation and other cell cycle relevant genes<sup>49</sup>. Therefore, c-MYC activation might be important for activation of the translation apparatus at the entry of 3T3-L1 cells into G<sub>1</sub>.



**Figure 3.6: Schematic overview of the pathway controlling translational changes in adipogenesis.**

The PI3K/AKT/mTORC1 pathway, which is stimulated by insulin, leads to activation of eIF4B, which changes preferences in translation activity<sup>38</sup>. Regulation of C/EBPα could possibly be explained by up-regulation of eIF4b activity, as members of the C/EBP family are regulated at the translational level (dashed line). Additionally an increase in Translation of adipogenesis genes mediated by eIF4B is thinkable (dashed line).

*c-MYC* over-expression in cycling cells has been reported to block exit from the cell cycle, accelerate cell division, and increase cell size (reviewed in<sup>45</sup>). When *c-MYC* levels are high, 3T3-L1 adipoblasts are locked in a proliferation-competent state and normal differentiation can not be activated. Persisting high levels of *c-MYC* can inhibit the expression of genes that promote adipogenesis namely *C/EBPα* and *PPARγ2* and therefore prevent terminal differentiation of preadipocytes to mature adipocytes<sup>46,47</sup>. *c-MYC* is an important regulator of ribogenesis, as it activates Pol I, Pol II and Pol III<sup>49</sup>. As a supplement in media, Ghrelin promotes the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes by increasing the mRNA levels of *PPARγ* and *C/EBPα*<sup>52</sup>. Ghrelin mRNA over-expressing 3T3-L1 cells, on the other hand, demonstrated significantly attenuated differentiation of preadipocytes into adipocytes<sup>53</sup>. Down-regulation of Ghrelin levels in the early phase of adipogenesis fits the known facts indicating a role of decreased endogenous Ghrelin levels in promoting adipogenesis).

Microarray results of polysomal fractions from 3T3-L1 cell lysate (6 h after hormonal induction) show up-regulation of eIF4B and MYC (arrow head on top) and down-regulation of Ghrelin (arrow head below).

IR, insulin receptor; Pol I/II/III, RNA polymerase I/II/III

In our study, two genes were down-regulated: *IFIT1* and ghrelin/obestatin prepropeptide (referred to as Ghrelin). The members of the *IFIT* gene family are silent in most cell types, but are activated by e.g. interferons<sup>50</sup>. IFIT proteins are considered silencers of translation and down-regulation might be another factor of translation stimulation.

Ghrelin has been described as a pro-adipogenic factor released by the gut and is involved in control of food intake, energy metabolism and cytokine secretion (reviewed in<sup>51</sup>). Treatment of 3T3-L1 preadipocytes with Ghrelin significantly increases the mRNA levels of *c-MYC*, and induces the transition from G1 to S<sup>52</sup>. As a supplement in media, Ghrelin promotes the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes by increasing the mRNA levels of *PPAR $\gamma$*  and *C/EBP $\alpha$* <sup>52</sup> (Figure 3.6). Ghrelin mRNA over-expressing 3T3-L1 cells, on the other hand, demonstrated significantly attenuated differentiation of preadipocytes into adipocytes<sup>53</sup>. In the recent study we found Ghrelin ~ 6 times down-regulated in polysomal fractions of 3T3-L1 cells six hours after hormonal induction. Down-regulation of Ghrelin levels in the early phase of adipogenesis fits the known facts indicating a role of decreased endogenous Ghrelin levels in promoting adipogenesis.

### **3.5 Conclusions**

We have analyzed changes in translational control at 6 hours after induction of adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and detected 43 translationally up-regulated and two down-regulated mRNAs with a minimal change of 4 fold. The alternatively regulated mRNAs play roles in cell cycle control, control of transcription, control of translation, energy supply, protein folding, amino acid transport and other cellular processes. A large number of RPs is up-regulated in the first hours of adipogenesis. Many RPs play a special role in cell cycle regulation and expression control of genes and mRNAs that are required for the differentiation process. Most of the nucleic acid binding factors we detected bind to RNA and play a role for ribosome function or translation control. We conclude that after stimulation of adipogenesis, translation control changes and forms a new layer of control which might be, at least in part, self-regulating. The changes in translation might come from changed properties of ribosomes in response to hormonal stimulation and from increased eIF4b activity. Further analysis of how protein levels of adipogenic genes are controlled will deepen our understanding of the complex steps during the initiation of adipogenesis and help further to develop strategies to inhibit fat cell accumulation.



## 3.6 Methods

### 3.6.1 Cells

3T3-L1 cells were ordered from HPACC and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; PAN) supplemented with 10% newborn bovine serum (c•c•pro), 25 mM HEPES (PAN) and 1% antibiotics (Penicillin/Streptomycin, c•c•pro) in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Absence of Mycoplasma was assessed by DAPI method on a regular basis. For differentiation, 3T3-L1 cells were cultured to confluence (day -2) and exposed to the differentiation mixture (DMEM, 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 1% antibiotics, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 1 µM dexamethasone, 5 µg/ml insulin; all from Sigma) two days later (day 0). After 48 h, medium was replaced by DMEM containing 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 1% antibiotics and 5 µg/ml insulin. At day 5, this medium was changed to medium without insulin and replaced at day 7 by fresh medium. The success of adipogenesis was proved by Oil Red O (Sigma) staining (Figure 3.1) and analysis of mRNA steady state levels of well known adipogenesis factors (*C/EBPβ* and *PPARγ*) with q-PCR (Power SYBR® Green PCR Master Mix, ABI)<sup>13</sup>, normalized with  $\beta$ Actin. Three biological replicates were used for further analysis (Figure 3.2).

### 3.6.2 Velocity sedimentation and polysome analysis

3T3-L1 cells were harvested at day 0 (T<sub>0</sub>, without hormonal induction) and 6 h after hormonal induction (T<sub>6</sub>). Cells were lysed mechanically in polysome buffer (300 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM PIPES pH 7.4), 0.5% NP40, 12U RNase Inhibitor (Roche) and 100 ng/ml Cycloheximide (Sigma). To separate polysomal RNA from non-polysomal RNA, linear sucrose gradients were built from polysome buffer with 0% to 50% sucrose concentration. Stability of linear gradients was proved with a refractometer (Type MHRB 90; Müller). Cell lysate was cooled on ice and layered onto gradients which were subjected to centrifugation at 37,500 rpm (28,000 x g) in a SW40 rotor (Beckmann Optima™ L Preparative Ultracentrifuge) at 4°C for 120 min. 13 fractions of 1 ml were collected from the top of the gradient. From 600 µl of each fraction RNA was isolated and the ratio of 28S to 18S rRNA was measured to obtain the polysome profile on Agilent 2100 Bioanalyzer<sup>10</sup>. Based on the polysome profile, 200 µl of each selected gradient fraction were used for pooling of samples into polysomal/non-polysomal parts (Figure 3.3). An appropriate amount of viral RNA (One Color Spike-In Kit; Agilent Technologies; Cat. No. 5188-5279) for 1 µg of test-RNA was added to allow for the comparison of relative RNA amounts in later analysis.

Total RNA were extracted by using the Trizol Reagent (Invitrogen). Subsequently to RNA isolation, a DNase I digest was performed. RNA were checked for quantity, purity and

integrity of the 18S and 28S ribosomal bands by capillary electrophoresis using the Agilent 2100 bioanalyzer and the NanoDropND-1000 UV-VIS Spectrophotometer version 3.2.1.

Microarrays were done using the "Low RNA Input linear Amplification Kit Plus, One Color" protocol (Agilent Technologies, Inc. 2007; Cat. N°: 5188-5339) following the manufacturer's standard protocol. Global gene expression analysis was applied in triplicates using mouse expression arrays (Agilent Technologies; Cat. No. G4122F; 41,000 genes represented). Quantity and efficiency of the labeled amplified cRNA were determined using the NanoDrop ND-1000 UV-VIS Spectrophotometer version 3.2.1. The hybridizations were performed for 17 hours at 10 rpm and 65°C in the Hybridization Oven (Agilent). Washing and staining of the arrays were done according to the manufacturer's recommendation. Cy3 intensities were detected by one-color scanning using an Agilent DNA microarray scanner (G2505B) at 5 micron resolution. Scanned image files were visually inspected for artefacts and then analyzed<sup>14</sup>.

### 3.6.3 Statistics

Total translation activity was calculated comparing mRNA content of free mRNA fractions versus polysomal fractions using one-sided t-test.

For MA analysis, quality control, normalisation and analysis of differentially expressed genes was performed using the software R<sup>54</sup>. The first step of microarray analysis focussed on quality control including correlation investigation, hierarchical clustering and principal component analysis. Normalisation was based on the spike-ins, relating expression data to their respective values while preserving the range of data. With regard to differential expression we were interested in significant differences between the time group fold changes of the polysomal ( $p_6-p_0$ ) and non-polysomal ( $np_6-np_0$ ) fraction, where  $p_6$  ( $p_0$ ) denotes the log<sub>2</sub> signal intensity of polysomal RNA at day 0+6h (+0h), and analogously  $np$  marks the non-polysomal fraction. To detect those differences the empirical Bayes statistic of the limma package<sup>55</sup> was applied implying a moderated gene-by-gene t-test followed by p-value adjustment via multiple testing correction according to the Benjamini-Hochberg method<sup>56</sup>. Clustering of the expression profiles as well as sorting into functional and structural groups was done with PANTHER DB<sup>57</sup>. Information about candidate genes was collected in PubMed searches. Data were submitted to GEO (accession number GSE29744).

### 3.6.4 Quantitative Real Time-PCR (q-PCR)

RNA (300 ng/20 µl) was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI). 1 µl of the RT reaction mixture was used for quantitative PCR. Primers to amplify *eIF4B*, *IMPDH2*, *RPL27a*, *UBE2k/HIP2*, *UCP2* and  $\beta$ Actin were

purchased from Sigma Aldrich. q-PCRs were performed with 2x Power Sybr Green Mastermix (ABI) and Mx4000™ Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene), all samples were assayed in triplicate. Data was analysed using the  $\Delta\Delta C_T$  method with normalizers *HIP2*, *UCP2* and  $\beta$ Actin<sup>58</sup>. The resulting  $\Delta\Delta C_T$  values per replicate are interpretable as the aforementioned fold change of time ratios between fraction groups. One sample t-tests were conducted per gene to test whether the mean of the replicates differs significantly from zero. Above that an analysis of variance was applied to a linear model of the  $\Delta C_T$  values to treat influences of time and fraction groups separately<sup>59</sup> (Additional Figure 3.2).

### 3.6.5 Western Blotting

Total protein from 3T3-L1 cells at time points T0 and T6 was extracted with protein extraction buffer (50 mM NaF, 50 mM Tris HCl, 5 mM NaPPi, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 1 mM EDTA). For each sample, 30  $\mu$ g protein was denatured in Laemmli Buffer for 5 min at 95°C. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Millipore) using a tank blot system (Bio-Rad). The membrane was blocked for 1 h in blocking buffer (5% skim milk powder in PBS). After washing three times for 15 min in PBS, the membrane was incubated for 30 min at room temperature with polyclonal antibody against  $\beta$ Actin (ab75186; Abcam) in a dilution 1:15,000 in milk (PBS, 2 % skim milk powder, 10 % fetal bovine serum). The membrane was washed again and incubated with either polyclonal antibodies against eIF4B (ab59300, 1: 2,000), IMPDH2 (ab75790, 1:1,000), UBE2k/HIP2 (ab82950, 1:1,000) or RPL27a (ab74731, 1:1,300) overnight at 4 °C and afterwards 1 h at room temperature. Goat polyclonal anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (ab6721, Abcam) was added to the membrane after washing and incubated for 90 min at room temperature. Washed membrane was incubated in Luminata Classico Chemiluminescence Detection Reagent (Millipore) for 2 min and exposed to photo film (ECL, Amersham Biosciences). Changes in protein expression were quantified by densitometry with Image J and normalized with appropriate expression data of  $\beta$ Actin. For each of the three biological and two technical replicates per gene the normalized value for time point 6 was related to the one of time point 0. The resulting three ratios per technical replicate were averaged leading to one value per biological replicate. As the Image J measurement itself was additionally repeated threefold, the aforementioned procedure was applied three times and the mean was taken per biological replicate which finally lead to one averaged value per biological replicate. One sample t-tests were conducted per gene to test whether the mean of those 3 values differs significantly from one (Figure 3.4).

### 3.7 Authors' contributions

CF-D performed most of the experimental part including cell culture, RNA isolation, gradients, qPCR, western blotting and writing of the manuscript. SvdH did statistical analysis under supervision of TB. OL did cell culture and gradients. GS developed the spike-in strategy used in this project. BB co-developed the strategy. TB participated in the planning of MA and developed the strategy for the statistical analysis of the MA data. BGB developed strategy of the project, supervised the practical part, coordinated the project and wrote the manuscript.

### 3.8 Acknowledgements

SvdH was supported by a grant from the “German Ministry of Education and Research Network on Medical Systems Biology BreastSys“. We thank Antonio Zorzano for discussion on the manuscript.

### 3.9 References

1. Spalding, K. L., Arner E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., Arner, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783–787 (2008).
2. MacDougald, O. A. & Lane, M. D. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* **64**, 345–373 (1995).
3. Mishra, A., Zhu, X., Ge, K. & Cheng, S.-Y. Adipogenesis is differentially impaired by thyroid hormone receptor mutant isoforms. *J Mol Endocrinol* **44**, 247–255 (2010).
4. Poulos, S. P., Dodson, M. V. & Hausman, G. J. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med* **235**, 1185–1193 (2010).
5. Burton, G. R., Guan, Y., Nagarajan, R. & McGehee, R. E., Jr Microarray analysis of gene expression during early adipocyte differentiation. *Gene* **293**, 21–31 (2002).
6. Rosen, E.D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., Spiegelman, B. M. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* **16**, 22–26 (2002).
7. Calkhoven, C. F., Müller, C. & Leutz, A. Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev* **14**, 1920–1932 (2000).
8. Kawagishi, H., Wakoh, T., Uno, H., Maruyama, M., Moriya, A., Morikawa, S., Okano, H., Sherr, C. J., Takagi, M., Sugimoto, M. Hzf regulates adipogenesis through translational control of C/EBP[alpha]. *EMBO J* **27**, 1481–1490 (2008).
9. Melamed, D. & Arava, Y. Genome-wide analysis of mRNA polysomal profiles with spotted DNA microarrays. *Meth Enzymol* **431**, 177–201 (2007).
10. Parent, R. & Beretta, L. Translational control plays a prominent role in the hepatocytic differentiation of HepaRG liver progenitor cells. *Genome Biol* **9**, R19 (2008).
11. Melamed, D., Eliyahu, E. & Arava, Y. Exploring translation regulation by global analysis of ribosomal association. *Methods* **48**, 301–305 (2009).
12. Carlage, T., Hincapie, M., Zang, L., Lyubarskaya, Y., Madden, H., Mhatre, R., Hancock, W. S. Proteomic profiling of a high-producing Chinese hamster ovary cell culture. *Anal Chem* **81**, 7357–7362 (2009).
13. Bezy, O., Vernochet, C., Gesta, S., Farmer, S. R. & Kahn, C. R. TRB3 blocks adipocyte differentiation through the inhibition of C/EBPbeta transcriptional activity. *Mol Cell Biol* **27**, 6818–6831 (2007).

14. Opitz, L., Salinas-Riester, G., Grade, M., Jung, K., Jo, P., Emons, G., Ghadimi, B. M., Beissbarth, T., Gaedcke, J. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genomics* **3**, 36 (2010).
15. Schuirmann, D. On hypothesis testing to determine if the mean of a normal distribution is contained in a known interval. **37**, 617 (1981).
16. Westlake, W. Bioequivalence testing - a need to rethink. **37**, 589–594 (1981).
17. Mikulits, W., Pradet-Balade, B., Habermann, B., Beug, H., Garcia-Sanz, J. A., Müllner, E. W. Isolation of translationally controlled mRNAs by differential screening. *FASEB J.* **14**, 1641–1652 (2000).
18. Kheternal, I., Ku, G., Coleman, L., Yu, G., Ptitsyn, A. A., Floyd, Z. E., Gimble, J. M. Proteome of Human Subcutaneous Adipose Tissue Stromal Vascular Fraction Cells versus Mature Adipocytes Based on DIGE. *J Proteome Res* **10**, 1519–1527 (2011).
19. Welsh, G. I., Griffiths, M. R., Webster, K. J., Page, M. J. & Tavaré, J. M. Proteome analysis of adipogenesis. *Proteomics* **4**, 1042–1051 (2004).
20. Lee, H.-K., Lee, B.-H., Park, S.-A. & Kim, C.-W. The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **6**, 1223–1229 (2006).
21. Choi, K.-L., Wang, Y., Tse, C. A., Lam, K. S. L., Cooper, G. J. S., Xu, A. Proteomic analysis of adipocyte differentiation: Evidence that alpha2 macroglobulin is involved in the adipose conversion of 3T3 L1 preadipocytes. *Proteomics* **4**, 1840–1848 (2004).
22. Adachi, J., Kumar, C., Zhang, Y. & Mann, M. In-depth analysis of the adipocyte proteome by mass spectrometry and bioinformatics. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1257–1273 (2007).
23. Newton, B. W., Cologna, S. M., Moya, C., Russell, D. H., Russell, W. K., Jayaraman, A. Proteomic Analysis of 3T3-L1 Adipocyte Mitochondria during Differentiation and Enlargement. *Journal of Proteome Research* **10**, 4692–4702 (2011).
24. Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J.-W., Mortensen, P., Otto, T., Nalli, A., Tang, Q.-Q., Lane, M. D., Chaerkady, R., Pandey, A. Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J Proteome Res* **8**, 48–58 (2009).
25. Qiu, Z., Wei, Y., Chen, N., Jiang, M., Wu, J., Liao, K. DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J Biol Chem* **276**, 11988–11995 (2001).
26. Lai, M.-D. & Xu, J. Ribosomal Proteins and Colorectal Cancer. *Curr Genomics* **8**, 43–49 (2007).
27. Du, J., Shi, Y., Pan, Y., Jin, X., Liu, C., Liu, N., Han, Q., Lu, Y., Qiao, T., Fan, D. Regulation of multidrug resistance by ribosomal protein l6 in gastric cancer cells. *Cancer Biol. Ther* **4**, 242–247 (2005).
28. Gou, Y., Shi, Y., Zhang, Y., Nie, Y., Wang, J., Song, J., Jin, H., He, L., Gao, L., Qiao, L., Wu, K., Fan, D. Ribosomal protein L6 promotes growth and cell cycle progression through upregulating cyclin E in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 788–793 (2010).
29. Obregon, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid* **18**, 185–195 (2008).
30. Lu, C. & Cheng, S.-Y. Thyroid hormone receptors regulate adipogenesis and carcinogenesis via crosstalk signaling with peroxisome proliferator-activated receptors. *J Mol Endocrinol* **44**, 143–154 (2010).
31. Kumar, K. U., Srivastava, S. P. & Kaufman, R. J. Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase (PKR) Is Negatively Regulated by 60S Ribosomal Subunit Protein L18. *Mol Cell Biol* **19**, 1116–1125 (1999).
32. Yamada, T., Sasaki, S., Sukegawa, S., Miyake, T., Fujita, T., Kose, H., Morita, M., Takahagi, Y., Murakami, H., Morimatsu, F., Sasaki, Y. Association of a single nucleotide polymorphism in ribosomal protein L27a gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *Anim Sci J* **80**, 631–635 (2009).

33. Caldarola, S., De Stefano, M. C., Amaldi, F. & Loreni, F. Synthesis and function of ribosomal proteins – fading models and new perspectives. *FEBS Journal* **276**, 3199–3210 (2009).
34. Van den Broeke, A., Van Poucke, M., Marcos-Carcavilla, A., Hugot, K., Hayes, H., Bertaud, M., Van Zeveren, A., Peelman, L. Characterization of the ovine ribosomal protein SA gene and its pseudogenes. *BMC Genomics* **11**, 179 (2010).
35. Ku, H.-C., Chang, H.-H., Liu, H.-C., Hsiao, C.-H., Lee, M.-J., Hu, Y.-J., Hung, P.-F., Liu, C.-W., Kao, Y.-H. Green tea (-)epigallocatechin gallate inhibits insulin stimulation of 3T3-L1 preadipocyte mitogenesis via the 67-kDa laminin receptor pathway. *Am J Physiol, Cell Physiol* **297**, C121–132 (2009).
36. Kao, Y.-H., Chang, H.-H., Lee, M.-J. & Chen, C.-L. Tea, obesity, and diabetes. *Mol Nutr Food Res* **50**, 188–210 (2006).
37. Ruggiero, D. & Sonenberg, N. The Akt of translational control. *Oncogene* **24**, 7426–7434 (2005).
38. Rui, L. A link between protein translation and body weight. *J. Clin. Invest* **117**, 310–313 (2007).
39. Topisirovic, I. & Sonenberg, N. Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* **145**, 333–334 (2011).
40. Wang, X. & Proud, C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* **21**, 362–369 (2006).
41. Hernández, G. & Vazquez-Pianzola, P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of Development* **122**, 865–876 (2005).
42. Clemens, M. J., Bushell, M., Jeffrey, I. W., Pain, V. M. & Morley, S. J. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ* **7**, 603–615 (2000).
43. Shahbazian, D., Parsyan, A., Petroulakis, E., Topisirovic, I., Martineau, Y., Gibbs, B. F., Svitkin, Y., Sonenberg, N. Control of Cell Survival and Proliferation by Mammalian Eukaryotic Initiation Factor 4B. *Mol Cell Biol* **30**, 1478–1485 (2010).
44. Zhang, H. H., Huang, J., Düvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R. M., Wu, C.-L., Manning, B. D. Insulin Stimulates Adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 Pathway. *PLoS ONE* **4**, e6189 (2009).
45. Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P. & Eisenman, R. N. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 653–699 (2000).
46. Freytag, S. O. & Geddes, T. J. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* **256**, 379–382 (1992).
47. Heath, V. J., Gillespie, D. A. & Crouch, D. H. Inhibition of the terminal stages of adipocyte differentiation by cMyc. *Exp Cell Res* **254**, 91–98 (2000).
48. Kim, S.-J., Lee, K.-H., Lee, Y.-S., Mun, E.-G., Kwon, D.-Y., Cha, Y.-S. Transcriptome analysis and promoter sequence studies on early adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Nutr Res Pract* **1**, 19–28 (2007).
49. Dai, M.-S. & Lu, H. Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J Cell Biochem* **105**, 670–677 (2008).
50. Fensterl, V. & Sen, G. C. The ISG56/IFIT1 gene family. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 71–78 (2011).
51. Xu, G., Li, Y., An, W. & Zhang, W. Ghrelin and cell differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 841–847 (2008).
52. Liu, J., Lin, H., Cheng, P., Hu, X. & Lu, H. Effects of ghrelin on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* **29**, 227–230 (2009).
53. Zhang, W., Zhao, L., Lin, T. R., Chai, B., Fan, Y., Gantz, I., Mulholland, M. W. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* **15**, 2484–2491 (2004).
54. R Development Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. **1**, ISBN 3–900051–07–0

55. Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3 (2004).
56. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**, 289–300 (1995).
57. Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., Narechania, A. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Research* **13**, 2129–2141 (2003).
58. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protocols* **3**, 1101–1108 (2008).
59. Chambers, J., Freeny, A. & Heiberger, R. Analysis of variance; designed experiments. *Statistical Models in S* (1992).
60. Cho, R. J. & Campbell, M. J. Transcription, genomes, function. *Trends Genet* **16**, 409–415 (2000).
61. Zheng, S., Yao, Y., Dong, Y., Lin, F., Zhao, H., Shen, Z., Sun, Y., Tang, L. Down-regulation of ribosomal protein L7A in human osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**, 1025–1031 (2009).

### 3.10 Additional Files

#### Additional Table 3.1 – Results of Microarray analysis.

Gene functions, GenBank accession numbers and fold change for mRNAs that are fourfold and greater up- or down-regulated 6 hours after stimulation of adipogenesis.

Description	Symbol	Gene functions	GenBank	fold change	fdr
<b>Genes up-regulated 6h after hormonal induction</b>					
interferon regulatory factor 6	<i>IRF6</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process, immune response, response to interferon-gamma	AK087631	14.22	1.78E-03
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	<i>POLR2a</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	NM_009089	13.23	1.07E-03
pleckstrin homology domain containing, family N member 1	<i>PLEKHN1</i>	cell communication, signal transduction, cellular defense response	NM_001008233	7.80	1.89E-03
proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	<i>PCSK1n</i>	unclassified	NM_013892	7.56	9.28E-04
ribosomal protein L27a	<i>RPL27a</i>	protein metabolic process	NM_011975	7.42	3.83E-04
eukaryotic translation initiation factor 4B	<i>eIF4B</i>	protein metabolic process	NM_145625	7.15	3.83E-04
inosine 5'-phosphate dehydrogenase 2	<i>IMPDH2</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	NM_011830	5.97	3.83E-04
lactoperoxidase	<i>LPO</i>	oxygen and reactive oxygen species metabolic process, immune response	NM_080420	5.56	9.70E-04
Nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2	<i>NMNAT2</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	NM_175460	5.45	3.83E-04
ribosomal protein S18	<i>RPS18</i>	protein metabolic process	NM_011296	5.29	3.83E-04
heat shock protein 8	<i>HSPA8</i>	protein metabolic process, response to stress	NM_031165	5.20	3.83E-04
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G	<i>SEMA3g</i>	signal transduction, developmental process, cell surface receptor linked signal transduction, cell adhesion	AK129018	5.19	3.83E-04



<b>Description</b>	<b>Symbol</b>	<b>Gene functions</b>	<b>GenBank</b>	<b>fold change</b>	<b>fdr</b>
family with sequence similarity 131, member A	<i>FAM131a</i>	unclassified	NM_133778	4.97	3.83E-04
solute carrier family 25, member 30	<i>SLC25a30</i>	phosphate, lipid, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; phosphate, lipid, cation, ion, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport	NM_026232	4.88	3.83E-04
RIKEN cDNA 4930558C23 gene	<i>4930558C23RIK</i>	not described	AK006075	4.88	1.22E-03
small inducible cytokine subfamily E, member 1	<i>SCYE1</i>	protein metabolic process	NM_007926	4.81	3.83E-04
S-adenosylhomocysteine hydrolase	<i>AHCY</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	L32836	4.80	3.83E-04
vasohibin 1	<i>VASH1</i>	unclassified	NM_177354	4.78	3.83E-04
heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	<i>HSP90ab1</i>	protein metabolic process, response to stress	NM_008302	4.75	3.83E-04
ADP-ribosylation factor-like 4D	<i>ARL4d</i>	not described	NM_031160	4.69	8.90E-04
myelocytomatosis oncogene	<i>MYC</i>	cellular process, induction of apoptosis, cell cycle	NM_010849	4.66	3.95E-04
TSC22 domain family, member 3	<i>TSC22d3</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	AF024519	4.60	4.35E-04
ribosomal protein L7A	<i>RPL7a</i>	protein metabolic process; nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	NM_013721	4.54	3.83E-04
solute carrier family 25, member 30	<i>SLC25a30</i>	phosphate, lipid, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; phosphate, lipid, cation, ion, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport	AK159732	4.53	4.35E-04
no description	no symbol	not described	XR_002409	4.48	3.83E-04

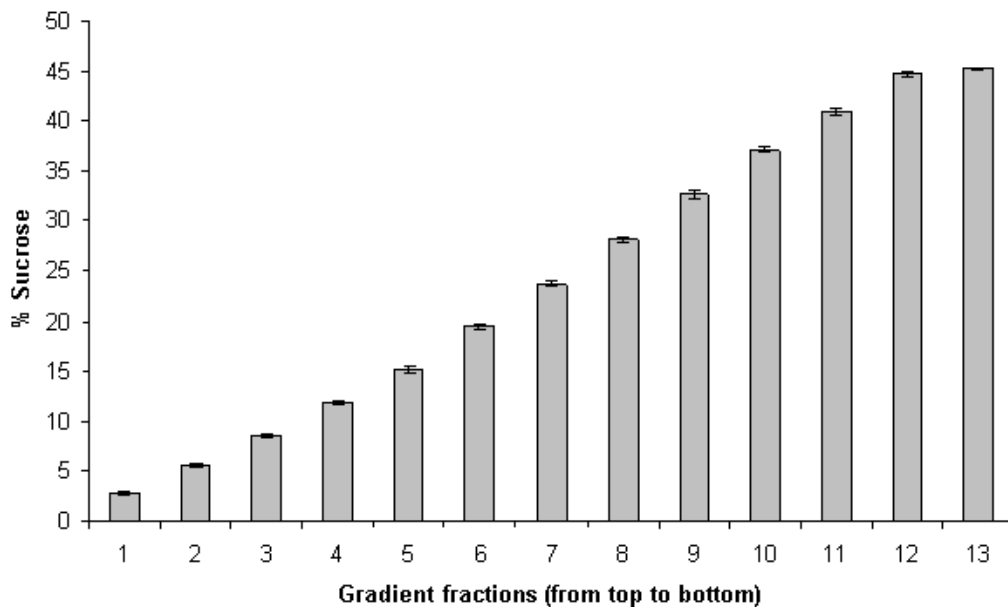
<b>Description</b>	<b>Symbol</b>	<b>Gene functions</b>	<b>GenBank</b>	<b>fold change</b>	<b>fdr</b>
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 5	<i>SLC25a5</i>	phosphate, lipid, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; phosphate, lipid, cation, ion, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport	NM_007451	4.45	3.83E-04
TBC1 domain family, member 22a	<i>TBC1d22a</i>	cellular component organization, exocytosis, cellular component morphogenesis, intracellular protein transport	NM_145476	4.33	3.83E-04
TSC22 domain family, member 3	<i>TSC22d3</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	NM_001077364	4.32	3.83E-04
procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	<i>PLOD3</i>	protein metabolic process, cell adhesion	NM_011962	4.31	4.48E-04
BCL2-associated athanogene 3	<i>BAG3</i>	protein metabolic process, signal transduction, negative regulation of apoptosis	AJ250687	4.29	4.95E-04
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	<i>CDKN1c</i>	cellular process cell cycle	NM_009876	4.26	7.35E-04
small proline-rich protein 2A	<i>SPRR2a</i>	unclassified	NM_011468	4.23	3.83E-04
heat shock factor 1	<i>HSF1</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process; response to stress, immune system process, response to stimulus	Z49206	4.23	6.93E-04
no description	no symbol	not described	NM_001013830	4.23	3.83E-04
ribosomal protein S15a pseudogene	<i>GM13253</i>	not described	XM_973351	4.22	3.83E-04
ribosomal protein L18	<i>RPL18</i>	protein metabolic process	NM_009077	4.22	3.83E-04
predicted gene, 675507	<i>675507</i>	not described	XR_005114	4.10	3.83E-04

<b>Description</b>	<b>Symbol</b>	<b>Gene functions</b>	<b>GenBank</b>	<b>fold change</b>	<b>fdr</b>
ribosomal protein SA	<i>RPSa</i>	protein metabolic process, nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	NM_011029	4.09	4.31E-04
dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus)	<i>DACT1</i>	unclassified	NM_021532	4.08	1.19E-03
sorting nexin 17	<i>SNX17</i>	vesicle-mediated transport, endocytosis, intracellular protein transport	NM_153680	4.03	2.40E-02
dehydrodolichyl diphosphate synthase	<i>DHDDS</i>	protein metabolic process	NM_026144	4.01	4.09E-04
ribosomal protein L6	<i>RPL6</i>	protein metabolic process	NM_011290	4.00	4.09E-04
ethanolaminephosphotransferase 1	<i>EPT1</i>	not described	NM_027652	4.00	4.08E-04
<b>Genes down-regulated 6h after hormonal induction</b>					
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	<i>IFIT1</i>	response to interferon gamma immune response, response to stimulus	NM_008331	0.25	4.56E-04
ghrelin	<i>GHRL</i>	cell surface receptor linked signal transduction, cell communication	NM_021488	0.16	1.61E-03

**Additional Table 3.2 - Results of Cluster analysis by PANTHER DB.** This Table contains the name of the PANTHER classification category, the genes that map to the respective category, the expected number of genes in the respective category based on the reference genome, plus or minus signs indicating over- or under-representation of the respective category in the experiment and finally the p-values determined by the binomial statistic according to<sup>60</sup>.

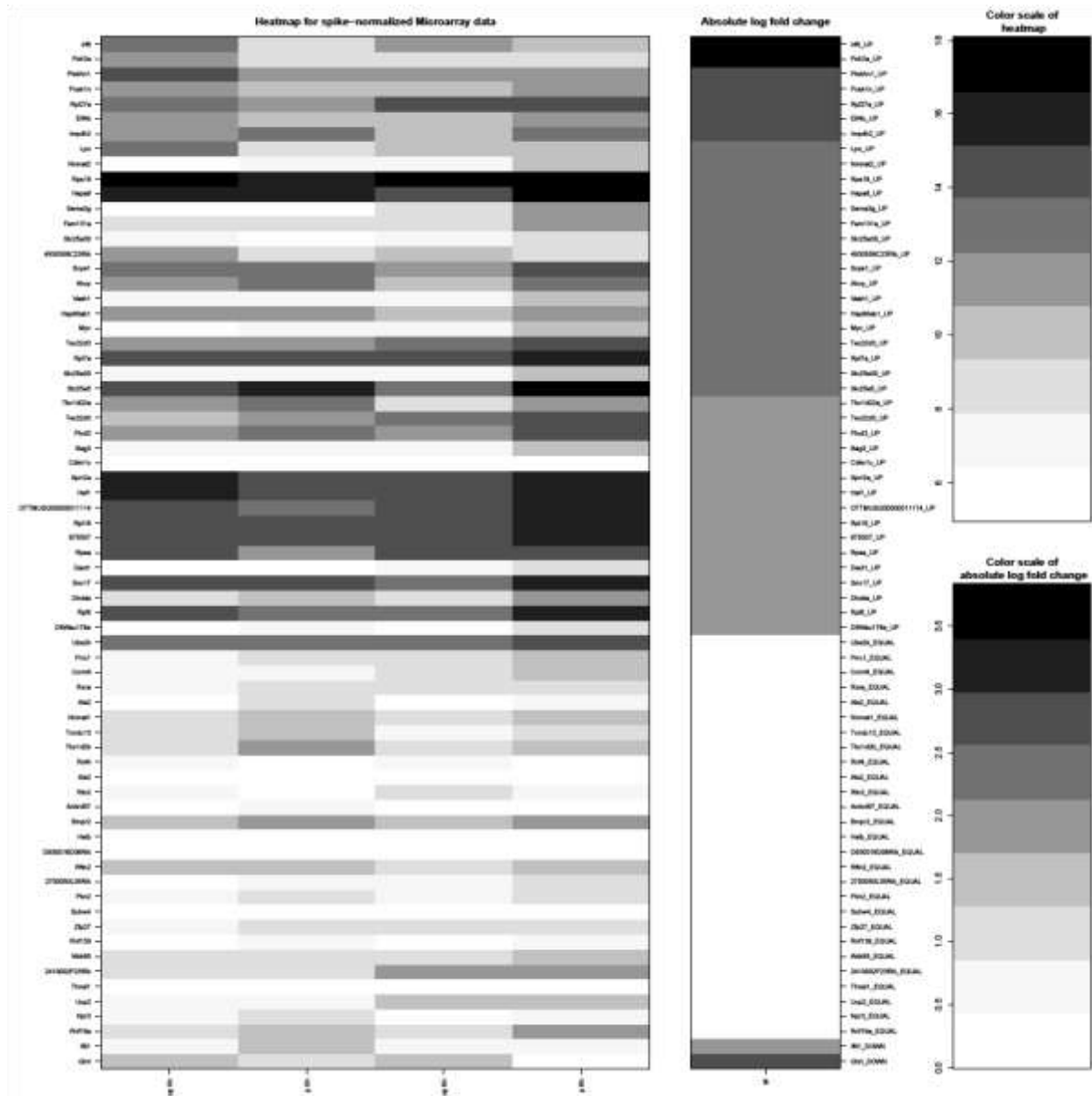
<b>PANTHER classification</b>	<b>genes</b>	<b>expected</b>	<b>over/under</b>	<b>P-value</b>
<b><i>Molecular Function of up-regulated genes 6h after hormonal induction</i></b>				
nucleic acid binding	<i>eIF4B, HSF1, IRF6, MYC, POLR2a, RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa, TSC22d3</i>	6.03	+	1.13E-02
structural constituent of ribosome	<i>RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa</i>	0.68	+	5.57E-05
translation initiation factor activity	<i>eIF4B</i>	0.14	+	1.29E-01
transcription regulator activity	<i>HSF1, IRF6, MYC, TSC22d3</i>	2.86	+	3.20E-01
nucleotidyltransferase activity	<i>NMNAT2, POLR2a</i>	0.27	+	2.99E-02
amino acid transmembrane transporter activity	<i>SLC25a5, SLC25a30</i>	0.14	+	8.92E-03
kinase inhibitor activity	<i>CDKN1c</i>	0.17	+	1.53E-01
aminoacyl-tRNA ligase activity	<i>SCYE1</i>	0.05	+	4.70E-02
oxidoreductase activity	<i>IMPDH2, LPO, PLOD3</i>	1.13	+	1.03E-01
<b><i>Protein Class of up-regulated genes 6h after hormonal induction</i></b>				
ribosomal protein	<i>RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa</i>	0.67	+	4.78E-05
RNA binding protein	<i>eIF4B, RPL18, RPL27a, RPL6, RPL7a, RPS18, RPSa</i>	1.50	+	6.18E-04
chaperone	<i>BAG3, HSPA8, HSP90ab1</i>	0.18	+	7.27E-04
nucleotidyltransferase	<i>NMNAT2, POLR2a</i>	0.13	+	7.38E-03
amino acid transporter	<i>SLC25a5, SLC25a30</i>	0.14	+	8.92E-03
kinase inhibitor	<i>CDKN1c</i>	0.02	+	2.12E-02
aminoacyl-tRNA synthetase	<i>SCYE1</i>	0.03	+	2.64E-02
peroxidase	<i>LPO</i>	0.04	+	3.80E-02
oxidoreductase	<i>IMPDH2, LPO, PLOD3</i>	0.91	+	6.26E-02

translation factor	<i>eIF4B</i>	0.10	+	9.55E-02
acyltransferase	<i>DHDDS</i>	0.11	+	1.05E-01
oxygenase activity	<i>PLOD3</i>	0.12	+	1.12E-01
hydrolase	<i>AHCY, TBC1d22a</i>	3.34	-	3.39E-01
basic helix-loop-helix transcription factor	<i>MYC</i>	0.16	+	1.45E-01
dehydrogenase	<i>IMPDH2</i>	0.35	+	2.98E-01
transcription factor	<i>HSF1, IRF6, MYC, TSC22d3</i>	2.82	+	3.10E-01
structural protein	<i>SPRR2a</i>	0.40	+	3.29E-01
signaling molecule	<i>PLEKHN1, SEMA3g</i>	1.40	+	4.11E-01
<b>Protein Class of down-regulated gene 6h after hormonal induction</b>				
peptide hormone	<i>GHRL</i>	0.01	+	1.32E-02

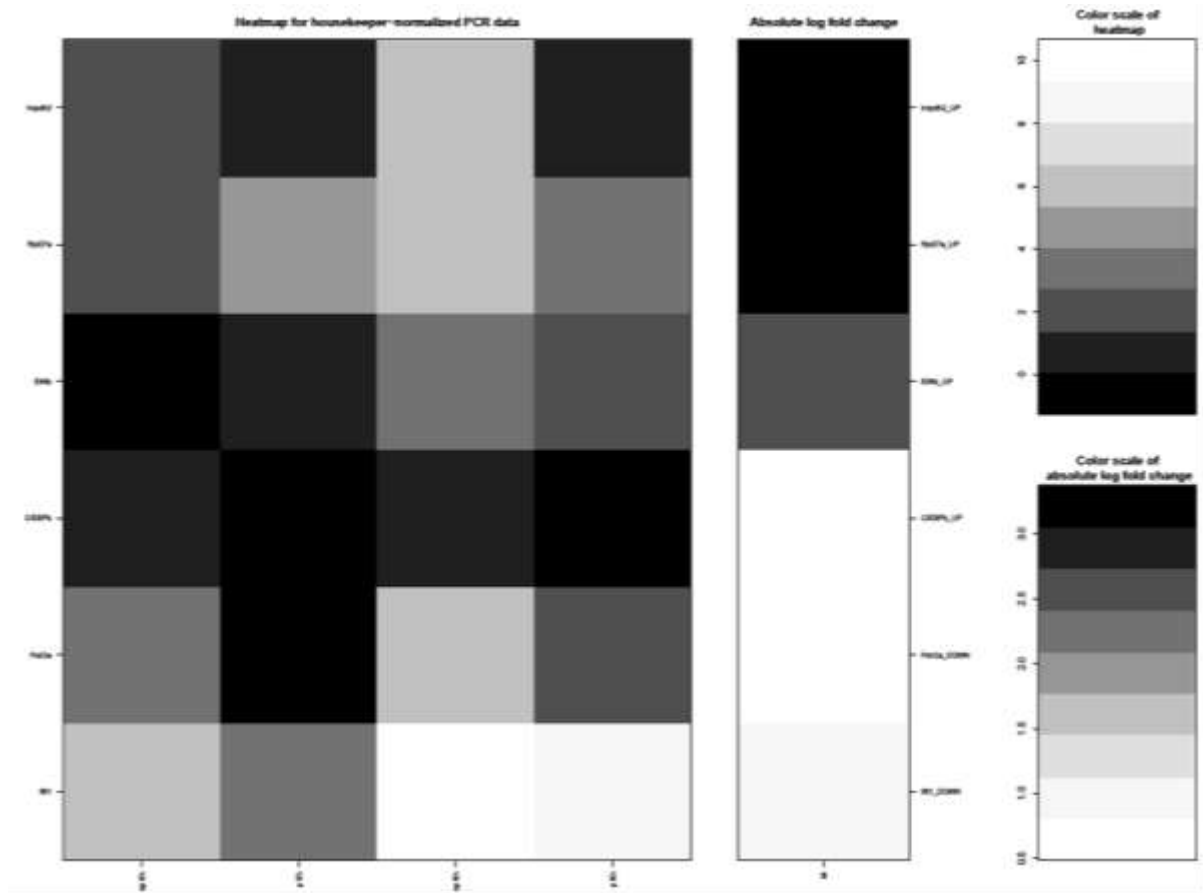


#### Additional Figure 3.1: Control of stability of gradients

Stability of 14 linear gradients was proved with a refractometer. Gradient fractions were collected from top of gradient and percentage of sucrose content was measured. Standard deviations are shown by error bars.



**Additional Figure 3.2: Heatmap for spike-normalized microarray expression data.** Columns 1 to 4 show log<sub>2</sub> expression data for polysomal (p) and non-polysomal (np) fractions at two time points (0h and 6h after hormonal induction). Column 5 shows log<sub>2</sub> fold change M (((p<sub>6</sub>-np<sub>6</sub>) - (p<sub>0</sub>-np<sub>0</sub>)). Only genes with *fdr* < 0.05 were selected. Genes were identified as up-regulated (Up; highest expression in polysomal fractions at time point 6h after hormonal induction) with M-value > 2, p<sub>6</sub> > p<sub>0</sub>, p<sub>6</sub> > np<sub>6</sub>, np<sub>6</sub> < np<sub>0</sub>, p<sub>0</sub> < np<sub>0</sub>. Genes were identified as down regulated (Down) with M-value < -2, p<sub>6</sub> < p<sub>0</sub> and as neither up nor down regulated (Equal) with equivalence test parameter 'epsilon = 0,2'. High expression levels are shown in dark grey, low expression levels in white.



**Additional Figure 3.3: Heatmap for housekeeper-normalized PCR data**

Column 1 to 4 shows housekeeper-normalized values for polysomal (p) and non-polysomal (np) fractions at two time points (0h and 6h after hormonal induction). Column 5 shows fraction to time ratio ( $\log; (p6 - np6) - (p0 - np0)$ ).

## 4. Diskussion

Die Adipositas ist weltweit ein wachsendes Gesundheitsproblem (Kapitel 1.1.2). Obwohl es bereits viele Studien zu den Ursachen der Adipositas und der Regulation der Adipogenese gibt, bestehen noch große Wissenslücken in diesem Forschungsfeld. Besonders die Erkenntnisse über Stoffwechselprozesse in der frühen Adipogenese sind noch nicht vollständig aufgeklärt<sup>1,2</sup>. In dieser Arbeit wurden zum einen Expressionsunterschiede des Adipositasfaktors *DOR* bei unterschiedlicher metabolischer Voraussetzung im Mausmodell untersucht. Zum anderen wurde die translationale Regulation in der frühen Adipogenese im Zellmodell studiert.

### 4.1 Einflüsse auf Expressionsänderungen des Adipositas Faktors „*DOR*“

Die Hypothalamus – Hypophysen – Schilddrüsen Achse spielt eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Entwicklung, den metabolischen Grundumsatz und die Steuerung der Körpertemperatur. Für die Funktion der aktiven Form des Schilddrüsenhormons (T3) sind das Vorhandensein von Schilddrüsenhormon Rezeptoren (TRs) und aktivierender oder inhibierender Kofaktoren entscheidend. Eine Hyperthyreose führt zu einer Erhöhung der basalen Stoffwechselrate, Bradykardie und einer Verschiebung der MHC Expression im Muskel. Eine Hypothyreose hingegen führt zu einer verminderten Stoffwechselrate<sup>3</sup>.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass nicht nur Insulin für die glykämische Kontrolle verantwortlich ist, sondern dass synergistische Effekte von T3 und Insulin den Glukose und Lipid Stoffwechsel steuern<sup>4</sup>. Selbst in euthyroiden Patienten führen subklinische Fluktuationen der Plasma TH zu veränderter Insulin Sekretion und Insulin Sensitivität<sup>4-7</sup>.

Für den Schilddrüsenhormon Rezeptor TR $\alpha$ 1 und dessen Kofaktor *DOR* wurden bereits vielfältige Funktionen im Stoffwechsel der unterschiedlichsten Gewebe beschrieben<sup>8-18</sup> (siehe auch Abbildung 1.4). *DOR* wird im Skelettmuskel von übergewichtigen Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 herabreguliert und beeinflusst zudem die Expression von TH kontrollierten Genen<sup>9</sup>. Der alleinige Einfluss einer genetisch bedingten Adipositas auf die *DOR*-Expression im Muskel- und Fettgewebe wurde bisher noch nicht untersucht. Ebenfalls gibt es noch keine Studien zur Expression von *DOR* in Verbindung mit fettreichen Diäten im Tiermodell.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer genetisch bedingten Adipositas und einer fettreichen Diät auf die Expression von *DOR* erforscht. Hierfür wurden Fett- und Muskelgewebe von Mäusen mit einer genetisch bedingten Adipositas sowie von Tieren, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, untersucht.

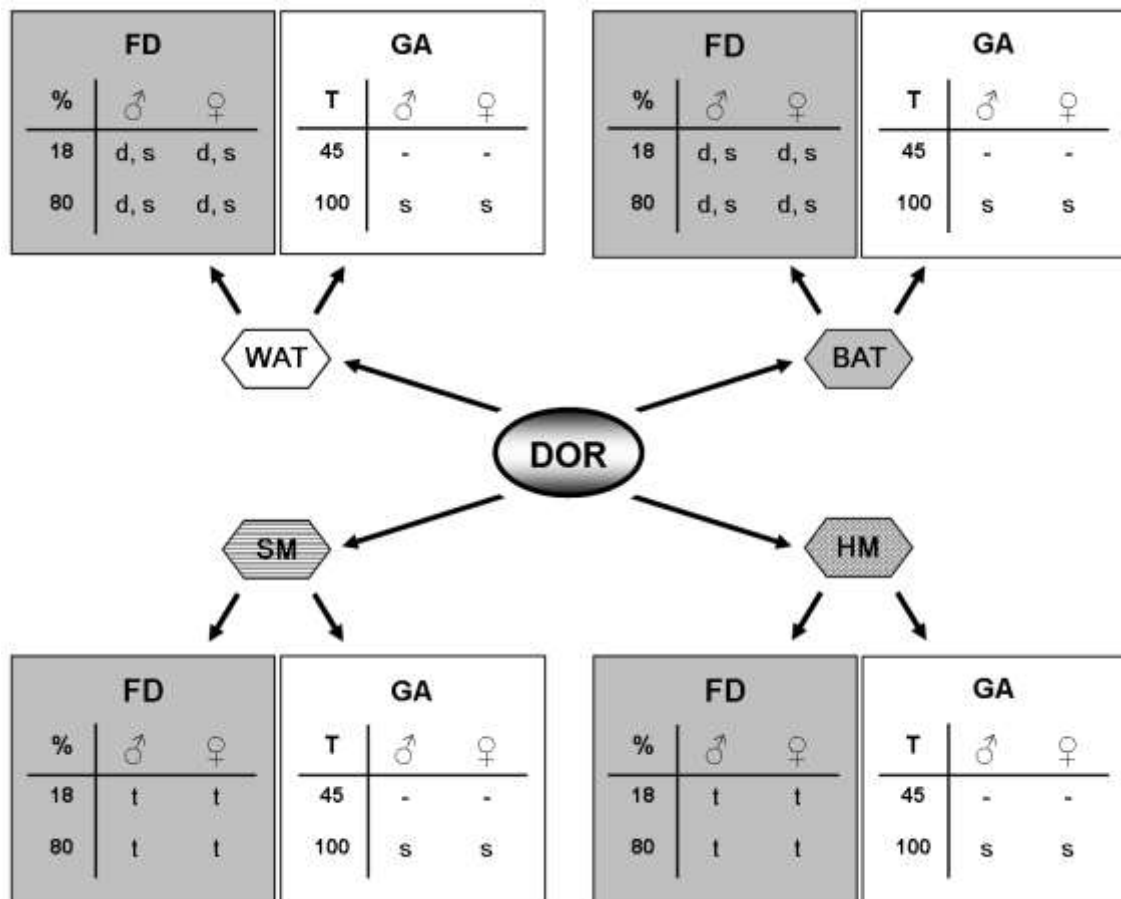
Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass sich bei einer fettreichen Diät die *DOR*-Expression im weißen Fettgewebe und im Herzmuskel im Vergleich zu Kontrolltieren



verändert. Bei einer genetisch bedingten Adipositas ist eine Veränderung der Expressionslevel von *DOR* im braunen Fettgewebe und im Herzmuskel zu beobachten. Die Höhe der *DOR*-Expression wird in beiden Mausmodellen von der Art des untersuchten Gewebes und dem Geschlecht der Tiere beeinflusst. Im Fütterungsmodell konnte zusätzlich ein Einfluss des Fettgehaltes der Diät gezeigt werden (Abbildung 4.1).

#### 4.1.1 Auswirkungen einer fettreichen Diät auf die *DOR*-Expression

Bei einer fettreichen Diät sind die Expressionslevel von *DOR* bei männlichen Tieren im weißen Fettgewebe, sowie bei beiden Geschlechtern im Herzmuskel heraufreguliert (Kapitel 2.4.2.1 und Additional file 2.2). Diese Ergebnisse spiegeln sich in denen von Araujo *et al.* (2010) wider. In deren Arbeit wurde eine Erhöhung des TH Serum Spiegels von Ratten nach einer fettreichen Diät beobachtet<sup>19</sup>. Ein signifikanter Einfluss der fettreichen Diät auf die *DOR*-Expression konnte zusätzlich mittels ANOVA im weißen und braunen Fettgewebe in beiden Geschlechtern gezeigt werden (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:** Einfluss von Diät (d), Gewebe (t) und Geschlecht (s) auf die Expression von *DOR* in Folge einer fettreichen Diät (FD, grau) und einer genetisch bedingten Adipositas (GA, weiß). Getestet wurde, ob ein Einfluss von d, t oder s auf die *DOR*-Expression im weißen (WAT) und braunen (BAT) Fettgewebe sowie im Skelett- (SM) und Herzmuskel (HM) von männlichen (♂) und weiblichen (♀) Tieren besteht. Die FD Tiere wurden für jeweils eine Woche mit 18% oder 80% Fettanteil in der Diät gefüttert. In den GA Mäusen wurde die *DOR*-Expression in jungen (Tag 45 nach der Geburt) und adulten (Tag 100 nach der Geburt) Tieren gemessen. Für die ANOVA wurden die *DOR*-Expressionswerte der FD und GA Mäuse mit denen der entsprechenden Kontrolltiere normalisiert. Es sind ausschließlich die signifikanten ( $p < 0.05$ ) ANOVA Ergebnisse dargestellt.

Es gibt bereits mehrere Studien über den Einfluss verschiedener Nahrungsbestandteile in Bezug zum TH Stoffwechsel. So erhöht zum Beispiel die Gabe von isoliertem Soja Protein die TR $\beta$ 1 Protein Level in der Leber von Ratten. Zusätzlich verhindert es dabei die Anbindung des nuklearen TH Rezeptor-Proteins an die Konsensus DNA Sequenz von Zielgenen<sup>20</sup>. Die Daten der Arbeit von Souza *et al.* (2011) weisen auf einen Zusammenhang des positiven Effektes von Fettsäuren aus Fischöl auf den Fettstoffwechsel mit dem TH Signalweg im Leberstoffwechsel hin<sup>21</sup>. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass ein exzessiver Gebrauch von Jod, in Kombination mit einer fettreichen Diät, die Schilddrüse beeinträchtigen und somit den TH Stoffwechsel stören kann<sup>22</sup>.

Insgesamt war der Zeitraum, in der die Mäuse mit der fettreichen Diät gefüttert wurden, kürzer im Vergleich zu anderen Versuchen aus der Literatur. In dieser Arbeit dauerte der Fütterungsversuch eine Woche, wogegen in der Literatur Zeiträume von drei Wochen<sup>21</sup>, 90 Tagen<sup>20</sup> oder bis zu mehreren Monaten<sup>22</sup> beschrieben sind.

Dennoch zeigten sich signifikante Änderungen in der Expression von *DOR* im weißen Fettgewebe und im Herzmuskel (Kapitel 2.4.2.1 und Additional file 2.2) sowie ein signifikanter Einfluss der Diät auf die *DOR*-Expression im weißen und braunen Fettgewebe (Abbildung 4.1). Auch war die Expression von *DOR* im Skelettmuskel männlicher Mäuse bei Gabe der Diät mit 80% Fett höher, als bei jener mit 18% Fettanteil (Abbildung 2.3). Dies lässt eine schnelle Anpassung in der Regulation des *DOR*-Gens bei der Reaktion auf eine veränderte Ernährungssituation in diesen Geweben vermuten.

#### **4.1.2 Auswirkungen einer genetisch bedingten Adipositas auf die *DOR*-Expression**

Die *DOR*-Expression bei einer genetisch bedingten Adipositas war bei 100 Tage alten weiblichen Tieren im braunen Fettgewebe und männlichen Mäusen im Herzmuskel heraufreguliert. Gegenläufig dazu war die *DOR*-Expression in 45 Tage alten männlichen Mäusen im Herzmuskel herabreguliert (Kapitel 2.4.2.2 und Additional file 2.4).

Die von Baumgartner *et al.* (2007)<sup>8</sup> beschriebene verminderte *DOR*-Expression im Skelettmuskel von adipösen Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte für Mäuse mit genetisch bedingter Adipositas ohne Diabetes mellitus Typ 2 nicht gezeigt werden.

Wir vermuten, dass physiologische Änderungen als Folge der diabetischen Kondition der fa/fa Ratten für die Herabregulierung von *DOR* verantwortlich waren und daher die nicht-diabetischen adipösen Mäuse keine veränderte *DOR*-Expression zeigten.

Diabetische fa/fa Ratten zeigen eine massive Insulin Resistenz und der Glukose Transport ist gestört<sup>23</sup>. Damit verbunden ist ein erhöhter oxidativer Stress (zusammengefasst in<sup>24</sup>). Inwieweit eine veränderte *DOR*-Expression diesen Mechanismen entgegen wirkt, kann im Moment nur spekuliert werden.

Ein Einfluss des Alters der Versuchstiere auf die *DOR*-Expression konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Sepe *et al.* (2011) zeigten beim Menschen eine Umverteilung des Körperfettes im Alter, einhergehend mit einer Anhäufung an Viszeralfett und einer Reduktion in der Menge an Subkutanfett. Ebenso nimmt die Fähigkeit Triglyceride zu speichern im Alter ab, was erhöhte Triglyceridspiegel im Serum zur Folge hat<sup>25</sup>.

Alle untersuchten Mäuse waren mit 45 oder 100 Tagen nach der Geburt noch recht jung. Langzeitversuche, mit Tieren die älter als sechs Monate sind, könnten einen Einfluss des Alters auf die *DOR*-Expression zeigen.

#### 4.1.3 Effekte von Gewebeart und Geschlecht auf die *DOR*-Expression

Im Skelett- und Herzmuskel von fettreich gefütterten Mäusen konnte ein signifikanter Einfluss der Gewebeart auf die *DOR*-Expression gezeigt werden (Abbildung 4.1). Zusätzlich konnte ein Einfluss der Gewebeart auf die *DOR*-Expression im weißen und braunen Fettgewebe von fettreich gefütterten Tieren ermittelt werden (Abbildung 2.4).

T3, als aktive Form von TH, induziert den Energieverbrauch im Skelettmuskel sowie im weißen und braunen Fettgewebe durch die Regulation der *UCP-1* Expression und die Biogenese von Mitochondrien<sup>26</sup>. Ein erhöhter Energieverbrauch in den Geweben kann vermutlich einer übermäßigen Speicherung von Energie, in Form von Triglyceriden, vorbeugen.

*TRα1* ist an der Regulation der Energie verbrauchenden Thermogenese beteiligt<sup>27</sup>. Eine erhöhte Expression von *TRα1* oder dessen Koaktivator *DOR* resultiert vermutlich in einem vermehrten Energieverbrauch.

Die beobachtete erhöhte Expression von *DOR*, im Herzmuskel (Additional file 2.2), könnte eine Schutzfunktion gegenüber einer übermäßigen Energiezufuhr durch Nahrungsfette darstellen. Eine solche Funktion wurde ebenfalls von Marsili *et al.* (2011) für das T3 konvertierende Enzym Dio2 beschrieben<sup>28</sup>. Erhöhte TH Spiegel führen zu einer gesteigerten Herzschlagrate und zu vermehrtem Wachstum des Herzmuskels<sup>3</sup>. Die erhöhte *DOR*-Expression im Herzmuskel könnte diesen Effekt begünstigen.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Einfluss des Geschlechtes der Versuchstiere auf die *DOR*-Expression gezeigt. Bei der Gabe einer fettreichen Diät wurde dieser im weißen und braunen Fettgewebe beobachtet. Der Effekt zeigte sich bei genetisch bedingt adipösen Mäusen zusätzlich im Skelett- und Herzmuskel (Abbildung 4.1). Die Änderungen in der *DOR*-Expression im Fett- und Muskelgewebe waren bei den männlichen Mäusen stärker ausgeprägt als bei den weiblichen Versuchstieren (Abbildung 2.5).

Grove *et al.* (2010) fanden bei männlichen Mäusen, nach der Fütterung einer fettreichen Diät über 12 Wochen, eine höhere Gewichtszunahme und eine größere Fetteinlagerung als bei weiblichen Tieren. Ebenfalls war bei männlichen Tieren die Expression von Genen erhöht, die mit Entzündungsreaktionen und Zytokinen assoziiert sind<sup>29</sup>.

Beim Menschen, so wie in den meisten Säugetieren, gibt es einen deutlichen Unterschied in der Skelettmuskelmasse zwischen den Geschlechtern. Dies ist auf erhöhte Testosteronspiegel bei Männern nach der Pubertät zurückzuführen (zusammengefasst in<sup>30</sup>).

In einer Microarray Studie beschrieben Yang *et al.* (2006), dass im Skelettmuskel fast 900 Gene und im Fettgewebe mehr als 5000 Gene geschlechtsspezifisch unterschiedlich exprimiert werden<sup>31</sup>.

#### 4.1.4 Mögliche Funktionen von DOR im Fett- und Muskelgewebe

Bei der Gabe einer fettreichen Diät konnten für das weiße Fettgewebe und bei einer genetisch bedingten Adipositas für das braune Fettgewebe Veränderungen in der Expression von *DOR* gezeigt werden. Eine funktionelle Bedeutung von *DOR*, als Koaktivator von *TRα1*, an der Regulation von Adipositas spezifischen Genen in diesen Geweben ist somit naheliegend (Abbildung 1.2).

Das gilt zum Beispiel für den, bei Liu *et al.* (2003)<sup>18</sup> beschriebenen, Einfluss von *TRα1* auf die Lipolyse im weißen Fettgewebe. Ebenso ist eine Beteiligung von *DOR* an der Regulation der Thermogenese im braunen Fettgewebe über *TRα1*, wie sie von Ortega *et al.* (2009)<sup>17</sup> publiziert wurde, möglich.

*TRα1* ist in der Entwicklung, bei der Ausprägung des Phänotypes und der Funktion von Fasern des Skelett- und Herzmuskels involviert<sup>32</sup>. Eine von Baumgartner *et al.* (2007) beschriebene Herabregulation der *DOR*-Expression<sup>8</sup> in adipösen Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte in unserer Studie für den Skelettmuskel von HFD Mäusen oder genetisch adipösen Tieren ohne einen Typ 2 Diabetes nicht bestätigt werden. Aber es wurde eine erhöhte *DOR*-Expression im Herzmuskel von fettreich gefütterten Tieren gefunden.

*DOR* spielt eine essentielle Rolle bei der Autophagie in *Drosophila*- und Säugetierzellen<sup>13,15</sup>. In der vorliegenden Arbeit war die *DOR*-Expression im weißen Fettgewebe bei fettreich gefütterten männlichen Mäusen erhöht. Kovsan *et al.* (2011) beschrieben eine erhöhte Expression von Autophagie Genen bei Adipositas im humanen weißen Fettgewebe<sup>33</sup>.

Ein Verlust der Autophagie in Adipozyten vermindert die Lipid Einlagerung durch Effekte auf die Differenzierung der weißen und braunen Adipozyten. In Studien wurde gezeigt,

dass der Zusammenhang zwischen Autophagie und Lipiden bidirektional ist und ein erhöhter Lipidgehalt in der Zelle zu einer veränderten Autophagie führt<sup>34</sup>.

Die Faktoren Atg5 und Atg7 sind wesentlich an der Bildung des Autophagosoms beteiligt. *In vitro* wurde gezeigt, dass die Blockade der Autophagie durch knock-down dieser Faktoren die Adipogenese inhibiert<sup>35</sup>. In Atg7 knock-out Mäusen wurden eine verminderte Fettmasse und eine verbesserte Insulin Sensitivität festgestellt. Die Zellen des weißen Fettgewebes zeigten zudem Eigenschaften von braunen Fettzellen und die beta-Oxidations Raten waren erhöht<sup>36</sup>.

In welcher Weise sich eine erhöhte *DOR*-Expression in Fettgeweben auswirkt, ob auf der genomischen oder nicht-genomischen funktionellen Ebene, muss in weiteren Studien untersucht werden.

#### **4.2 Die Bedeutung der Translationskontrolle in der frühen Adipogenese**

Wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben, wurde die Signalkaskade in der Adipogenese bereits vielfältig untersucht und dargestellt<sup>37-39</sup> (siehe auch Abbildung 1.6). Dennoch sind die Regulationsmechanismen in der Adipogenese noch nicht vollständig geklärt<sup>1,2</sup>.

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit gab es noch keine Studien, welche die Translation in der frühen Adipogenese mit Hilfe des kombinierten Einsatzes von Saccharosegradienten und Mikroarrayanalyse untersuchten.

Mit Hilfe der beschriebenen Methode konnten, sechs Stunden nach der hormonellen Induktion, in 3T3-L1 Präadipozyten 43 translational herauf- und zwei herabregulierte mRNAs identifiziert werden, die eine mindestens vierfache Änderung in der Expression gegenüber nicht induzierten Zellen aufwiesen.

Diese alternativ regulierten mRNAs sind unter anderem involviert in die Kontrolle des Zellzyklus, die Kontrolle der Transkription und Translation, die Faltung von Proteinen sowie in den Transport von Aminosäuren.

In den ersten Stunden der Adipogenese ist eine große Anzahl von ribosomalen Proteinen (RP) heraufreguliert. Viele dieser RPs spielen eine spezielle Rolle in der Regulation des Zellzyklus sowie in der Expressionskontrolle von Genen, welche für den Differenzierungsprozess benötigt werden. Die meisten der detektierten Nukleinsäure bindenden Faktoren spielen eine Rolle für die Funktion der Ribosomen oder die Kontrolle der Translation. Daraus ist zu schließen, dass sich, nach der Stimulation der Adipogenese, die Kontrolle der Translation verändert. Es wird eine neue Ebene der Kontrolle gebildet, welche sich zumindest zu einem gewissen Anteil, selbst reguliert. Die Veränderungen in der Translation resultieren vermutlich aus den veränderten Eigenschaften der Ribosomen, als eine Reaktion auf die hormonelle Stimulation und eine erhöhte Expression von eIF4B.

Bei der verwendeten Methodik ist zu bedenken, dass nur eine Momentaufnahme der Translation dargestellt wird. Aus diesem Grund kann bei den gebundenen Ribosomen nicht festgestellt werden, ob sie aktiv an der Translation beteiligt sind oder pausieren. Des Weiteren können Modifikationen, wie die Synthese, Faltung oder Lokalisierung der Proteine, nicht untersucht werden (zusammengefasst in<sup>40</sup>).

Die beschriebene Arbeit ermöglicht dennoch die Identifikation von Genen, deren stark mit Ribosomen besetzte mRNA, eine erhöhte Translationsrate impliziert.

#### 4.2.1 Funktion der heraufregulierten Gene in der Adipogenese

Für RPL27a (Ribosomal Protein L27a) und eIF4B, deren mRNA nach der hormonellen Induktion verstärkt mit Ribosomen besetzt war, konnte im Western Blot eine erhöhte Proteinkonzentration gezeigt werden (Abbildung 3.4).

Eine zellspezifische, reversible Ubiquitinierung von RPL27a führt zu einer erhöhten translationalen Effizienz der Ribosomen<sup>41,42</sup>. RPL27a spielt eine Rolle in der Zusammensetzung von Ribosomen. Veränderungen in der Ribosomenstruktur führen zu einer Anpassung der Translation an spezifische mRNAs<sup>43</sup>. Ein massiver Anstieg von RPs, wie er in dieser Arbeit beschrieben wird, ist mutmaßlich wichtig für die Regulation der Translation in der Adipogenese in 3T3-L1 Zellen.

Viele RPs weisen auch extraribosomale Funktionen auf. So ist zum Beispiel *RPL27a* assoziiert mit der Marmorierung in Rindfleisch<sup>44</sup>. Diese Assoziation mit der Fetteinlagerung in das Muskelgewebe lässt eine Rolle von *RPL27a* in der Kommunikation zwischen Fett- und Muskelgewebe erwarten.

Die Aktivität von eIF4B wird durch Insulin über den PI3K Signalpfad und mTORC1 mittels Phosphorylierungen induziert (Kapitel 1.3.3.1). Das eIF4B ist mitverantwortlich für die Entfaltung von Sekundärstrukturen in 5'-UTRs (5'-untranslated regions) von mRNAs<sup>45</sup> (Abbildung 4.2). Es erleichtert somit die Translation von Genen, die zum Beispiel in die Differenzierung von Zellen involviert sind, wie c-MYC<sup>46</sup>. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass eIF4B in der Regulation des Körpergewichtes und der Insulinsensitivität phosphoryliert wird (zusammengefasst in<sup>2,47</sup>). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Adipogenese die Translationsrate und die Proteinexpression von eIF4B stark erhöht sind. Somit ist *eIF4B* als ein wichtiger Faktor in der translationalen Regulation der frühen Adipogenese zu betrachten. Durch die beschriebene erhöhte Expression von *eIF4B* erfolgt eine Veränderung in der Zusammenstellung an translatierten mRNAs.

Das Gen *IMPDH2* (Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type 2) kodiert für das limitierende Enzym in der Biosynthese des Guanin Nukleotids. Es wurde bereits mit dem Wachstum und der Differenzierung sowie der malignen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht (zusammengefasst in<sup>48</sup>).

In 3T3-L1 Präadipozyten erleichtert eine vorübergehende Zunahme von IMPDH die Akkumulation von Triglyceriden in der Adipogenese. Wohingegen die Inhibition von IMPDH den intrazellulären GTP (Guanosine Triphosphate) Spiegel reduziert und die Adipogenese in 3T3-L1 Zellen blockiert. In einer diätinduzierten Adipositas bei Mäusen führt die Inhibition von IMPDH zu einer Reduzierung des weißen Fettgewebes<sup>49</sup>.

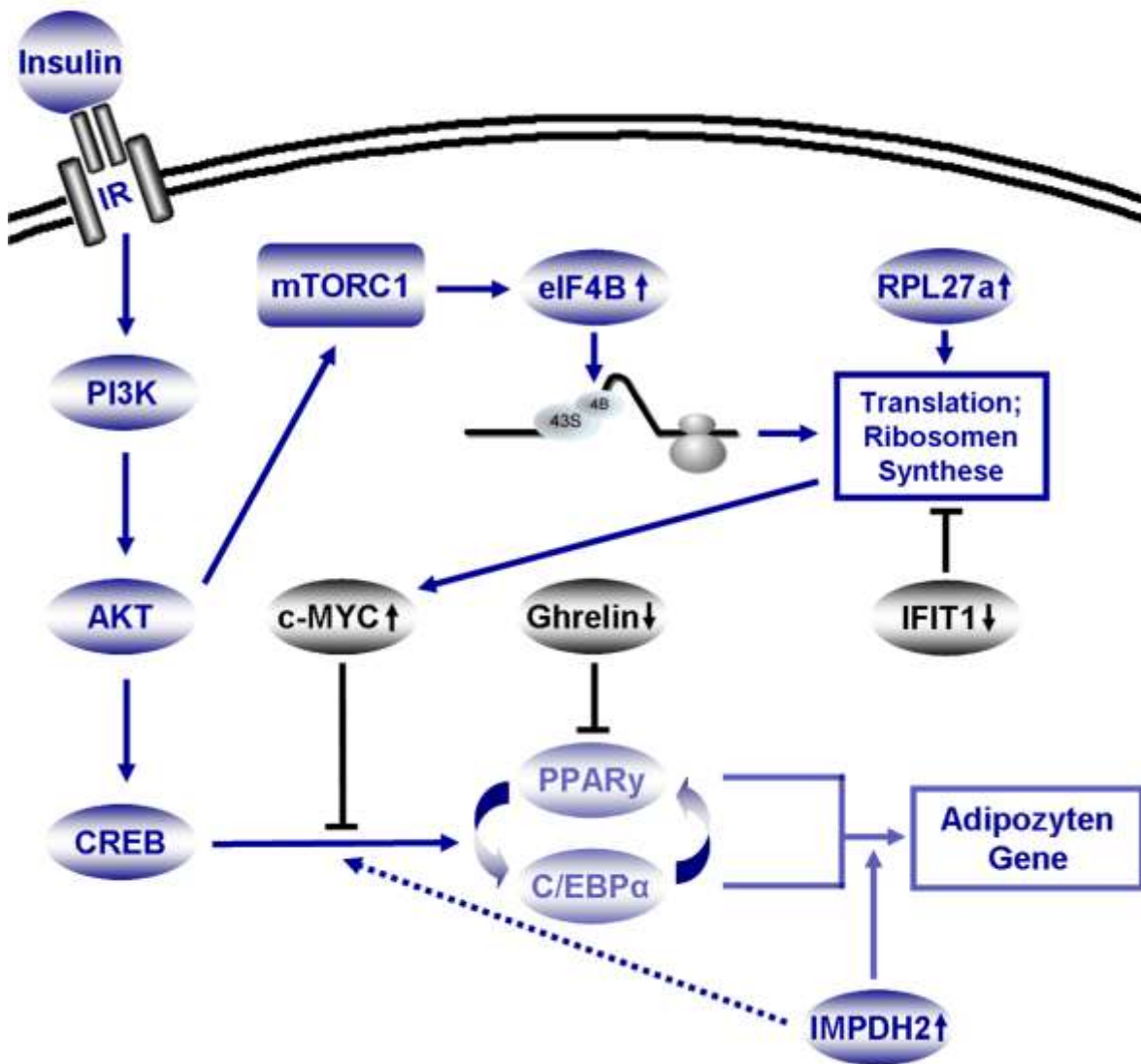
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von polysomalen *IMPDH2* bereits sechs Stunden nach der hormonellen Induktion heraufreguliert ist. Eine gleichzeitige, signifikante Erhöhung der Protein Expression konnte allerdings zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden. Es ist möglich, dass die Translation von *IMPDH2* bis zu späteren Stadien der Adipogenese pausiert. Andererseits könnte die erhöhte Expression auch auf eine Funktion von *IMDH2* in der frühen Adipogenese hinweisen, die bisher unentdeckt blieb (Abbildung 4.2).

#### 4.2.2 Funktion der herabregulierten Gene in der Adipogenese

Bei der Untersuchung der Expressionsänderung von translatierten Genen in der frühen Adipogenese wurden nur zwei Gene identifiziert, deren Expression herabreguliert war.

*IFIT1* (Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 1) ist involviert in die Inhibition der Translation<sup>50</sup>. Bisher ist eine Funktion von *IFIT1* im Zusammenhang mit der Adipogenese noch nicht beschrieben. Voraussichtlich unterstützt seine Herabregulation die Aktivierung von Translationsprozessen in der frühen Adipogenese (Abbildung 4.2).

Eine Herabregulation von Ghrelin in der frühen Adipogenese deckt sich mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie. So beschrieben Zhang *et al.* (2004), dass eine erhöhte Konzentration von endogenem Ghrelin zu einer verminderten Adipogenese in 3T3-L1 Zellen führt. Zusätzlich ist in Zellen, welche Ghrelin vermehrt exprimieren die Transkription und Translation von *PPAR $\gamma$*  vermindert<sup>51</sup>. Im Gegensatz dazu erhöht exogenes Ghrelin die Expression der mRNA von *c-MYC*, *PPAR $\gamma$*  und *C/EBP $\alpha$*  und fördert die Adipogenese<sup>52</sup> (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2:** Ausschnitt aus der translationalen Regulation der frühen Adipogenese (6 Stunden nach der hormonellen Induktion), zusammengestellt aus<sup>37–39,42,45,49,50,51,53</sup>

Die hormonelle Induktion von Präadipozyten mit Insulin aktiviert den PI3K Signalweg und somit mTORC1. Die Translation von Proteinen der Adipogenese wird durch eine gesteigerte Synthese von Ribosomen gefördert. Unter anderem wird dies durch eIF4B und RPL27a induziert, deren Expression in der frühen Adipogenese erhöht ist (blau; Pfeilspitze oben). Die Inhibitoren der Adipogenese, Ghrelin und IFIT1 (grau; Pfeilspitze unten) sind in der frühen Adipogenese herab reguliert. Eine erhöhte Expression von c-MYC inhibiert in diesem Stadium der Differenzierung die Expression von PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$ , den Hauptregulatoren der terminalen Adipogenese. Eine Funktion von IMPDH2 ist in der frühen Adipogenese noch nicht bekannt (unterbrochener Pfeil).

Abkürzungen: IR, Insulin Rezeptor; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; mTORC1, Mammalian Target of Rapamycin C1 Komplex; eIF4B, Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 B; RPL27a, Ribosomal Protein 27a; AKT, Phosphoinositide-Dependent Kinase 1, Protein Kinase B; c-MYC, Cellular Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; IFIT1, Interferon-Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 1; CREB, cAMP-Responsive Element-Binding; PPAR $\gamma$ , Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma; C/EBP $\alpha$ , CAAT/Enhancer Binding Protein alpha; IMPDH2, Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type 2.



### 4.3 Verknüpfung von Translationskontrolle und DOR

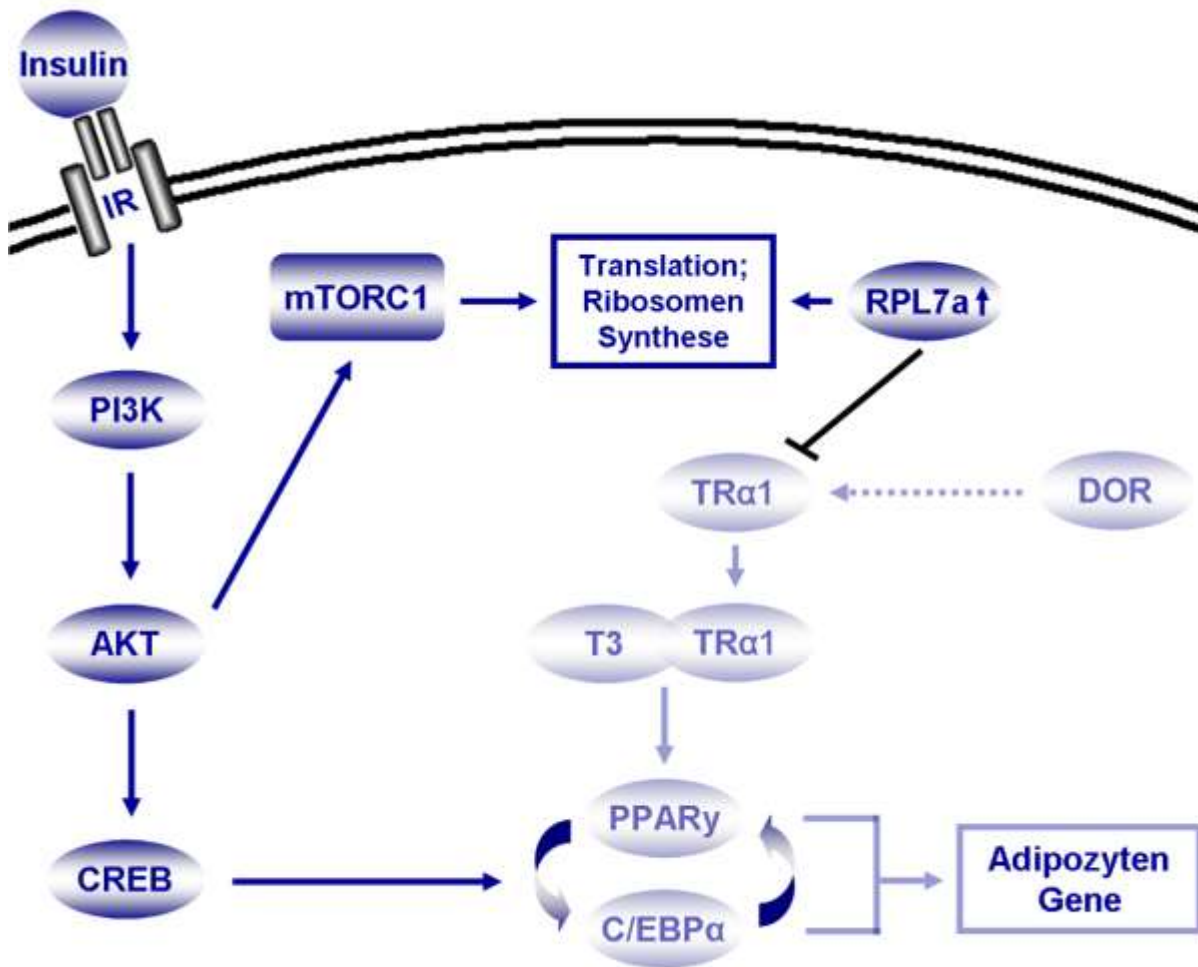
Die Expression von *RPL7a* (Ribosomal Protein L7a), dessen Translationsrate in der frühen Adipogenese erhöht ist, wurde bisher in verschiedenen Tumoren beschrieben<sup>54,55</sup>. *RPL7a* interagiert mit dem humanen TH Rezeptor, wobei es dessen Transaktivierung hemmt (Abbildung 4.3). TH wiederum ist in die Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Zellen involviert ist (zusammengefasst in<sup>55</sup>).

T3 reguliert als aktive Form des TH die Adipogenese unter anderem über die Interaktion mit *PPAR $\gamma$* <sup>56</sup>. Der Thyroid Hormon Rezeptor *TR $\alpha$ 1* bindet T3 und aktiviert oder inhibiert die Expression der Zielgene von T3<sup>57</sup> (Abbildung 4.3).

Mutationen in *TR $\alpha$ 1* inhibieren die Expression von *C/EBP $\alpha$*  und *PPAR $\gamma$* , dies resultiert in einer verminderten Adipogenese von 3T3-L1 Zellen. Das lässt auf eine direkte Beteiligung von *TR $\alpha$ 1* in der Regulation der Adipogenese schließen<sup>58</sup>. *DOR* ist, als ein Koaktivator von *TR $\alpha$ 1*, somit vermutlich ebenfalls an der Regulation der terminalen Adipogenese beteiligt (Abbildung 4.3).

Die in Kapitel 3 beschriebene Microarray Analyse in 3T3-L1 Zellen ergab eine 1,4 fache (fdr 0,025) Heraufregulation von *DOR* in der frühen Adipogenese. Dieser Effekt war zu gering um *DOR* in die Tabelle der aufgelisteten Kandidatengene (Additional Table 3.1) aufzunehmen.

Expressionsstudien über den weiteren Verlauf der Adipogenese können ein genaueres Bild über die Beteiligung von *DOR* ermöglichen.



**Abbildung 4.3:** Ausschnitt aus der translationalen Regulation der Adipogenese in Verbindung mit der postulierten Funktion von DOR, zusammengestellt aus<sup>8,37-39,55,58</sup>.

Die hormonelle Induktion von Präadipozyten mit Insulin aktiviert in der frühen Adipogenese (6 Stunden nach der hormonellen Induktion) den PI3K Signalweg und somit mTORC1. Die Translation von Proteinen in der frühen Adipogenese wird durch eine gesteigerte Synthese von Ribosomen gefördert. Unter anderem wird dies durch RPL7a induziert, dessen Expression in der frühen Adipogenese erhöht ist (blau; Pfeilspitze oben). RPL7a inhibiert die Aktivierung von T3 über den TH Rezeptor. Dies wiederum führt zu einer verminderten Expression von PPAR $\gamma$  und C/EBP $\alpha$ , den Hauptregulatoren der terminalen Adipogenese (transparent dargestellt). DOR ist, als ein Koaktivator von TR $\alpha$ 1, vermutlich ebenfalls an der Regulation der terminalen Adipogenese beteiligt (transparent; unterbrochener Pfeil).

Abkürzungen: IR, Insulin Rezeptor; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; mTORC1, Mammalian Target of Rapamycin C1 Komplex; RPL7a, Ribosomal Protein 7a; TR $\alpha$ 1, Thyroid Hormon Rezeptor alpha 1; DOR, Diabetes and Obesity Regulated; AKT, Phosphoinositide-Dependent Kinase 1, Protein Kinase B; T3, Triiodthyronin; CREB, cAMP-Responsive Element-Binding Protein; PPAR $\gamma$ , Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma; C/EBP $\alpha$ , CAAT/Enhancer Binding Protein alpha.

#### **4.4 Fazit**

Die Regulationsmechanismen der Entstehung einer Adipositas sind sehr komplex, unter anderem werden sie sowohl von einzelnen Adipositas Faktoren, als auch durch die allgemeine Regulation der Translationskontrolle beeinflusst.

So weisen Veränderungen in der Expression des Adipositas Faktors *DOR* bei einer fettreichen Diät oder einer genetisch bedingten Adipositas im Fett- und Muskelgewebe auf dessen Beteiligung im Energiestoffwechsel hin. Des Weiteren konnte für verschiedene Faktoren wie zum Beispiel *eIF4B*, *RPL27a* und endogenes Ghrelin eine Beteiligung an der translationalen Kontrolle der frühen Adipogenese aufgezeigt werden.

#### **4.5 Ausblick**

Weitere Untersuchungen von *DOR*-Expressionslevels in verschiedenen metabolisch aktiven Geweben sind notwendig um einen besseren Einblick in die Funktion von *DOR* in Erkrankungen des Stoffwechsels zu erhalten.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war noch kein funktionsfähiger Antikörper für *DOR* verfügbar. Da dieser jetzt kommerziell erhältlich ist, sind Studien zur Protein Expression von *DOR* in metabolisch relevanten Geweben von großem Interesse.

Bei der fettreichen Diät wurde in dieser Studie nur der prozentuale Anteil von Nahrungsfett in der Diät betrachtet. Für weiterführende Studien ist eine Untersuchung der Effekte von gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren notwendig.

Für ein genaueres Verständnis wie die Proteinlevels von Adipogenesegenen reguliert werden, sind weitere Analysen notwendig. Die Untersuchung der Translationskontrolle über den gesamten Verlauf der Adipogenese sollte weiteren Aufschluss über deren komplexe Regulation geben.

Die Kombination der Gradientenzentrifugation mit einer Microarray Analyse ist ebenfalls für Translationsstudien in verschiedenen Geweben bei unterschiedlichen Fragestellungen einsetzbar. So ist zum Beispiel eine Untersuchung an Fett- und Muskelgewebe in genetisch bedingt adipösen Mäusen oder fettreich gefütterten Tieren interessant, um eine Übersicht alternativ translaterter Gene in metabolisch aktiven Geweben zu erhalten.

## 4.6 Literatur

1. Zhang, H. H., Huang, J., Düvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R. M., Wu, C.-L. & Manning, B. D. Insulin Stimulates Adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 Pathway. *PLoS ONE* **4**, e6189 (2009).
2. Wang, X. & Proud, C. G. mTORC1 signaling: what we still don't know. *J Mol Cell Biol* **3**, 206–220 (2011).
3. O'Shea, P. J. & Williams, G. R. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol* **175**, 553–570 (2002).
4. Kim, S. R., Tull, E. S., Talbott, E. O., Vogt, M. T. & Kuller, L. H. A hypothesis of synergism: the interrelationship of T3 and insulin to disturbances in metabolic homeostasis. *Med Hypotheses* **59**, 660–666 (2002).
5. Lambadiari, V., Mitrou, P., Maratou, E., Raptis, A.E., Tountas, N., Raptis, S.A. & Dimitriadis, G. Thyroid hormones are positively associated with insulin resistance early in the development of type 2 diabetes. *Endocrine* **39**, 28–32 (2011).
6. Lin, Y. & Sun, Z. Thyroid hormone potentiates insulin signaling and attenuates hyperglycemia and insulin resistance in a mouse model of type 2 diabetes. *Br J Pharmacol* **162**, 597–610 (2011).
7. Brenta, G. Why can insulin resistance be a natural consequence of thyroid dysfunction? *J Thyroid Res* **2011**, 152850 (2011).
8. Baumgartner, B.G., Orpinell, M., Duran, J., Ribas, V., Burghardt, H.E., Bach, D., Villar, A.V., Paz, J.C., González, M., Camps, M., Oriola, J., Rivera, F., Palacín, M. & Zorzano, A. Identification of a Novel Modulator of Thyroid Hormone Receptor-Mediated Action. *PLoS ONE* **2**, e1183 (2007).
9. Malik, I.A., Baumgartner, B.G., Naz, N., Sheikh, N., Moriconi, F. & Ramadori, G. Changes in gene expression of DOR and other thyroid hormone receptors in rat liver during acute-phase response. *Cell Tissue Res* **342**, 261–272 (2010).
10. Linares, G.R., Xing, W., Burghardt, H., Baumgartner, B., Chen, S.-T., Ricart, W., Fernandez-Real, J.-M., Zorzano, A. & Mohan, S. Role of Diabetes and Obesity Related Protein (DOR) in the Regulation of Osteoblast Differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E40-E48 (2011).
11. Bennetts, J. S., Rendtorff, N. D., Simpson, F., Tranebjaerg, L. & Wicking, C. The coding region of TP53INP2, a gene expressed in the developing nervous system, is not altered in a family with autosomal recessive non-progressive infantile ataxia on chromosome 20q11-q13. *Dev Dyn* **236**, 843–852 (2007).
12. Moran-Jones, K., Grindlay, J., Jones, M., Smith, R. & Norman, J. C. hnRNP A2 regulates alternative mRNA splicing of TP53INP2 to control invasive cell migration. *Cancer Res* **69**, 9219–9227 (2009).
13. Nowak, J., Archange, C., Tardivel-Lacombe, J., Pontarotti, P., Pébusque, M.-J., Vaccaro, M.I., Velasco, G., Dagorn, J.-C. & Iovanna, J.L. The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **20**, 870–881 (2009).
14. Nowak, J. & Iovanna, J. L. TP53INP2 is the new guest at the table of self-eating. *Autophagy* **5**, 383–384 (2009).
15. Mauvezin, C., Orpinell, M., Francis, V.A., Mansilla, F., Duran, J., Ribas, V., Palacín, M., Boya, P., Teleman, A.A. & Zorzano, A. The nuclear cofactor DOR regulates autophagy in mammalian and Drosophila cells. *EMBO Rep* **11**, 37–44 (2010).
16. Francis, V. A., Zorzano, A. & Teleman, A. A. dDOR Is an EcR Coactivator that Forms a Feed-Forward Loop Connecting Insulin and Ecdysone Signaling. *Current Biology* **20**, 1799–1808 (2010).
17. Ortega, F.J., Moreno-Navarrete, J.M., Ribas, V., Esteve, E., Rodriguez-Hermosa, J.I., Ruiz, B., Peral, B., Ricart, W., Zorzano, A. & Fernández-Real, J.M. Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor-alpha1 gene expression than omental fat. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 2134–2141 (2009).

18. Liu, Y.-Y., Schultz, J. J. & Brent, G. A. A Thyroid Hormone Receptor  $\alpha$  Gene Mutation (P398H) Is Associated with Visceral Adiposity and Impaired Catecholamine-stimulated Lipolysis in Mice. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 38913–38920 (2003).
19. Araujo, R.L., Andrade, B.M., Padrón, A.S., Gaidhu, M.P., Perry, R.L.S., Carvalho, D.P. & Ceddia, R.B. High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology* **151**, 3460–3469 (2010).
20. Huang, W., Wood, C., L'Abbé, M.R., Gilani, G.S., Cockell, K.A. & Xiao, C.W. Soy protein isolate increases hepatic thyroid hormone receptor content and inhibits its binding to target genes in rats. *J Nutr* **135**, 1631–1635 (2005).
21. Souza, L. L. *et al.* Thyroid hormone contributes to the hypolipidemic effect of polyunsaturated fatty acids from fish oil: in vivo evidence for cross talking mechanisms. *J. Endocrinol.* **211**, 65–72 (2011).
22. Han, H. *et al.* Excess Iodine and High-Fat Diet Combination Modulates Lipid Profile, Thyroid Hormone, and Hepatic LDLr Expression Values in Mice. *Biological Trace Element Research* (2012).doi:10.1007/s12011-011-9300-x
23. Kemmer, F.W., Berger, M., Herberg, L., Gries, F.A., Wirdeier, A. & Becker, K. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Demonstration of insulin resistance in the obese Zucker rat. *Biochem J* **178**, 733–741 (1979).
24. Ceriello, A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metab Clin Exp* **49**, 27–29 (2000).
25. Sepe, A., Tchkonina, T., Thomou, T., Zamboni, M. & Kirkland, J. L. Aging and Regional Differences in Fat Cell Progenitors – A Mini-Review. *Gerontology* **57**, 66–75 (2011).
26. Lee, J.-Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y.-I., Hashizaki, H., Kim, M.-J., Sakamoto, T., Goto, T. & Kawada, T. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **302**, C463–C472 (2012).
27. Ribeiro, M.O., Carvalho, S.D., Schultz, J.J., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Bianco, A.C. & Brent, G.A. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J. Clin. Invest.* **108**, 97–105 (2001).
28. Marsili, A., Aguayo-Mazzucato, C., Chen, T., Kumar, A., Chung, M., Lunsford, E.P., Harney, J.W., Van-Tran, T., Gianetti, E., Ramadan, W., Chou, C., Bonner-Weir, S., Larsen, P.R., Silva, J.E. & Zavacki, A.M. Mice with a Targeted Deletion of the Type 2 Deiodinase Are Insulin Resistant and Susceptible to Diet Induced Obesity. *PLoS ONE* **6**, e20832 (2011).
29. Grove, K. L., Fried, S. K., Greenberg, A. S., Xiao, X. Q. & Clegg, D. J. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *Int J Obes (Lond)* **34**, 989–1000 (2010).
30. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91**, 1447–1531 (2011).
31. Yang, X., Schadt, E.E., Wang, S., Wang, H., Arnold, A.P., Ingram-Drake, L., Drake, T.A. & Lusis, A.J. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res* **16**, 995–1004 (2006).
32. White, P., Burton, K. A., Fowden, A. L. & Dauncey, M. J. Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. *The FASEB Journal* **15**, 1367–1376 (2001).
33. Kovsan, J., Blüher, M., Tarnovscki, T., Klötting, N., Kirshtein, B., Madar, L., Shai, I., Golan, R., Harman-Boehm, I., Schön, M.R., Greenberg, A.S., Elazar, Z., Bashan, N. & Rudich, A. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, E268–277 (2011).
34. Czaja, M. J. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *Am J Physiol, Cell Physiol* **298**, C973–978 (2010).

35. Singh, R., Xiang, Y., Wang, Y., Baikati, K., Cuervo, A.M., Luu, Y.K., Tang, Y., Pessin, J.E., Schwartz, G.J. & Czaja, M.J. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* **119**, 3329–3339 (2009).
36. Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M. & Jin, S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 19860–19865 (2009).
37. Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* **4**, 263–273 (2006).
38. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 885–896 (2006).
39. Catania, C., Binder, E. & Cota, D. mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease. *Int J Obes (Lond)* **35**, 751–761 (2011).
40. Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
41. Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. & Finley, D. Cell Cycle–Regulated Modification of the Ribosome by a Variant Multiubiquitin Chain. *Cell* **102**, 67–76 (2000).
42. Caldarola, S., De Stefano, M. C., Amaldi, F. & Loreni, F. Synthesis and function of ribosomal proteins--fading models and new perspectives. *FEBS J* **276**, 3199–3210 (2009).
43. Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P. & Silver, P. A. Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* **131**, 557–571 (2007).
44. Yamada, T., Sasaki, S., Sukegawa, S., Miyake, T., Fujita, T., Kose, H., Morita, M., Takahagi, Y., Murakami, H., Morimatsu, F. & Sasaki, Y. Association of a single nucleotide polymorphism in ribosomal protein L27a gene with marbling in Japanese Black beef cattle. *Anim Sci J* **80**, 631–635 (2009).
45. Hernández, G. & Vazquez-Pianzola, P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev* **122**, 865–876 (2005).
46. Shahbazian, D., Parsyan, A., Petroulakis, E., Topisirovic, I., Martineau, Y., Gibbs, B.F., Svitkin, Y. & Sonenberg, N. Control of cell survival and proliferation by mammalian eukaryotic initiation factor 4B. *Mol Cell Biol* **30**, 1478–1485 (2010).
47. Rui, L. A link between protein translation and body weight. *J Clin Invest* **117**, 310–313 (2007).
48. Fellenberg, J., Kunz, P., Sähr, H. & Depeweg, D. Overexpression of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase Type II Mediates Chemoresistance to Human Osteosarcoma Cells. *PLoS ONE* **5**, e12179 (2010).
49. Su, H., Gunter, J.H., de Vries, M., Connor, T., Wanyonyi, S., Newell, F.S., Segal, D., Molero, J.C., Reizes, O., Prins, J.B., Hutley, L.J., Walder, K. & Whitehead, J.P. Inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase reduces adipogenesis and diet-induced obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **386**, 351–355 (2009).
50. Fensterl, V. & Sen, G. C. The ISG56/IFIT1 gene family. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 71–78 (2011).
51. Zhang, W., Zhao, L., Lin, T.R., Chai, B., Fan, Y., Gantz, I. & Mulholland, M.W. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* **15**, 2484–2491 (2004).
52. Liu, J., Lin, H., Cheng, P., Hu, X. & Lu, H. Effects of ghrelin on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]* **29**, 227–230 (2009).
53. Heath, V. J., Gillespie, D. A. & Crouch, D. H. Inhibition of the terminal stages of adipocyte differentiation by cMyc. *Exp Cell Res* **254**, 91–98 (2000).
54. Kroes, R.A., Jastrow, A., McLone, M.G., Yamamoto, H., Colley, P., Kersey, D.S., Yong, V.W., Mkrdichian, E., Cerullo, L., Leestma, J. & Moskal, J.R. The identification of novel therapeutic targets for the treatment of malignant brain tumors. *Cancer Lett* **156**, 191–198 (2000).

- 
55. Zheng, S., Yao, Y., Dong, Y., Lin, F., Zhao, H., Shen, Z., Sun, Y. & Tang, L. Down-regulation of ribosomal protein L7A in human osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**, 1025–1031 (2009).
  56. Obregon, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid* **18**, 185–195 (2008).
  57. Lu, C. & Cheng, S.-Y. Thyroid hormone receptors regulate adipogenesis and carcinogenesis via crosstalk signaling with peroxisome proliferator-activated receptors. *J Mol Endocrinol* **44**, 143–154 (2010).
  58. Mishra, A., Zhu, X.-G., Ge, K. & Cheng, S.-Y. Adipogenesis is differentially impaired by thyroid hormone receptor mutant isoforms. *J Mol Endocrinol* **44**, 247–255 (2010).

## 5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an alle Personen richten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Burkhard Morgenstern für die freundliche Bereitschaft diese Arbeit gegenüber der biologischen Fakultät als Erstgutachter zu betreuen.

Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie seine fachliche Betreuung und freundliche Unterstützung.

Dr. Bernhard G. Baumgartner für seine vielfältigen Ideen, wertvolle Ratschläge, Tipps, konstruktive Kritik und jegliche Unterstützung, sogar aus der Ferne.

Prof. Tim Reißbarth und Silvia von der Heyde für ihre Hilfe bei der statistischen Planung und Auswertung dieser Arbeit sowie für ihre Geduld bei der Vermittlung von statistischen Kenntnissen.

Oleksandr Lytovchenko für die hervorragende Einarbeitung in Labor und Zellkultur sowie die fachliche und moralische Unterstützung.

Den Koautoren sowie allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen des Tierärztlichen Institutes für ihre freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit und Unterstützung.

Prof. Dr. Antonio Zorzano und Dr. Montserrat Romero für die Ermöglichung meines Praktikums im IRB in Barcelona.

Dr. Jan T. Soller für das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für die vielfältige konstruktive Kritik und moralische Unterstützung.

Jennifer Mayer für die lange freundschaftliche Zusammenarbeit, die anregenden Gespräche, den Erfahrungsaustausch und engagierte Hilfe bei technischen und bürokratischen Problemen.

Meinen Freundinnen Sarah Seifert, Katharina Licht und Nina Behnke für ihre stetige Hilfsbereitschaft, die aufbauenden Gespräche sowie die reichliche konstruktive Kritik.

Der Mittagsrunde mit Jennifer, Isabel, Jan, Cord und Stefan. Unsere mehr oder weniger fachlichen Diskussionen haben mir so manchen Tag gerettet.

Meiner Familie und meinen Schwiegereltern, denn sie glauben daran, dass ich alles schaffen kann was ich mir vorgenommen habe.

Meinem Ehemann Andre für seine Liebe, Fürsorge, Geduld und Unterstützung. Ohne ihn hätte ich nie den Mut und die Kraft für diese Arbeit aufgebracht.



## 6. Lebenslauf

### Carolin Fromm-Dornieden

Geburtsdatum: 30. Juli 1978  
Geburtsort: Göttingen  
Familienstand: verheiratet; Geburtsname: Fromm  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

10.2003 - 06.2008 Biologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen  
Diplomarbeit in der Historischen Anthropologie und Humanökologie mit dem Thema:  
„Entwicklung eines Analysesystems zur Annäherung an die genetischen Grundlagen von Body Mass Index (BMI) und Bone Mineral Density (BMD)“  
Abschluss: Diplom-Biologin  
08.1998 - 07.2001 Diätschule Bethel, Bielefeld: staatl. geprüfte Diätassistentin  
08.1991 - 07.1998 Gymnasium Uslar: Abitur

### Beruflicher Werdegang

seit 07.2008 Angestellt im Tierärztlichen Institut Göttingen im Rahmen der Promotion zum Thema:  
"Adipositas: *In vivo* Expressionsstudien über den Adipositas Faktor *DOR* und Studien zur Translationskontrolle in der frühen Adipogenese"  
im Februar 2007 Studentische Hilfskraft in der Historischen Anthropologie und Humanökologie  
12.2001 - 09.2003 Angestellt bei der Zehnacker Catering GmbH in Hannover als staatl. geprüfte Diätassistentin  
08.2001 - 12.2001 Angestellt bei der Dussmann AG&Co. KgaA in Hannover als staatl. geprüfte Diätassistentin

Göttingen, 16.03.2012

Carolin Fromm-Dornieden